

**DETERMINACIÓN POR HPLC DE NARINGINA, HESPERIDINA, NARINGENINA  
Y HESPERETINA EN JUGOS CÍTRICOS Y APLICACIÓN DE NARINGINASA EN  
EL JUGO DE MANDARINA.**

**JENNIFER PILAR ROJAS LLANES**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2006**

**DETERMINACIÓN POR HPLC DE NARINGINA, HESPERIDINA, NARINGENINA  
Y HESPERETINA EN JUGOS CÍTRICOS Y APLICACIÓN DE NARINGINASA EN  
EL JUGO DE MANDARINA.**

**JENNIFER PILAR ROJAS LLANES**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Química**

**DIRECTORA: JANETH AIDÉ PEREA VILLAMIL**  
**Química, Magíster en Química, Doctora en Química**

**CODIRECTORA: Dra. CLAUDIA CRISTINA ORTÍZ LÓPEZ**  
**Microbióloga, Magíster en Ciencias de la Ingeniería, Doctora en Ciencias**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
CICTA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**  
**BUCARAMANGA**  
**2006**

## **DEDICATORIA**

Al Santísimo Sacramento del Altar, presencia viva de Jesucristo.

A la Santísima Virgen María, fuente inagotable de amor.

A Pilar LLanes y Ricardo Rojas: padres, hermanos, compañeros y amigos.

A Nataly y Camilo, ejemplos de humildad.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Santísima Trinidad, único y verdadero Dios: Creador, Redentor y Santificador.

A la siempre Virgen María, por acompañarme en todo momento.

A mis padres, por el amor que me han brindado.

A la Doctora JANETH AIDÉ PEREA VILLAMIL, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por permitirme ser receptora de sus conocimientos y por toda su colaboración en el desarrollo del proyecto.

A las calificadoras, Doctoras ELENA STASHENKO Y LUZ ANGELA CARREÑO, por sus sugerencias.

A la Universidad Industrial de Santander, Vicerrectoría de Investigaciones y Extensión, por financiar el proyecto.

Al Laboratorio de Alimentos, CICTA, por su ayuda en la ejecución de este proyecto.

A Martha Rueda y Rafael Rey, por suministrar las frutas para llevar a cabo el desarrollo experimental.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización del presente trabajo, entre ellas Geovanna Tafurt, Sandra Cepeda, Carolina Cuchimaque, Oveimar Barbosa y Carlos Delgado.

## CONTENIDO

	<b>pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	17
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	
1.1 GENERALIDADES SOBRE LOS CÍTRICOS	20
1.1.1 Morfología de los cítricos	20
1.1.2 Anatomía de los frutos cítricos	22
1.2. DESARROLLO DEL SABOR AMARGO EN JUGOS CÍTRICOS	26
1.2.1 Limonoides amargos en frutas cítricas	26
1.2.2 Flavonoides en frutas cítricas	28
1.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS EN LA DETERMINACIÓN DE FLAVANONAS EN LAS FRUTAS CÍTRICAS.	33
1.4. ENZIMAS EMPLEADAS EN LA REMOCIÓN DEL AMARGOR EN LOS JUGOS CÍTRICOS	35
1.4.1 Naringinasa	35
1.4.2 Limonoide glucosiltransferasa	39
1.4.3 Limonoato deshidrogenasa	39
1.5 OTROS MÉTODOS EMPLEADOS EN LA ELIMINACIÓN DEL AMARGOR EN LOS JUGOS CÍTRICOS	41
1.6 ANÁLISIS SENSORIAL EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS	44
<b>2. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	
2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS	46

2.2	DESARROLLO DEL MÉTODO POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE NARINGINA, NARINGENINA, HESPERIDINA Y HESPERETINA EN JUGOS CÍTRICOS	49
2.2.1	Pruebas preliminares	49
2.2.2	Determinación de las figuras analíticas de mérito	52
2.2.2.1	Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención, tiempos de retención relativos, áreas y áreas relativas.	52
2.2.2.2	Evaluación de la eficiencia del método	53
2.2.2.3	Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método.	54
2.2.2.4	Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para las flavanonas analizadas.	55
2.3	MUESTREO	56
2.4	PREPARACIÓN DE MUESTRAS	60
2.5	CARACTERIZACIÓN DE JUGOS CÍTRICOS	60
2.6	ANÁLISIS DE JUGOS CÍTRICOS POR HPLC	
2.6.1	Análisis cualitativo	61
2.6.2	Análisis cuantitativo	61
2.7	EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE NARINGINASA EN EL PROCESAMIENTO DEL JUGO DE MANDARINA	62
2.8	ANÁLISIS SENSORIAL	64
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
3.1	DESARROLLO DEL MÉTODO POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE NARINGINA, NARINGENINA, HESPERIDINA Y HESPERETINA EN JUGOS CÍTRICOS.	67
3.1.1	Pruebas preliminares	67

3.1.2	Determinación de las figuras analíticas de mérito	69
3.1.2.1	Repetibilidad del método para tiempos de retención, tiempos de retención relativos, áreas y áreas relativas de las flavanonas	69
3.1.2.2	Evaluación de la eficiencia del método	78
3.1.2.3	Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método	79
3.1.2.4	Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para las flavanonas analizadas	80
3.2	<b>ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE JUGOS CÍTRICOS</b>	83
3.3	<b>ANÁLISIS DE JUGOS CÍTRICOS POR HPLC</b>	
3.3.1	Análisis cualitativo	84
3.3.2	Análisis cuantitativo	86
3.4	<b>EFFECTO DE LA NARINGINASA COMERCIAL SOLUBLE EN EL JUGO DE MANDARINA</b>	91
3.5	<b>ANÁLISIS SENSORIAL</b>	97
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	100
<b>5.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	101
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	102
	<b>ANEXOS</b>	109

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Flavonoides predominantes en los cítricos.	29
<b>Tabla 2.</b> Microorganismos usados en la producción de naringinasa.	36
<b>Tabla 3.</b> Reactivos, materiales y equipos utilizados.	46
<b>Tabla 4.</b> Longitud de onda de máxima absorción para cada flavanona.	67
<b>Tabla 5.</b> Evaluación de la repetibilidad del tiempo de retención de la naringina.	70
<b>Tabla 6.</b> Evaluación de la repetibilidad del área de la naringina.	71
<b>Tabla 7.</b> Evaluación de la repetibilidad de los tiempos de retención y de los tiempos de retención relativos de la hesperidina.	72
<b>Tabla 8.</b> Evaluación de la repetibilidad de las áreas y de las áreas relativas de la hesperidina.	73
<b>Tabla 9.</b> Evaluación de la repetibilidad de los tiempos de retención y de los tiempos de retención relativos de la naringenina.	74
<b>Tabla 10.</b> Evaluación de la repetibilidad de las áreas y de las áreas relativas de la naringenina.	75
<b>Tabla 11.</b> Evaluación de la repetibilidad de los tiempos de retención y de los tiempos de retención relativos de la hesperetina.	76
<b>Tabla 12.</b> Evaluación de la repetibilidad de las áreas y de las áreas relativas de la hesperetina.	77
<b>Tabla 13.</b> Evaluación de la eficiencia del método.	78
<b>Tabla 14.</b> Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.	80
<b>Tabla 15.</b> Límites de detección y de cuantificación para cada flavanona.	82
<b>Tabla 16.</b> Análisis fisicoquímico de jugos cítricos.	83

<b>Tabla 17.</b>	Análisis cualitativo de flavanonas en jugos cítricos.	84
<b>Tabla 18.</b>	Análisis cuantitativo de flavanonas en jugos cítricos.	88
<b>Tabla 19.</b>	Resultados reportados en la bibliografía para el análisis de flavanonas	89
<b>Tabla 20.</b>	Efecto de la naringinasa comercial soluble en el jugo de mandarina	92
<b>Tabla 21.</b>	Porcentajes de Conversión de la hesperidina	97
<b>Tabla 22.</b>	Estudio orientado del amargor en el jugo de mandarina <i>común</i>	98
<b>Tabla 23.</b>	Sabor del jugo de mandarina días después de su extracción	98

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema del corte transversal de un cítrico.	23
<b>Figura 2.</b> Estructura química de los limonoides amargos en los cítricos.	27
<b>Figura 3.</b> Transformación deL Ácido limonoico anillo A-lactona (LARL) en limonina por acción de la Limonoide anillo-D lactona hidrolasa (LDRLas).	28
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la naringina.	29
<b>Figura 5.</b> Distribución de naringina en el pomelo y en la lima.	30
<b>Figura 6.</b> Estructura química de la naringenina.	32
<b>Figura 7.</b> Estructura química de la hesperidina.	32
<b>Figura 8.</b> Estructura química de la hesperetina.	33
<b>Figura 9.</b> Secuencia del proceso de hidrólisis de la naringina por acción de la naringinasa.	38
<b>Figura 10.</b> Acción de la naringinasa sobre la hesperidina.	39
<b>Figura 11.</b> Producción de 17-deshidrolimonoato anillo A lactona.	40
<b>Figura 12.</b> Variedades de cítricos analizadas.	57
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas de jugos de mandarina	85
<b>Figura 14.</b> Variación en la concentración del compuesto en 3,72 min y de la naringenina en jugo sin tratar y en jugo tratado con enzima	96
<b>Figura 15.</b> Variación en la concentración de la hesperidina y la hesperetina en jugo sin tratar y en jugo tratado con enzima	96

## LISTA DE ANEXOS

		<b>pág.</b>
<b>ANEXO 1.</b>	SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO.	111
<b>ANEXO 2.</b>	CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LAS FLAVANONAS ANALIZADAS.	130

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbencenzotiazolin-6-sulfónico.
<b>AOAC</b>	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Asociación Oficial de Químicos Analíticos)
<b>ASTM</b>	<i>American Society for Testing and Materials</i> (Sociedad Americana de pruebas y materiales)
<b>C8</b>	Cadena de ocho átomos de carbono
<b>C18</b>	Cadena de dieciocho átomos de carbono
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>DAD</b>	Detector de arreglo de diodos
<b>DEAE</b>	Dietilamino etanol
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agencia de Protección Ambiental)
<b>GLP</b>	<i>Good Laboratory Practice</i> (Buenas Prácticas de Laboratorio)
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registrations of Pharmaceutical for Human Use</i> (Conferencia Internacional sobre Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Fármacos para Uso Humano).
<b>ICONTEC</b>	Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación
<b>IU</b>	<i>International Units</i> (Unidades Internacionales)
<b>LARL</b>	Ácido limónico anillo-A lactona
<b>LDasa</b>	Limonoato deshidrogenasa
<b>LDRLasa</b>	Limonoide anillo-D lactona hidrolasa (LDRLasa)
<b>LGTasa</b>	Limonoide glucosiltransferasa
<b>LOD</b>	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección)

<b>LOQ</b>	<i>Limit of Quantitation</i> (Límite de cuantificación)
<b>PDVB</b>	Polidivinilbenceno
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de determinación
<b>RMSE</b>	<i>Root Mean Square Error</i> (Raíz principal de los errores al cuadrado)
<b>RP</b>	<i>Reversed phase</i> (Fase reversa)
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RSD</b>	<i>Relative Standard Deviation</i> (Desviación Estándar Relativa)
<b>TLC</b>	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía de capa fina)
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>UV-VIS</b>	Ultravioleta-Visible

## RESUMEN

**TÍTULO:** DETERMINACIÓN POR HPLC DE NARINGINA, HESPERIDINA, NARINGENINA Y HESPERETINA EN JUGOS CÍTRICOS Y APLICACIÓN DE NARINGINASA EN EL JUGO DE MANDARINA\*

**AUTOR:** Rojas LLanes, Jennifer Pilar\*\*

**PALABRAS CLAVES:** HPLC, jugos cítricos, flavanonas, naringinasa, sabor amargo.

### DESCRIPCIÓN

Se caracterizaron los jugos de las variedades cítricas más representativas cultivadas en el departamento de Santander: mandarina *común*, *arrayana*, *clementina* y *onecco*, naranja *valencia campbell* y *valencia frost*, toronja *ica hático* y *star ruby*, limón *común* y lima *tahití*, en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, y en cuanto a su concentración de naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina. Además, se evaluó el efecto de la naringinasa comercial soluble en el sabor amargo del jugo de mandarina.

Para determinar la concentración de flavanonas y evaluar el efecto de la enzima, fue necesario estandarizar un método de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), que permitiera la determinación simultánea de las cuatro flavanonas, cumpliendo en todos los casos con lo establecido por las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Se encontró que la concentración de flavanonas varía entre los jugos cítricos y entre las variedades de un cítrico en particular, pero en términos generales, las mayores concentraciones de naringina, hesperidina y naringenina, se encontraron en los jugos de toronja, mandarina y lima, respectivamente, y de manera específica en los jugos de toronja *ica hático*, mandarina *común* y lima *tahití*.

La naringinasa actuó en el jugo de mandarina, hidrolizando la hesperidina para producir hesperetina y aumentando la concentración de naringenina, pero no afectó el sabor amargo del jugo, según se pudo establecer con los resultados del análisis organoléptico.

El jugo de mandarina en refrigeración tiene un tiempo de vida útil muy corto, a las 24 horas después de su extracción ya se detecta un amargor moderado.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Aidé Perea Villamil

## ABSTRACT

**TITLE:** DETERMINATION FOR HPLC OF NARINGIN, HESPERIDIN, NARINGENIN AND HESPERETIN IN CITRIC JUICES AND APLICATION OF NARINGINASE IN THE MANDARIN JUICE\*

**AUTHOR:** Rojas Llanes, Jennifer Pilar\*\*

**KEYWORDS:** HPLC, citric juices, flavanones, naringinase, bitterness.

### DESCRIPTION

The juices of the citric varieties most representatives cultivated in the department of Santander were characterized: mandarin *common*, *arrayan*, *clementine* and *onecco*, orange *valencia campbell* and *valencia frost*, grapefruit *ica hático* and *star ruby*, lemon *common* and lime *tahití*, with regard to your physicochemical properties, and with regard to your concentration of naringin, hesperidin, naringenin and hesperetin. Moreover, the effect of the commercial soluble naringinase was evaluated on the bitterness the mandarin juice.

For to determinate the concentration of flavanones and to evaluate the effect of the enzyme, was necessary to standardize a method of analysis for high performance liquid chromatography (HPLC), that permit the simultaneous determination of the four flavanones, carry out with the established for the Good Practices of the Laboratory.

Found it that the concentration of flavanones changes between the citric juices and between the varieties of a citric in particular, but in general terms, the greater concentrations of naringin, hesperidin and naringenin, were found in the grapefruit, mandarin and lime juices, respectively, and of specific manner in the grapefruit *ica hático*, mandarin *common* and lime *tahití* juices.

The naringinase functioned on the mandarin juice, through the hydrolysis of hesperidin for to produce hesperetin, moreover increased the concentration of naringenin, but didn't affect the bitterness of the juice, according to the results of the sensorial analysis.

The mandarin juice in refrigeration has a time of useful life very short, 24 hours after of its extraction is detected a moderate bitterness.

---

\* Project degree

\*\* Faculty of Sciences. School of Chemistry. Aidé Perea Villamil

## INTRODUCCIÓN

Los principales departamentos productores de naranja en Colombia son Tolima, Antioquia, Cesar, Santander y Cauca, los cuales cubren el 97,9% de la producción de esta especie. Tolima, Atlántico y Santander son los principales productores de limón, con una participación del 96,2% en el total de la producción; mientras que el principal departamento productor de mandarina es Santander, con un 85,5 % del total nacional según la producción acumulada en el periodo 2000-2004. La producción nacional de mandarina tuvo un gran periodo de expansión entre 1992-2004 al pasar de 270 a 64.883 toneladas, con una tasa de crecimiento promedio anual de 54,6% [1].

A pesar de las excelentes condiciones agroecológicas que presentan algunas zonas del país para el desarrollo cítrico, éste se ve altamente limitado, pues se estima que las pérdidas poscosecha están entre 12% y 25%, debido a que los cítricos son productos perecederos [1].

Entre los cítricos, las mandarinas presentan un tiempo de vida más corto que las naranjas, las toronjas y los limones; ellas son mucho más sensibles a las condiciones de estrés anaeróbico a las que son sometidas las frutas cítricas durante su manipulación de poscosecha [2].

Por lo anterior, la necesidad de transformar los cítricos, en especial la mandarina, se hace evidente durante los picos de cosecha cuando la fruta satura los mercados regionales, y su valor disminuye por debajo del nivel que asegura la sostenibilidad del mismo [3].

Entre las alternativas de comercialización se han desarrollado procesos para la elaboración de zumos. Sin embargo, algunas variedades cítricas poseen un amargor excesivo, representando un impacto económico significativamente negativo sobre la industria de cítricos, debido a que los jugos amargos tienen un valor comercial más bajo y normalmente son rechazados por los consumidores [4].

Para resolver este problema en los jugos de naranja y toronja se han desarrollado procedimientos con resinas neutras o de intercambio iónico y carbón activado, pero estas tecnologías remueven por completo otros flavonoides no amargos y disminuyen el contenido de vitamina C hasta en un 33%. También se han implementado tratamientos con la enzima naringinasa, la cual no remueve los flavonoides sino que los transforma, y las condiciones de reacción son mucho más suaves [5]. Sin embargo, en el caso de la mandarina este problema sigue latente, limitando su aplicación al consumo como fruta fresca.

Dentro de los compuestos que influyen en el sabor de los jugos cítricos están la naringina, que confiere sabor amargo [5], y la hesperidina, cuya hidrólisis produce un compuesto con propiedades edulcorantes [6]. Tanto la naringina como la hesperidina son flavanonas glicosídicas que contienen enlaces ramnosa-glucosa 1,2 y 1,6 respectivamente, de manera que ambos flavonoides pueden ser hidrolizados por acción de la enzima naringinasa [7], disminuyendo el amargor de los jugos.

La concentración de los compuestos mencionados depende de la variedad, por lo que resulta de gran importancia, en primera instancia caracterizar los cítricos más representativos de la región, y en segunda instancia evaluar la aplicación de la naringinasa en el tratamiento del jugo de mandarina, cítrico que como se mencionó anteriormente, es el de mayor producción en la región y ha sido el menos estudiado.

Por lo anterior, en el presente proyecto se caracterizaron los jugos de las variedades de mandarinas, naranjas, limones y toronjas más representativas cultivadas en el departamento de Santander, en lo referente a sus propiedades fisicoquímicas, según la Norma ICONTEC 404 y en cuanto a su contenido de flavanonas (naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina), en el último caso, empleando cromatografía líquida de alta eficiencia -HPLC-. Además, se evaluó el efecto de la naringinasa comercial soluble en la concentración de las flavanonas presentes en el jugo de mandarina, correlacionando los resultados obtenidos con el análisis organoléptico del jugo.

El proyecto se realizó con el apoyo económico de la Universidad Industrial de Santander, a través de la Vicerrectoría de Investigaciones, y se desarrolló conjuntamente entre la Escuela de Química y la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico.

El presente documento se estructuró en cinco capítulos. En el primero de ellos se describen los conceptos básicos relacionados con las frutas cítricas, el desarrollo del sabor amargo en los jugos cítricos, las enzimas y otros métodos utilizados en la disminución del amargor, y las generalidades del análisis sensorial en la industria de alimentos, además se incluyen los avances recientes a nivel mundial, relacionados con la tecnología aplicada a los jugos cítricos. En el segundo capítulo se describe el desarrollo experimental llevado a cabo para el logro de los objetivos. En el tercer capítulo se presentan los resultados experimentales obtenidos en esta investigación y se hace un análisis crítico de ellos. En el cuarto capítulo se presentan las conclusiones y finalmente las recomendaciones.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. GENERALIDADES DE LOS CÍTRICOS

Los cítricos pertenecen a la clase Angiospermae, a la subclase Dicotiledónea, a la orden Rutae, a la familia Rutácea y al género *Citrus*, y dentro de ellos se conocen las siguientes especies: naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*), limón (*Citrus aurantifolia*), toronja (*Citrus paradisi-Citrus reticulata*). El origen del género *Citrus* se sitúa en el sureste de Asia y el centro de China, Filipinas y el archipiélago Indomalayo hasta Nueva Guinea [1].

#### 1.1.1 Morfología de los cítricos.

❖ Limón, *Citrus aurantifolia*

Fruto redondo u ovalado con 8 a 10 segmentos, corteza semidelgada, con glándulas de aceite pronunciadas y de color amarillo al madurar; jugo abundante y de color generalmente claro, de sabor ácido, semillas pequeñas, lisas y de cotiledones blancos.

❖ Naranja agria, *Citrus aurantium*

Fruto redondo, un poco alargado y con depresiones suaves en los extremos, corteza gruesa, superficie rugosa, de color anaranjado rojizo al madurar, de 10 a 12 segmentos, compuestos por sacos alargados, delgados, con jugo de sabor ácido amargo, y semillas abundantes. Contiene los glucósidos, isohesperidina, aurantamarina y hesperidina, de los cuales sólo el último se encuentra en la naranja dulce y en mayor proporción [8].

❖ Naranja dulce, *Citrus sinensis*

Frutos de forma variada: redondo, achatado, esférico o alargado, de corteza delgada a semigruesa con 10-13 segmentos; número de semillas variable, en algunas variedades no existen.

Se caracteriza por contener un glucósido, la hesperidina, también presente en los limones, que alcanzó interés a partir del descubrimiento de la vitamina P (Citrin) en el jugo y la corteza del limón y la naranja por sus efectos positivos en los capilares sanguíneos previniendo la debilidad y la falta de plasma sanguíneo.

❖ Mandarina, *Citrus reticulata*

Fruto redondo algo achatado, de piel delgada, con glándulas aceitosas pronunciadas, que se desprenden fácilmente de la pulpa, segmentos fácilmente separables, de color salmón rojizo cuando está madura; semillas pequeñas y lisas, redondas en un extremo y punteadas en el otro; cotiledones verde claro en el interior.

❖ Mandarina agria, *Citrus reticulata var austera*

La fruta de esta variedad es más pequeña que la de la mandarina dulce, y más ácida; de forma globosa, un poco achatada, corteza suave, poco gruesa, de color amarillo al madurar; jugo amarillo rojizo, amargo; contiene semillas en regular cantidad. Esta variedad es muy usada como patrón en algunas regiones para la propagación por injerto de otras especies cítricas.

Algunas de las mandarinas agrias que se cultivan en el país posiblemente tienen su origen en hibridaciones entre la mandarina dulce (*Citrus reticulata*) y otras especies ácidas, limón o naranja agria. La lima *Rangpur*, según parece es una forma de la mandarina agria en referencia, o un híbrido de esta [8].

❖ Toronja-Grapefruit, *Citrus paradisi*

El fruto es más grande que la naranja, de corteza delgada a media. El eje central sólido o semisólido, la pulpa suave y jugosa. El sabor es característico y agradable. Las membranas carpelares difíciles de separar. Los frutos son usualmente nacidos en racimos.

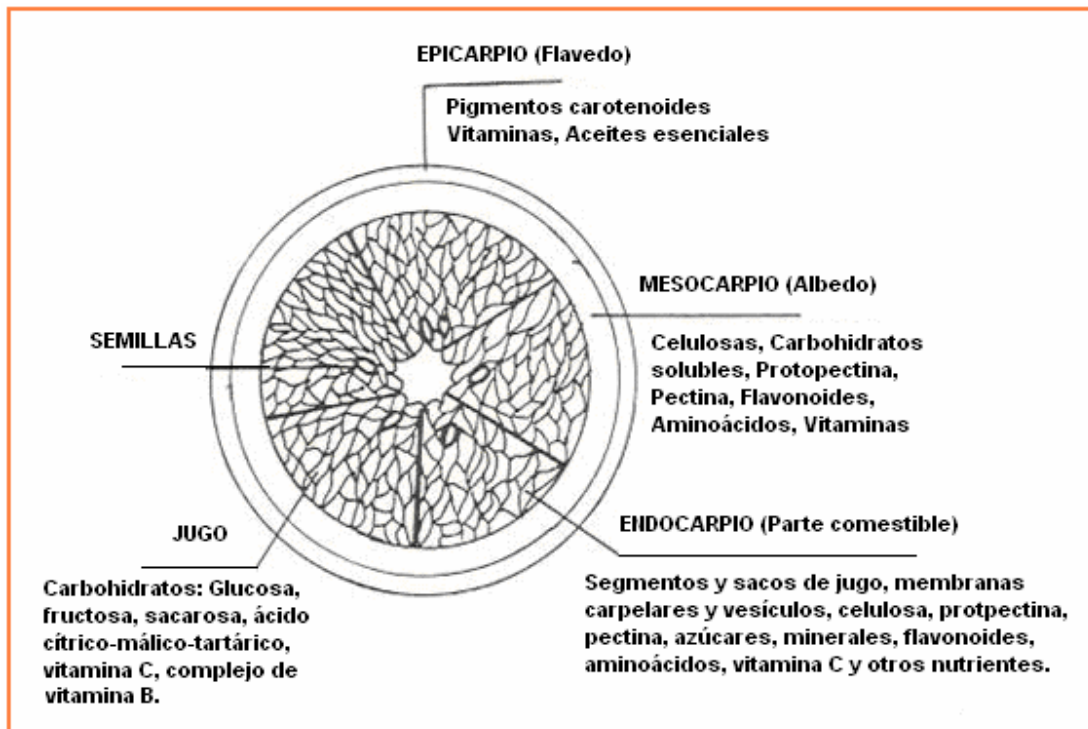
La denominación de grapefruit es citada por varios investigadores debido, según algunos, al parecido que tiene en su sabor a la uva (grape). Y según otros, por las formas de fructificación en racimos muy similares a los de la vid (grape) [8].

En el presente trabajo se evaluaron las variedades de mandarina: *común*, *arrayana*, *onecco* y *clementina*; naranja: *valencia campbell* y *valencia frost*; toronja: *ICA hático* y *star ruby*; limón *común* y lima *tahití*.

### 1.1.2 Anatomía de los frutos cítricos.

En los frutos cítricos se distinguen dos partes: la piel o corteza y los segmentos o cascos (**Figura 1**). La corteza a su vez está formada por el epicarpio y el mesocarpio (mesocarpio externo y mesocarpio interno) que forman la parte coloreada de la corteza, la cual recibe el nombre de flavedo.

El mesocarpio interno es de color blanco, de allí el nombre de albedo. En algunas variedades el mesocarpio interno está coloreado de amarillo a rosa pálido. El endocarpio está constituido por los cascos o segmentos. Los haces vasculares conductores del agua y los nutrientes, que existen en la corteza y en el eje central del fruto no penetran en el interior de los segmentos, excepto aquellos que partiendo del eje central, alimentan en un principio a los rudimentos seminales y después a las semillas [8].



**Figura 1.** Esquema del corte transversal de un cítrico [8].

- Flavedo

Los pigmentos y aceites esenciales son las sustancias más importantes contenidas en el flavedo.

- Pigmentos: Los que le dan color amarillo o anaranjado a los cítricos son los carotenoides.

Los pigmentos carotenoides presentes en la corteza de los cítricos son: caroteno, xantofila y en menor cantidad criptoxantina. Las sustancias que colorean de rojo la pulpa y corteza de las naranjas sanguíneas son antocianos. Cualquier circunstancia que como el frío, detenga o modere el proceso biológico de la maduración, acelera la producción de este tipo de pigmentos [8].

- Aceites esenciales: La concentración de esencias contenidas en la corteza de los frutos y en las hojas de las plantas cítricas es muy inconstante, dependiendo de factores como la variedad, el estado del fruto, el grado de madurez, el tamaño, la etapa vegetativa de las plantas, las condiciones de almacenamiento y los métodos de extracción.

La esencia de la naranja está constituida por un terpeno, el limoneno, en proporción del 90 al 97%, por un conjunto de sustancias oxigenadas en proporción del 1 al 1,5% y trazas de antranilato de metilo. Así mismo la esencia del limón, la mandarina, el pomelo, la toronja, es fundamentalmente constituida por terpenos y sesquiterpenos, siendo el más importante el limoneno [8].

- Albedo

En estado fresco contiene 75 a 80% de agua. La materia seca del mismo fruto a la madurez está compuesta por: 44% de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa), 33% de celulosa, 20% de sustancias pécticas. Además contiene glucósidos y ácido ascórbico en cantidad apreciable.

La pectina tiene la particularidad de absorber agua y transportarla a las células que más la necesitan cuando el fruto está aún joven.

En las naranjas existen dos principios preamargos: La limonina en la naranja de jugo y la isolimonina en las de ombligo; ambas presentes en el albedo en forma no amarga, pero debido a su solubilidad en agua, se incorporan en el jugo al ser extraído y en este que es un medio ácido se hidrolizan formando un compuesto amargo. El principio amargo de la toronja es el glucósido naringina presente en el albedo [8].

- Endocarpio

La pulpa de algunos cítricos y por lo tanto el jugo, tienen color amarillo más o menos verdoso como en los limones, cidras, toronjas, limas; mientras que en las naranjas y mandarinas el color varía de anaranjado a rojo.

El color de la pulpa y el jugo se debe fundamentalmente a los carotenoides. El color rosado de algunas toronjas es debido al licopeno y el color asalmonado de otras se debe al  $\beta$ -caroteno [8].

*Sólidos disueltos:* Están compuestos principalmente por los azúcares y los ácidos en cantidades que varían con los diferentes frutos. En los limones, los ácidos representan la mayor parte de los sólidos disueltos (alrededor de 7% de un total de 9%), mientras que en la naranja los compuestos dominantes son los azúcares (7,5% de un total de 11 a 12%). Además de los azúcares y ácidos el jugo contiene vitaminas, sales, glucósidos, pigmentos, sustancias nitrogenadas, flavonoides, pectinas y enzimas.

- Ácidos: El ácido cítrico es el más importante, existiendo además ácidos málico, oxálico y succínico. En la naranja los principales ácidos son el cítrico y el málico; este último especialmente abundante en las limas dulces.

La acidez del jugo depende de muchos factores: especie, variedad, patrón, suelo, clima, madurez del fruto, posición del fruto en el árbol y prácticas culturales (riego, fertilización). Durante la maduración disminuye el porcentaje de acidez en el jugo, aunque el fruto continúa aumentando de tamaño y por lo tanto la cantidad de jugo, pero la cantidad de ácido cítrico permanece constante, por tanto, su concentración en el jugo disminuye con la maduración al aumentar la cantidad de éste y por consiguiente la dilución de las sustancias disueltas [8].

- Flavonoides: Son los principales metabolitos del género *Citrus*. Son compuestos de bajo peso molecular, se dividen de acuerdo a la presencia de un oxígeno en la posición cuatro, un doble enlace entre los carbonos dos y tres o un grupo hidroxilo en la posición tres del anillo central. Los flavonoides están presentes en casi todas las plantas, fundamentalmente en las partes aéreas, pero varían cualitativamente de una planta a otra. Se han descubierto más de 4.000 y están recibiendo gran atención por parte de la comunidad científica, debido a que se les atribuyen propiedades antiinflamatorias, antioxidante y protectores de vasos sanguíneos. Estas propiedades biológicas los señalan como posibles opciones para el tratamiento de enfermedades vasculares.

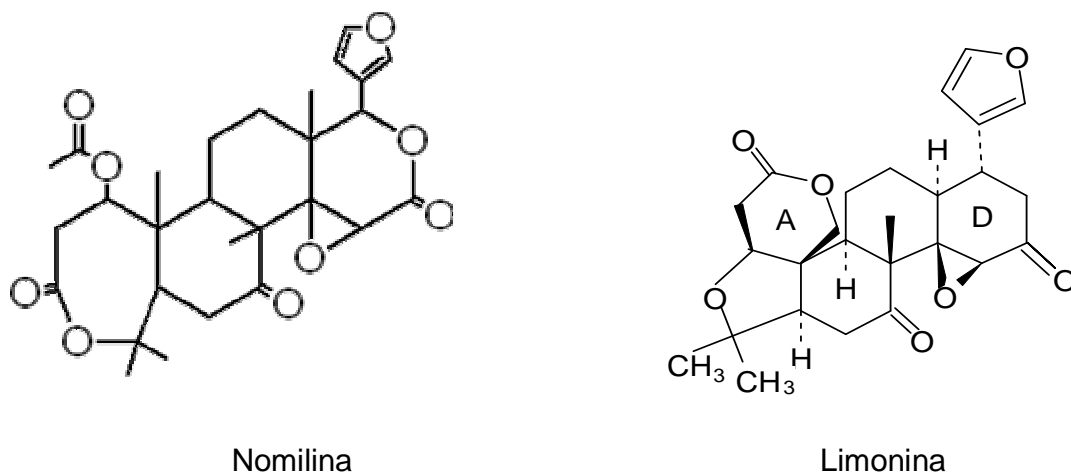
Otros metabolitos importantes en los cítricos son las cumarinas, que tienen un amplio espectro de actividades biológicas, incluida la acción antiagregante plaquetaria [9].

## **1.2 DESARROLLO DEL SABOR AMARGO EN JUGOS CÍTRICOS**

El sabor amargo de las frutas cítricas se debe a dos clases de compuestos: los limonoides y los flavonoides [10].

### **1.2.1 Limonoides amargos en frutas cítricas**

Los limonoides son triterpenos altamente oxigenados presentes en las Rutáceas y otras plantas como las Meliáceas. Se han aislado alrededor de 36 limonoides del género *Citrus*, pero los predominantes y los que confieren sabor amargo son la limonina y la nomilina, **Figura 2**.



**Figura 2.** Estructura química de los limonoides amargos en los cítricos [10].

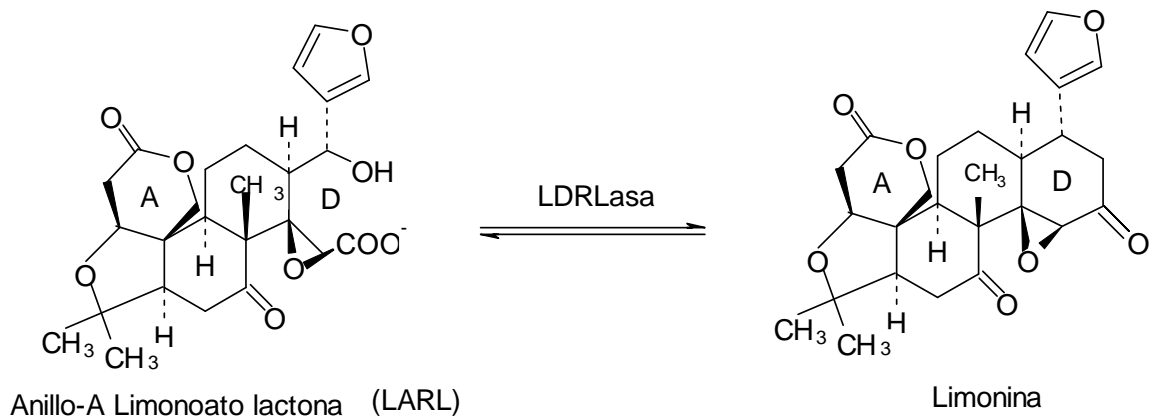
Los limonoides amargos aparecen gradualmente después del procesamiento de las frutas cítricas, efecto conocido como “amargor retardado” [10].

La limonina es el principal representante amargo de los limonoides. Normalmente, los tejidos de las frutas cítricas intactas, contienen un precursor no amargo de la limonina, la sal del ácido limonoico anillo-A lactona (LARL). Sólo cuando las frutas cítricas se maceran, y cuando los jugos obtenidos a partir de ellas se almacenan, la acción combinada de los ácidos del jugo y de la enzima limonoide anillo-D lactona hidrolasa (LDRLasa), transforma el limonoide no amargo, LARL, en limonina, **Figura 3** [11].

Igualmente, el sometimiento de los jugos cítricos al proceso de pasteurización, favorece la formación de limonina con su respectivo sabor amargo [12].

Además del amargor, los limonoides tienen funciones biológicas potenciales: inhiben la carcinogénesis inducida químicamente en ratones, hámster y en las células mamarias, razón por la cual, los investigadores están poniendo énfasis en

rutas alternativas para remover el amargor sin afectar los niveles de limonoides o sus metabolitos [13].



**Figura 3.** Transformación de LARL en Limonina por acción de la LDRLasa [11].

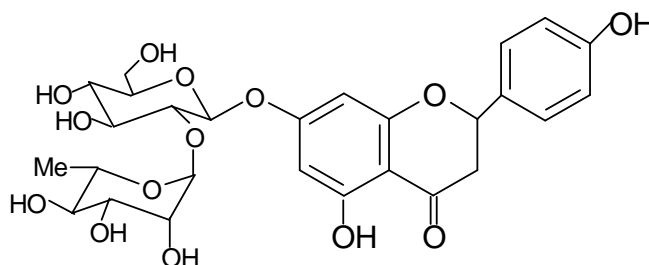
### 1.2.2 Flavonoides en frutas cítricas

Los flavonoides en las frutas cítricas incluyen flavanonas (naringina), flavonas (nobiletina) y flavonoles (quercetina). Las flavonas polimetoxiladas (tangeretina y nobiletina) se concentran en la piel de las frutas inmaduras y son los constituyentes de los aceites amargos de los cítricos. Los flavonoides amargos actúan presentando una actividad bactericida y haciendo la planta desagradable al gusto. Algunos flavonoides son muy amargos mientras que otros no lo son, dependiendo del tipo de cadena glicosídica. La naringina, una flavanona neohesperidósida y la neohesperidina son muy amargas, mientras que la hesperidina es insípida. Por otro lado, la neohesperidina dihidrochalcona es intensamente dulce [2]. En la **Tabla 1.** [9] se mencionan los flavonoides más abundantes en cada una de las frutas cítricas.

**Tabla 1.** Flavonoides predominantes en los cítricos

Cítrico	Flavonoides
Mandarina	Hesperidina Diosmina
Naranja amarga	Naringina Neohesperidina
Naranja dulce	Hesperidina Narirutina Didimina
Toronja	Naringina Narirutina Hesperidina
Limón	Rutina Hesperidina Diosmina

### Naringina

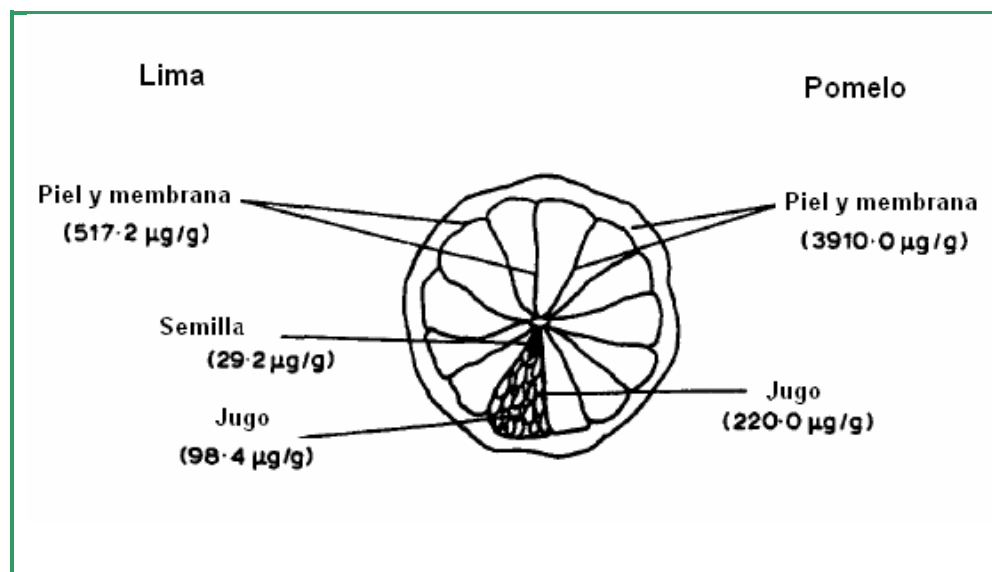


**Figura 4.** Estructura química de la naringina, (4',5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglucósido)

La naringina (**Figura 4**) es una flavanona glicosídica que se extrae de la cáscara de algunos cítricos (*Citrus paradisi*, *Citrus aurantium*) y es el principal responsable de su sabor amargo. Está presente también en la pulpa de los frutos, en hojas,

flores y semillas de la planta [14]. Algunos estudios sugieren que la biosíntesis de naringina, como la de otras flavanonas, está influenciada por factores ambientales y genéticos, determinando variaciones en los niveles de concentración de estos compuestos [15].

La concentración de naringina depende de la madurez de los cítricos, siendo abundante en las frutas inmaduras [14]. Su concentración en el jugo de toronja oscila entre 400 y 1200 ppm [3] y se estima que el rango de concentración de la naringina en el jugo de tangerina es de 0,5-1,2 ppm [16]. La piel del pomelo y de la lima contienen mayor concentración de naringina (3910  $\mu\text{g/g}$  y 517,5  $\mu\text{g/g}$  peso fresco, respectivamente) que las pulpas de dichas frutas (200,0  $\mu\text{g/g}$  y 98,4  $\mu\text{g/g}$  peso fresco, respectivamente), **Figura 5** [16].



**Figura 5.** Distribución de naringina en el pomelo y en la lima [16].

La naringina es el flavonoide que contribuye en mayor medida a dar sabor amargo a los jugos comerciales de pomelo, toronja y naranja trifoliada, lo que ha dado lugar a estudios tanto sobre la caracterización de éstos según su concentración de

naringina, como sobre la posible neutralización de su sabor en dichos productos alimenticios [14].

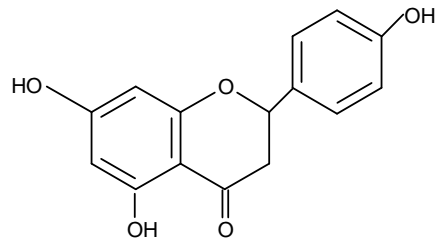
El amargo centro fibrovascular de los cítricos, a pesar de representar una pequeña parte de la fruta entera, contiene la más alta concentración de naringina. Además, la pulpa de las frutas extrae rápidamente flavanonas de sus membranas. Razón por la cual se concluye que las diferencias en el amargor de los jugos cítricos se relacionan con su método de extracción [17].

El umbral de sabor de la naringina en agua es de aproximadamente 20 ppm, pero pueden detectarse niveles de 1,5 ppm [5].

La naringina se usa en perfumería y para dar sabor a golosinas, bebidas y productos de panadería, actualmente su estudio sigue vigente por su propiedad antioxidante, como estabilizante de aceites, antimutagénico, y como precursor del compuesto naringina dihidrochalcona por su importante capacidad endulzante [15].

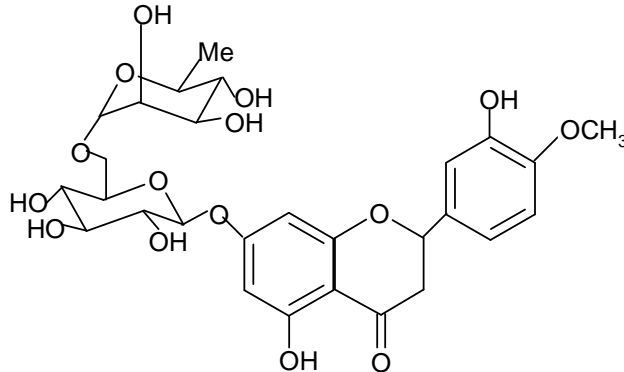
La naringenina (**Figura 6**) es la aglicona no amarga de la naringina. Está presente en el jugo de toronja en concentraciones muchos menores que su glucósido, se forma en el intestino grueso por hidrólisis de la naringina después de su ingestión oral [18], por acción de las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y  $\alpha$ -ramnosidasa, producidas por bacterias gastrointestinales como las *Bacteroides* JY-6, *Streptococcus faecium* VGH-1 y el linaje FRP-17 de *Streptococcus* sp. y *Escherichia coli* HGH21 y HGH6 [19].

La naringenina presenta efectos benéficos en el organismo, actúa como agente quimiopreventivo de cáncer, como inhibidor mutagénico y posee propiedades hipocolesterolémicas, ya que reduce el nivel de colesterol de baja densidad en el plasma [19].

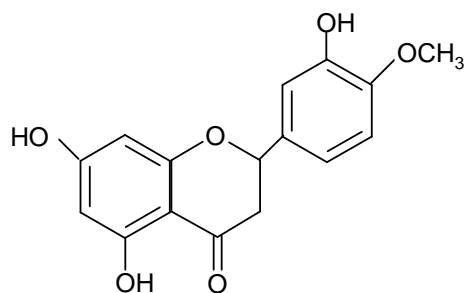


**Figura 6.** Estructura química de la naringenina

Se ha demostrado la capacidad de la naringina, naringenina, hesperidina y hesperetina (**Figuras 7- 8**) de las cáscaras de cítricos para inhibir la agregación plaquetaria estimulada por colágeno en el plasma humano rico en plaquetas. Además, los flavonoides mencionados previenen la ocurrencia de cambios ateroscleróticos como la aparición de estrías gradas en las aortas, la expresión de la molécula de adhesión vascular y de la proteína quimiotáctica de monolitos [9].



**Figura 7.** Estructura química de la hesperidina  
(3',5,7-trihidroxi-4-metoxi-flavanona-7-ramnoglicósido)



**Figura 8.** Estructura química de la hesperetina

### 1.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS EN LA DETERMINACIÓN DE FLAVANONAS EN LAS FRUTAS CÍTRICAS.

Debido a que el amargor es un obstáculo para el aprovechamiento comercial de los derivados cítricos, se han reportado varios procedimientos para la determinación de naringina:

**Prueba de Davis:** Es un método colorimétrico que usa dietilenglicol alcalino para la determinación de naringina y otras flavanonas presentes en los cítricos. La adición de una solución concentrada de hidróxido de sodio a la solución de flavanonas en dietilenglicol permite la formación de un color amarillo estable, cuya intensidad se relaciona con la concentración de flavanonas [17]. Sin embargo, la prueba de Davis no es específica para la naringina, los valores que reporta reflejan la detección de varios compuestos [20].

**Método cromatográfico-fluorométrico:** Procedimiento específico y sensible para la determinación de naringina, naringenina-7-rutinósido, poncirina, isosacuranetina-7-rutinósido, neohesperidina y hesperidina en el jugo de toronja. Consta del aislamiento cuantitativo preliminar de las flavanonas glicosídicas del jugo, utilizando una columna cromatográfica de polivinilpirrolidina, de la separación y purificación adicional de estos glicósidos por cromatografía de capa fina (TLC) y

de la determinación cuantitativa por análisis de fluorescencia de cada flavanona glicosídica individual [21].

**Método con el radical ABTS:** Es un procedimiento colorimétrico para determinar la naringina usando como sustrato de la peroxidasa el ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbencetiazolin-6-sulfónico (ABTS). El método se basa en la reacción de acoplamiento de un catión radical ABTS con un producto de oxidación de la naringina formado por la peroxidasa. Esta reacción de acoplamiento permite la formación de un compuesto púrpura con un máximo de absorción a 560 nm. La menor cantidad de naringina que puede detectarse con este método es 1 nmol. Sin embargo, no se ha reportado la cuantificación de otros flavonoides por este método, ni su especificidad hacia la naringina [22].

**Cromatografía de gases:** Se han detectado algunos flavonoides en su forma aglicona mediante cromatografía de gases acoplada a masas, lo cual es posible mediante la preparación de derivados metil y trimetilsilil de los compuestos a analizar. La derivatización es necesaria para incrementar la volatilidad de los compuestos polifenólicos [23] pero tiene algunas desventajas, ya que incrementa el tiempo de preparación de la muestra e introduce un grado de error en cualquier análisis cuantitativo [24].

**Cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC):** En la actualidad, la cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), es el método analítico comúnmente usado para la identificación y cuantificación de flavonoides. Se han desarrollado varios métodos para el análisis de flavonoides glicosídicos en plantas, en productos alimenticios y en formulaciones farmacéuticas; en dichos métodos se han usado dos tipos de columnas (C8 y C18), así como diferentes mezclas de solventes en la fase móvil, con detección UV-VIS a 280 nm [14, 16, 18, 20, 25-28, 40, 53-56].

En la bibliografía se menciona un método exitosamente aplicado para el monitoreo del proceso de desamargor de los jugos de toronja, mediante la determinación simultánea de naringina y naringenina. La preparación de la muestra se llevó a cabo modificando la polaridad con etanol anhidro, centrifugando y pasando por un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . La separación de los compuestos se logró usando una columna en fase reversa C-18 y utilizando como fase móvil una solución acuosa de acetonitrilo al 30%. El porcentaje de recuperación fue del 88% y el rango de linealidad fue de 20-500  $\mu\text{g/mL}$  para las flavanonas analizadas [28].

#### **1.4 ENZIMAS EMPLEADAS EN LA REMOCIÓN DEL AMARGOR EN LOS JUGOS CÍTRICOS**

La aplicación de enzimas en el procesamiento de jugos de frutas cítricas se ha convertido en una herramienta eficaz para solucionar las dificultades en relación al desarrollo de sabores amargos que afectan su aceptación entre los consumidores. Las enzimas naringinasas y otras enzimas como las pectinasas o los complejos pectinasa/celulasa, se usan en el procesamiento de frutas cítricas para el mejoramiento en el lavado de pulpas, aumento de recuperación de aceites esenciales, remoción de amargor y clarificación de jugos [5].

##### **1.4.1 Naringinasa.**

La naringinasa se ha producido a partir de varios microorganismos (**Tabla 2**), mediante cultivo sumergido y por fermentación en estado sólido [4].

**Tabla 2.** Microorganismos usados en la producción de naringinasa.

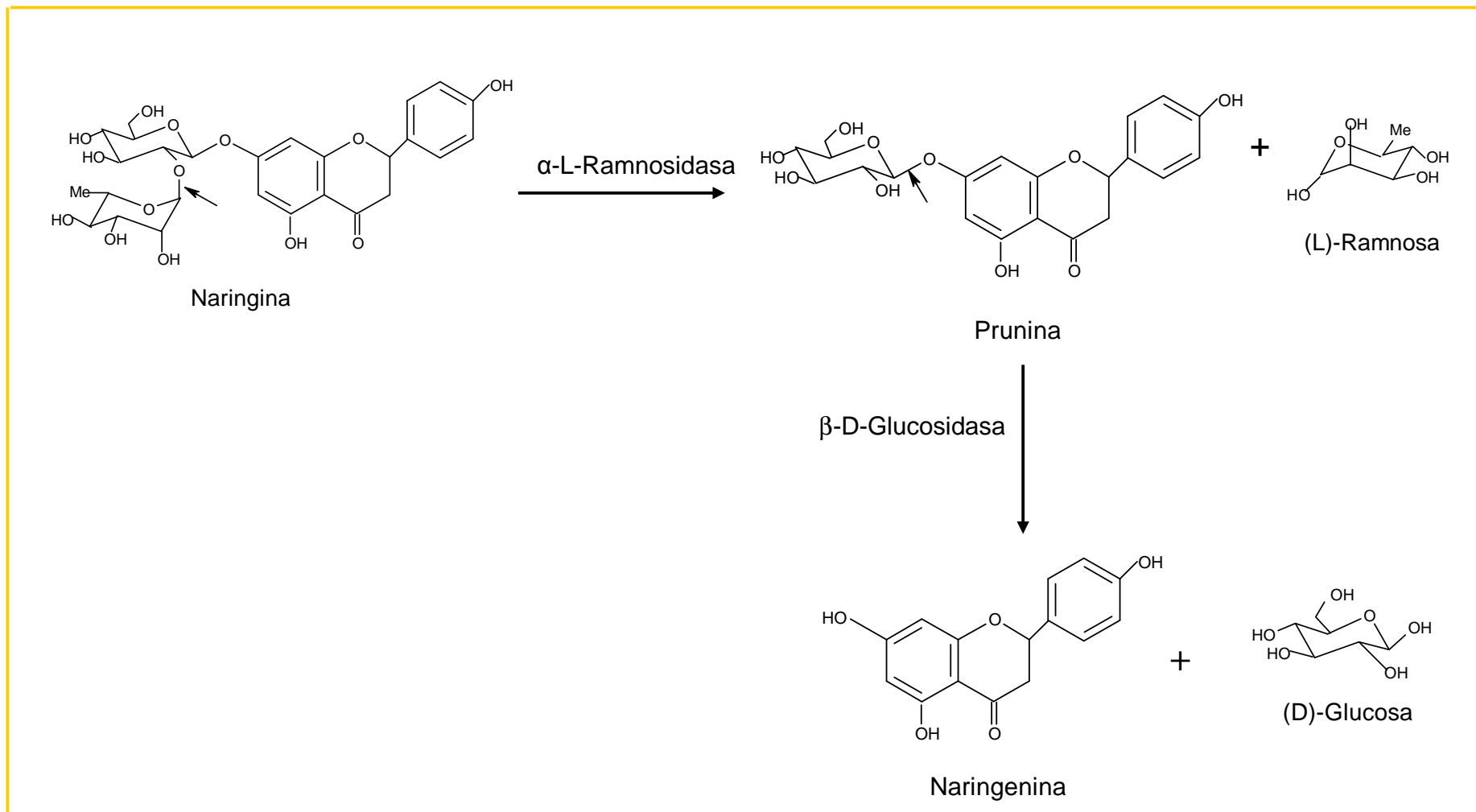
Microorganismo	Referencias
<i>Aspergillus niger, A. oryzae, A. usamii</i>	Bram y Solomons, 1965; Kishi, 1955
<i>Cochiobolus miyabeanus</i>	Ito y Takiguchi, 1970
<i>Coniothyrium diplodiella</i>	Nomura, 1965
<i>Penicillium decumbens</i>	Fukumoto y Okado, 1973
<i>Phanopsis citri</i>	Ito y Takiguchi, 1970
<i>Rhizotonia solani</i>	Ito y Takiguchi, 1970
<i>Rhizopus nigricans</i>	Shanmugam y Yadav, 1995

Se ha caracterizado en algún detalle la naringinasa de varias fuentes. La enzima aislada de *Penicillium sp.* es una glicoproteína que posee ambas actividades:  $\alpha$ -L-ramnosidasa y  $\beta$ -D-glucosidasa. El pH óptimo para las dos actividades fue 4,5 y 3,0 respectivamente. Usando filtración en gel, electroforesis e inmovilización, Schalkhammer y Pittner determinaron la haloenzima y la estructura de la subunidad para esta enzima, también determinaron la existencia de dos sitios catalíticos.

La naringinasa comercialmente disponible de *Aspergillus niger* también tiene ambas actividades:  $\alpha$ -L-ramnosidasa y  $\beta$ -D-glucosidasa. La proporción de estas actividades varía con la concentración de proteína y el pH. La actividad ramnosidasa es casi independiente del pH en el rango de 3-7, mientras que la actividad glucosidasa muestra una distinción óptima que varía entre los pHs 4-6, dependiendo del pretratamiento usado. El complejo enzimático puede separarse en varios oligómeros por filtración en gel. La naringinasa de *A. niger* parece ser una enzima con dos sitios activos, una para cada actividad [5].

### Mecanismo de acción de la naringinasa

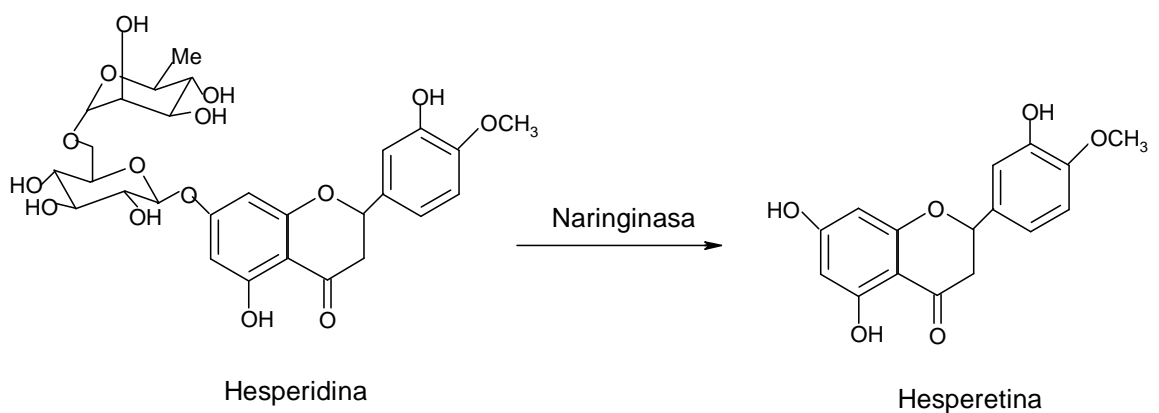
La información disponible no permite elucidar el mecanismo molecular de la acción enzimática. La naringinasa es un complejo enzimático que contiene las actividades  $\alpha$ -L-ramnosidasa y  $\beta$ -D-glucosidasa actuando en forma secuencial. La naringinasa convierte la naringina en naringenina en un proceso de dos pasos. El sustrato naringina (4'-5-7'-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglicósido) es hidrolizado por la actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa para producir prunina (4'-5-7'-trihidroxi-flavanona-7-glicósido) y ramnosa. La prunina es posteriormente convertida por la actividad  $\beta$ -D-glucosidasa en naringenina (4'-5-7'-trihidroxi-flavanona) y glucosa, **Figura 9.** [5].



**Figura 9.** Secuencia del proceso de hidrólisis de naringina por acción de la naringinasa [5].

La naringenina tiene sólo un tercio del amargor de la naringina; sin embargo, la prunina es menos amarga que la naringenina y sólo la primera actividad hidrolítica de la naringinasa es esencial para remover el amargor [5].

La naringinasa también puede actuar sobre la hesperidina para producir el aglicón hesperetina, que posee propiedades edulcorantes, **Figura 10**.



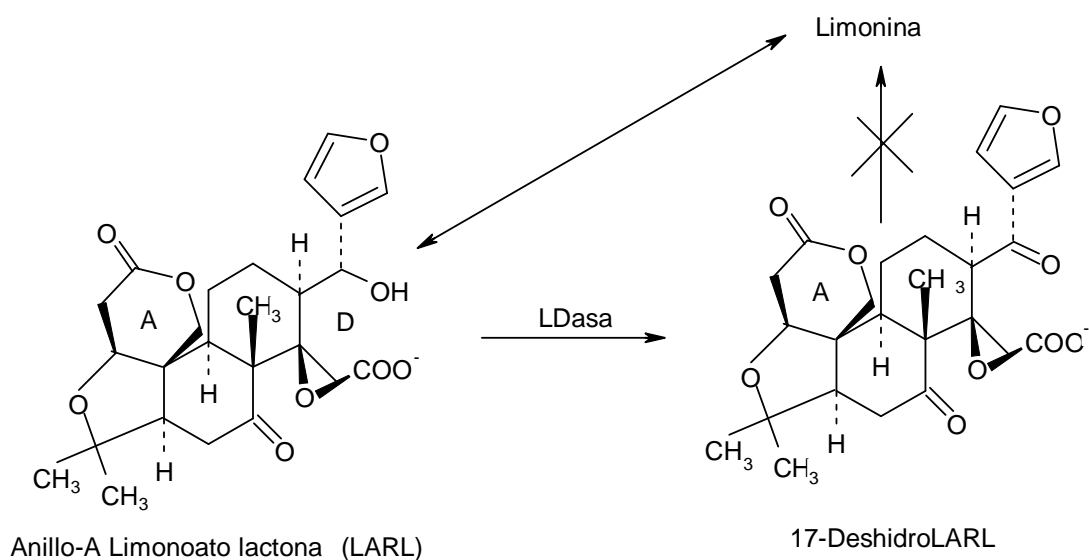
**Figura 10.** Acción de la naringinasa sobre la hesperidina

#### 1.4.2 Limonoide glucosiltransferasa (LGTasa)

La limonoide glucosiltransferasa aislada y purificada del albedo del pomelo y del albedo de la naranja *Navel*, es una enzima que cataliza la transferencia de una unidad de glucosa a los limonoides, convirtiéndolos en compuestos no amargos [13].

### 1.4.3 Limonoato deshidrogenasa (LDasa)

La limonoato deshidrogenasa es una enzima detectada en diferentes especies de microorganismos, puede prevenir la producción de limonina catalizando la oxidación del limonoato anillo A lactona (LARL), el precursor no amargo de la limonina, a su correspondiente 17-dehidrolimonoato, un derivado no amargo que no puede ser convertido en limonina (**Figura 11**). Esta enzima se ha aislado de *Arthrobacter globiformis*, *Pseudomonas sp.* y *Rhodococcus fascians* [29].



**Figura 11.** Producción de 17-deshidrolimonoato anillo A lactona [29].

## 1.5 OTROS MÉTODOS EMPLEADOS EN LA ELIMINACIÓN DEL AMARGOR DE LOS JUGOS CÍTRICOS.

En la industria de cítricos de diversas partes del mundo se han desarrollado varios métodos poscosecha para minimizar el problema de amargor causado por la limonina y por la naringina con el fin de remover, hidrolizar o convertir los componentes amargos en sus derivados no amargos [4].

Para hidrolizar la limonina se ha aislado la enzima limonoato deshidrogenasa (LDasa) a partir de cultivos de *Rhodococcus fascians* [29], y para convertir la limonina en su glucósido no amargo, se ha aislado y purificado la limonoide glucosiltransferasa (LGTasa) del albedo del pomelo y de la naranja *Navel* [13]. Se han investigado las propiedades de estas enzimas tanto en sus formas solubles como inmovilizadas iónicamente sobre DEAE y covalentemente sobre quitosan enlazado con glutiraldehído y sobre carbonato de celulosa [30]. Sin embargo, el pH óptimo de la LDasa (8,0 ó 9,0) dificulta el uso de la enzima en los procesos de desamargor, debido al pH ácido de los jugos cítricos, razón por la cual se han utilizado directamente microorganismos como *Corynebacterium fascians* y *Arthrobacter globiformis*, inmovilizados sobre geles de acrilamida, pero este soporte no es aceptado en el tratamiento de alimentos. Igualmente, se han inmovilizado células de *Rhodococcus fascians* en espumas de poliuretano y se han utilizado células de *Acinetobacter calcoaceticus* directamente en jugos de naranja recién preparados, ésta última reacción sí se pudo llevar a cabo en el pH original del jugo y consiste en la conversión de limonina en un compuesto no amargo: el ácido deoxilimonoico [31].

El nivel de naringina en jugos de toronja ha podido reducirse mediante diferentes tecnologías, como desamargor adsortivo, métodos químicos, tratamientos con

resinas de polidivinilbenceno (PDVB) y tratamientos con  $\beta$ -ciclodextrinas. Estas tecnologías tienen las siguientes limitaciones inherentes [5]:

1. El jugo debe ser previamente desaceitado y despulpado y, después del desamargar los aceites y las pulpas extraídas se mezclan con el jugo clarificado.
2. Las columnas de adsorción son usualmente regeneradas con soluciones alcalinas diluidas y esto afecta las propiedades organolépticas y la calidad final del jugo.
3. Los métodos químicos pueden alterar la composición del jugo por reacciones químicas o por remoción de nutrientes, sabores, colores, etc.
4. Los métodos con resinas y con  $\beta$ -ciclodextrinas no son específicos, remueven por completo otros flavonoides no amargos como la narirutina y la hesperidina. Además, el contenido de vitamina C disminuye hasta en un 33%, y se observa una ligera diferencia en el color del jugo antes y después del desamargar, el jugo es más pálido al final del procedimiento [32].
5. Los métodos de extracción afectan el rendimiento, calidad y características de los jugos cítricos producidos.

Similarmente, bajo condiciones controladas de pH y temperatura, el carbón activado puede remover casi por completo la naringina de una solución, pero a su vez, se remueven muchos de los componentes deseables para el sabor [5].

Se ha descrito un proceso de flujo cromatográfico radial para el desamargar de jugos de frutas. En comparación con la cromatografía convencional, los sistemas de flujo radial son más rápidos y operan a presiones más bajas. La resina cromatográfica en este proceso patentado, captura la naringina a medida que el jugo pasa a través de ella. El jugo procesado tiene los requisitos de consistencia y sabor, y no es amargo, pero este proceso no ha ganado aceptación comercial [5].

Debido a los diversos inconvenientes, la capacidad de las tecnologías no enzimáticas para el desamargor es limitada, y el uso de enzimas está aumentando rápidamente. Además, los procesos enzimáticos minimizan la contaminación durante las reacciones [5].

Se ha usado la naringinasa de *Aspergillus niger* inmovilizada sobre soportes de taninaminohexilcelulosa y quitina con glutaraldehído y borohidruro de sodio y sobre copolímeros de estireno y anhídrido maléico [33].

La naringinasa de *Penicillium decumbens* se ha enlazado covalentemente a la glicofase unida a un vidrio poroso, se ha inmovilizado en fibras de triacetato de celulosa para hidrolizar la naringina y para degradar simultáneamente la limonina [5]. Puri et al. (1996) trabajó sobre el uso de naringinasa de *Penicillium* sp. inmovilizada en alginato para el desamargor del jugo *kinnow*, encontrándose como óptima la que contenía 2% de alginato de sodio. Una preparación con 30 unidades de naringinasa, hidrolizó el 82% de la naringina inicial en 3 horas [34].

Igualmente, la naringinasa de *Penicillium decumbens* se ha inmovilizado en películas de acetato de celulosa, usadas como capas internas en el empaque de los jugos para reducir la concentración de naringina durante el transporte y almacenamiento de los mismos [35].

También se ha utilizado la naringinasa de *Penicillium* sp. en su forma nativa. Para ello se llevó a cabo un diseño factorial completo, usando como variables la concentración de enzima (0,25; 0,5 y 1,0 g/L), la temperatura (25, 30 y 40 °C) y el tiempo de incubación (1, 2 y 4 h). Concluyendo que se requiere una concentración de 1 g/L de naringinasa a 40 °C durante 4 horas para lograr la hidrólisis de naringina en un 75% [36].

## **1.6 ANÁLISIS SENSORIAL EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS.**

La evaluación sensorial es un instrumento de análisis fiable. Permite medir la calidad de los alimentos en función de un conjunto de atributos y cumple una función tanto preventiva como complementaria de los análisis físico-químicos. El objetivo de la evaluación sensorial presentada como sistema de análisis, es el de cuantificar la intensidad y la forma de un estímulo sirviéndose de los sentidos como instrumentos de medida. Los sentidos perciben las propiedades del alimento examinado y esta percepción es comparada a continuación con elementos de referencia ya conocidos que serán utilizados para la evaluación de la intensidad [37].

Los cinco sabores básicos son acidez, dulzor, salinidad, amargor y umami. En este caso nos interesan el dulzor y el amargor. Los receptores para el sabor dulce están localizados hacia la punta de la lengua, los del sabor amargo en su parte posterior, los del gusto salado en los lados hacia la zona externa y los del gusto ácido hacia el centro en la zona interna [37].

Uno de los métodos para llevar a cabo el análisis sensorial de un producto es el estudio de las diferencias menores entre muestras. En él los catadores deben ser capaces de discernir, describir y cuantificar diferencias mínimas entre las muestras. Para ello, el analista prepara una selección de muestras que presenten entre ellas débiles variaciones, por ejemplo, modificando un único ingrediente en la composición, las cuales se presentan sin identificar a los jueces; éstos, deben degustar individualmente las muestras y anotar sus sensaciones [37]

El objetivo general de la presente investigación fue caracterizar los jugos de las variedades cítricas más representativas del departamento de Santander, en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas y contenido de naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina, además, se buscaba evaluar el efecto de la naringinasa comercial soluble sobre el sabor del jugo de mandarina. Por lo anterior, fue necesario estandarizar un método analítico empleando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia –HPLC-, así como la correlación de los resultados obtenidos en el tratamiento enzimático con el análisis organoléptico del jugo.

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

En el desarrollo experimental se emplearon los reactivos, materiales y equipos, que se describen en la Tabla 3.

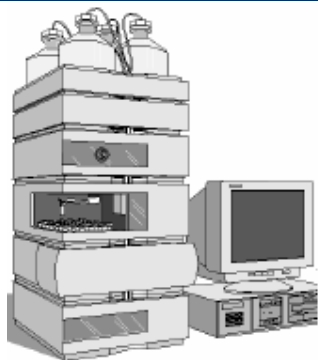
**Tabla 3.** Reactivos, materiales y equipos utilizados

PRODUCTO	ESPECIFICACIONES
<b>Reactivos:</b>	
Naringina	Pureza: 90%; Ref. N 1376. Sigma-Aldrich Cor. St. Louis, MO, USA.
Hesperidina	Pureza: 90%; Ref. 52040. <i>BioChemika</i> , Fluka. Buch, Switzerland.
Naringenina	Pureza: 95%; Ref. 5893. Sigma-Aldrich Cor. St. Louis, MO, USA.
Hesperetina	Pureza: $\geq$ 95%; Ref H. Sigma-Aldrich Cor. St. Louis, MO, USA.
Naringinasa de <i>Penicillium decumbens</i>	Ref. N 1385. Sigma-Aldrich Cor. St. Louis, MO, USA.
Etanol anhidro	Pureza: 99.8%; Lote V5N955116A. Carlo Erba Reagenti.
Agua HPLC	Pureza: 99.9%; Mallinckrodt Baker S.A. México.
Metanol	Pureza: 99.9%; Merck 64271. Darmstadt, Germany.
Ácido acético glacial	Pureza: 99.7%; Lote J21478. J.T. Baker México.
Hidróxido de sodio	Pureza 85%. Cod. 472057. Carlo Erba, Italy.

---

Fenoltaleína	Cód. HS 2932 29 10. Merck, Germany
<b>Material de laboratorio:</b>	
Filtros de jeringa	De 2.5 cm de diámetro, membrana de acetato de celulosa de 0.45µm. Ref. 54134-U Supelco.
Viales	Viales de cabeza de rosca, boca ancha, transparentes, de 2 mL. Ref. 5182-0714. Agilent Technologies.
Tapones de rosca	Rojo, septa de PTFE/goma de silicona roja. Ref. 5182-0719. Agilent Technologies.
Balones aforados	5, 10 y 25 mL; Schott.
Vasos de precipitados	25 y 50 mL; Schott.
Micropipetas	2-20; 10-100 y 100-1000 µL. Brand. Wertheim, Germany.
Bureta	De 25 mL
Tubos de centrifuga	2 mL.
Exprimidor de naranjas industrial	
<b>Equipos de laboratorio:</b>	
Balanza analítica	Mettler Toledo ABZ04-S. Switzerland
Centrífuga	Hettich, Rotoxi-32. Germany.
pH-metro	Schott. United Kingdom.
<b>Análisis instrumental:</b>	
Espectrofotómetro UV-VIS	Perkin-Elmer, modelo Lambda 4B.
HPLC	Cromatógrafo líquido de alta eficiencia, Agilent serie 1100, compuesto por: Bomba cuaternaria con desgasificador, con precisión de flujo <0.3% RSD, pulsaciones <1%, rango de flujo programable en incrementos de 0.001 mL/min, presión de operación de 0-40 MPa. Horno

---



para las columnas basado en el efecto Peltier. Detector UV-Vis de arreglo de diodos DAD para un rango de longitud de onda de 190-950 nm, con anchos de rendija de 1 a 16 nm y exactitud en la longitud de onda de 1 nm o mejor. Muestreador automático con capacidad para 100 muestras.

### Columnas HPLC



ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m). Tamaño de poro 80 A. Área específica 180 m<sup>2</sup>/g. Límite de temperatura 60°C. Rango de pH 2,0-9,0. Carga de carbono 10%. Doblemente desactivada. Ref. 993967-902 del catálogo de Agilent. USA.

SUPELCOSIL LC-8 (250 mm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) Tamaño de poro 120 A. Área superficial 170 m<sup>2</sup>/g. Carga de carbono 6,0%. Ref. 58297 del catálogo de Supelco. USA.

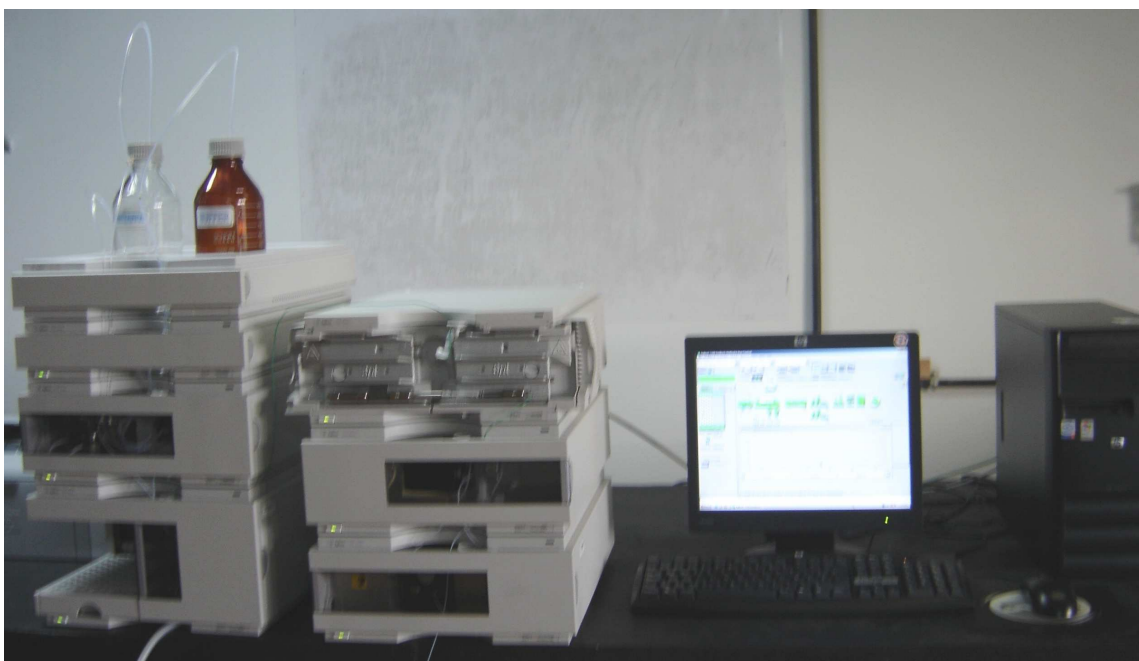
### Precolumna HPLC

SUPELCOSIL LC-8 Supelguard Cartridge. Ref. 59552 del catálogo de Supelco. USA.

---

## 2.2 DESARROLLO DEL MÉTODO POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE NARINGINA, NARINGENINA, HESPERIDINA Y HESPERETINA EN JUGOS CÍTRICOS.

Para la determinación simultánea de las flavanonas naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina, se probaron diferentes condiciones que incluyeron dos columnas, distintos tipos y proporciones de fase móvil, dos temperaturas y diferentes flujos.



### 2.2.1 Pruebas preliminares:

❖ **Selección de la longitud de onda:** Se tomaron espectros ultravioleta-visible de la naringina, naringenina, hesperidina y hesperetina, de 190 a 450 nm, con el fin de establecer las longitudes de onda de máxima absorción para estos compuestos.

❖ **Selección de la columna:** Se evaluaron los dos tipos de columnas mencionados en la **Tabla 6**.

❖ **Selección de la fase móvil:** Se evaluaron las siguientes mezclas de solventes:

- ✓ Acetonitrilo: Agua (20:80) [14]
- ✓ Acetonitrilo: Agua (30:70) [28]
- ✓ Acetonitrilo: Agua (25:75) [33]
- ✓ ACN:H<sub>2</sub>O

Tiempo (min)	0.0	3.0	5.0	6.0	10
% ACN (mL)	20	20	90	20	20

- ✓ ACN:H<sub>2</sub>O el mismo gradiente anterior, pero se adicionaron al agua 0,15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, por litro de agua [38].
- ✓ Metanol: Agua (35:65) [39].
- ✓ Metanol: Agua (40:60) [40].
- ✓ Tetrahidrofurano: Agua: Ácido acético (21:77:2 v/v) [16].
- ✓ A: Acetonitrilo B: Agua: Ácido acético (96:4) [25].

Tiempo (min)	0	12	43	44	49	50	60
% ACN (mL)	0	8	34	70	70	0	0

- ✓ ACN:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 20:76.8:3.2
- ✓ ACN:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 25:72:3
- ✓ CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 35:62.4:2.6
- ✓ CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 38:59.5:2.5
- ✓ CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 38:61:1

❖ **Selección de la temperatura de la fase móvil:** Debido a la relativamente alta viscosidad de las fases móvil utilizadas, la eficiencia puede incrementarse con el uso de temperaturas en el rango de 40-60 °C; sin embargo, el mejor tiempo de vida de la columna se logra cuando se opera a una temperatura  $\leq 40$  °C [41]. Por esta razón sólo se probaron dos temperaturas: 25 °C y 35 °C.

Se seleccionaron las condiciones en las cuales se pudieron determinar simultáneamente la naringina, naringenina, hesperidina, y hesperetina, teniendo en cuenta el tiempo total de análisis, el factor de retención (k), el factor de separación ( $\alpha$ ) y la resolución (R) de los picos cromatográficos, dichos parámetros se determinaron según las siguientes expresiones [42]:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \alpha = \frac{k_B}{k_A} \quad R = \frac{1,18(t_B - t_A)}{(W_{1/2A} + W_{1/2B})}$$

Donde:

$t_R$  = Tiempo de retención del pico de interés;

$t_0$  = Tiempo muerto de la columna;

$W_{1/2}$  = Ancho del pico en la mitad de la altura;

A y B = Picos adyacentes.

Para determinar el tiempo muerto de la columna se preparó una solución de tiourea de 0,5 ppm y se inyectó en el cromatógrafo con y sin columna y precolumna. El tiempo muerto se calculó como la diferencia entre el tiempo que tarda la tiourea en llegar al detector con y sin columna y precolumna [43].

## 2.2.2 Determinación de las figuras analíticas de mérito.

Se determinaron figuras analíticas de mérito, tales como: precisión (expresada como repetibilidad), exactitud (reportada como porcentaje de recuperación), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), linealidad y sensibilidad,

según lo recomendado por la Conferencia Internacional sobre Armonización de requerimientos técnicos para registro de fármacos para uso humano (ICH) [44].

Para la determinación de estos parámetros se realizaron curvas de calibración por los métodos del estándar interno y externo.

**Solución stock:** Se prepararon soluciones stock de 200 ppm de naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina en etanol/agua (50:50).

**Soluciones de trabajo:** Las soluciones de trabajo se prepararon a partir de las soluciones stock.

**2.2.2.1 Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención, tiempos de retención relativos, áreas y áreas relativas.** Se determinaron los tiempos de retención relativos ( $t_{RR}$ ) y las áreas relativas ( $A_R$ ) mediante las siguientes ecuaciones [45]:

$$t_{RR} = \frac{t_{R(i)}}{t_{R(IS)}} \qquad A_R = \frac{A_i}{A_{IS}}$$

Donde:

$t_{R(i)}$ : Tiempo de retención del pico de interés;

$t_{R(IS)}$ : Tiempo de retención del pico del estándar interno (naringina, 70 ppm);

$A_i$ : Área del pico de interés;

$A_{IS}$ : Área del estándar interno (naringina, 70 ppm).

El estudio de la repetibilidad de los  $t_R$ , los  $t_{RR}$ , las  $A$  y las  $A_R$  de las flavanonas se llevó a cabo utilizando los datos obtenidos durante la estandarización interna y externa; cada una de las soluciones de calibración fueron preparadas e inyectadas por duplicado al cromatógrafo líquido.

Para el tratamiento estadístico de los datos se calcularon parámetros de calidad, a saber: promedio ( $\bar{x}$ ), desviación estándar ( $s$ ) y coeficiente de variación (CV, %).

La repetibilidad, medida como CV, se calculó con base en la siguiente relación [46]:

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_r$$

Donde:

$r$  = Repetibilidad, %;

$t = 2.26$  ( $t$  de *Student* para un nivel de confianza de 95%) [46];

$S_r$  = Desviación estándar de la repetibilidad.

**2.2.2.2 Evaluación de la eficiencia del método.** La eficiencia del método desarrollado se evaluó con base en el porcentaje de recuperación, tanto para la cuantificación por estándar interno, como para la cuantificación por estándar externo. Para tal fin, 2mL de jugo de lima tahití se enriquecieron con 10, 30, 15 y 3 ppm de naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina, respectivamente; y 2mL de jugo de mandarina común se enriquecieron con 50, 2 y 2 ppm de hesperidina, naringenina y hesperetina, respectivamente; las flavanonas se extrajeron utilizando el procedimiento descrito en **2.4**. Los experimentos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de recuperación se calculó con base en la ecuación [46]:

$$\% \text{Recuperación} = \frac{C_E - C_{NE}}{C_{SE}} \times 100$$

Donde:

$C_E$  = Concentración de flavanona en la muestra enriquecida;

$C_{NE}$  = Concentración de flavanona en la muestra no enriquecida;

$C_{SE}$  = Concentración de la solución enriquecedora.

**2.2.2.3 Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método.** La linealidad y la sensibilidad del método se evaluaron mediante las curvas de calibración realizadas con 10 niveles de concentración, el doble de lo mínimo recomendado (5 concentraciones) por ICH [44]. Las curvas de calibración por estándar externo se obtuvieron en los intervalos de 2,5-130ppm; 2,5-70ppm; 0,5-20ppm y 0,5-15ppm para la naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina, respectivamente. Las curvas para la calibración por estándar interno se obtuvieron en los intervalos de 2,5-120 ppm para la naringenina y de 2,5-130ppm para la hesperidina y la hesperetina. La linealidad del método se reportó como el cuadrado del coeficiente de correlación, y la sensibilidad como el coeficiente angular o la pendiente de la curva de calibración a un límite de confianza determinado, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$b \pm t S_b$$

Donde:

$t = 2,31$  (t de Student para un nivel de confianza del 95%) [46];

$S_b$  = Desviación estándar de la pendiente de la línea de regresión, representa la precisión de la curva de calibración, se calculó utilizando el software de estadística, STATGRAPHICS 4.0.

**2.2.2.4 Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para las flavanonas analizadas.** Se determinaron los límites de detección y de cuantificación según lo propuesto por la US Environmental Protection Agency (US EPA) [47].

*Límite de detección:*

- Se determinó la relación señal a ruido (S/N) para soluciones diluidas de cada flavanona, hasta obtener una relación igual a 5; dicha relación se obtuvo para concentraciones de 0,18; 0,19; 0,18 y 0,20 ppm para la naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina, respectivamente.
- Se realizó una curva de calibración con soluciones de 0,02; 0,10; 0,20; 0,30 y 0,40 ppm para la naringina, hesperidina y naringenina; y de 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 y 0,50 ppm para la hesperetina.
- Se calculó por regresión lineal la pendiente de la recta (b), el intercepto (a) y el coeficiente de correlación (r), para las curvas de calibración.
- Con base en los valores de la pendiente y del intercepto, se calculó la respuesta predicha (y) para cada estándar.
- Se calculó el error asociado con cada medida  $|y_i - y_l|$ .
- Se calculó el cuadrado de los errores para cada estándar y la suma de los cuadrados de los errores ( $\sum E^2$ ) para los 5 puntos.
- La raíz principal de los errores al cuadrado (RMSE) se calculó según la expresión:

$$RMSE = \left[ \frac{\sum_{j=1}^n E_j^2}{n-2} \right]$$

- La respuesta predicha en el límite de detección ( $y_L$ ) se calculó como:

$$y_L = a + (3 \cdot RMSE)$$

- La concentración en el límite de detección ( $c_L$ ) se calculó usando la relación:

$$c_L = \frac{3 \cdot RMSE}{b}$$

*Límite de cuantificación:*

La concentración en el límite de cuantificación LOQ, se definió como el doble de la concentración en el límite de detección LOD (LOQ = 2 LOD).

$$c_q = 2 c_L$$

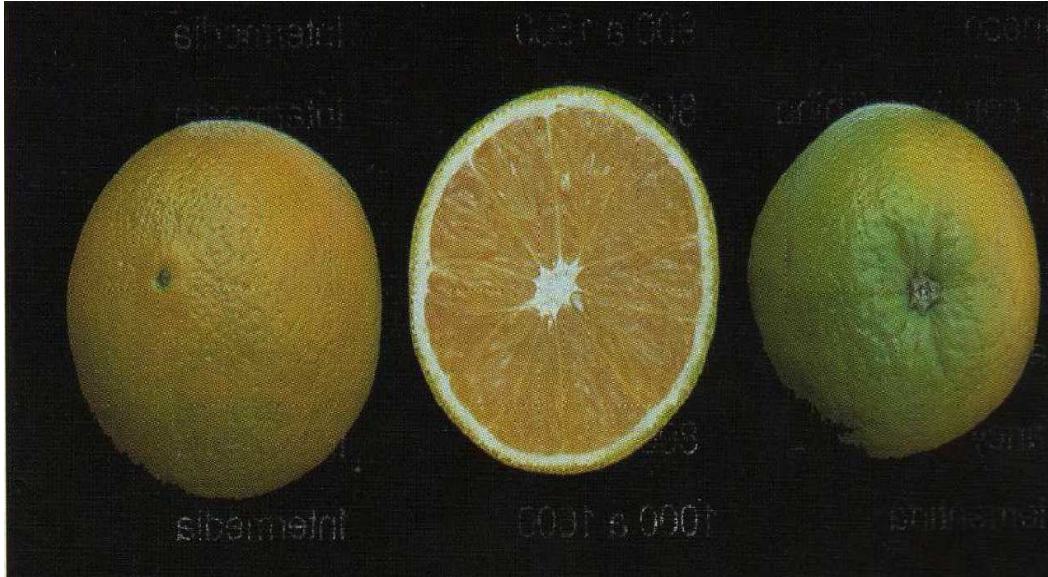
### **2.3 MUESTREO**

Las variedades de cítricos analizadas: mandarina *arrayana*, *onecco*, *clementina* y *común*; naranja *valencia campbell* y *valencia frost*, toronja *ica hático* y *star ruby*, limón *común* y lima *tahití* (**Figura 12**), se recolectaron en la finca La Sabana, ubicada en la vereda Peñas del municipio de Girón, Santander.

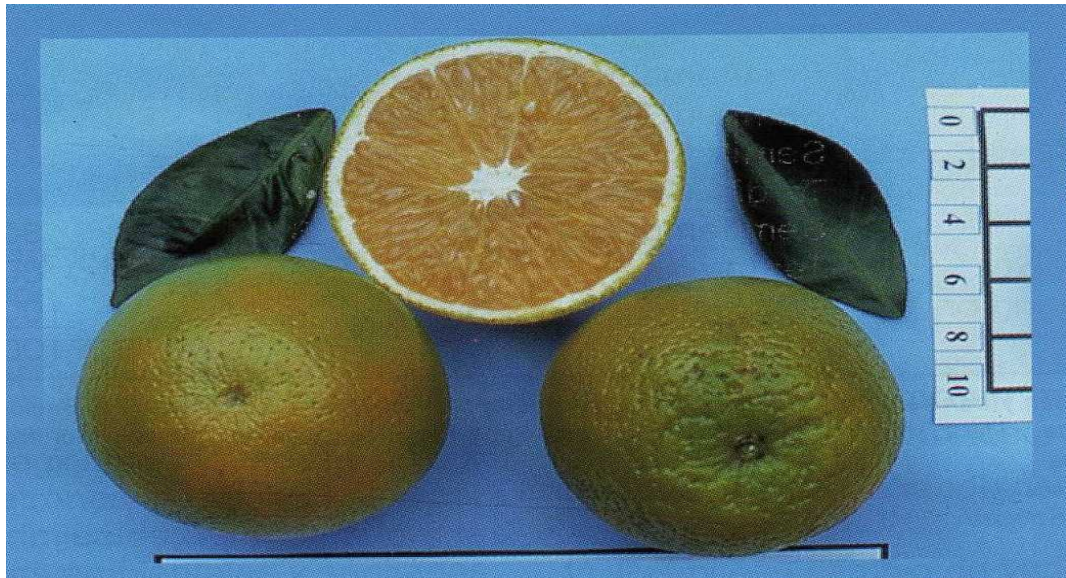
Se cogieron directamente de los árboles 24 frutas de cada variedad, se transportaron al laboratorio, se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio de 200 ppm, se secaron y se almacenaron a 10 °C hasta su procesamiento.

Las frutas escogidas tenían textura firme, color uniforme y no presentaban signos de deterioro. Además, se les midieron los grados Brix y el pH para controlar que las variedades de cada cítrico tuvieran el mismo grado de madurez.

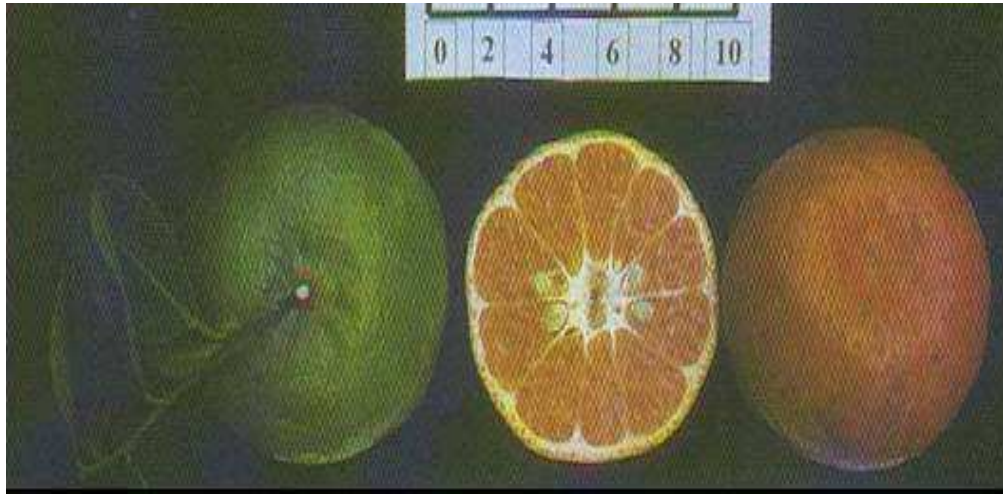
**Figura 12.** Variedades de cítricos analizadas.



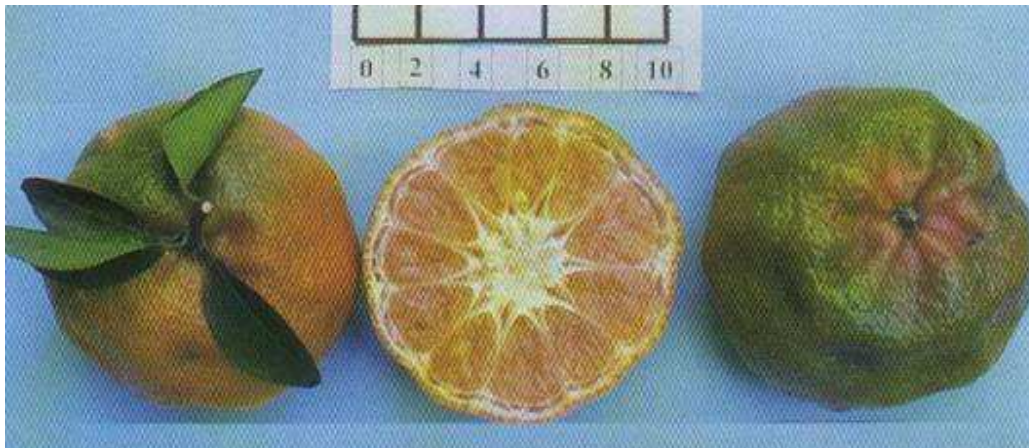
*Naranja valencia campbell*



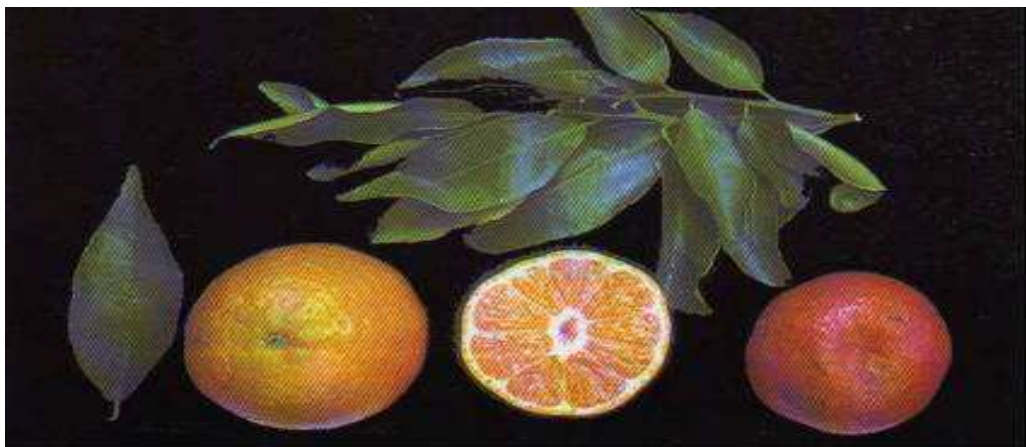
*Naranja valencia frost*



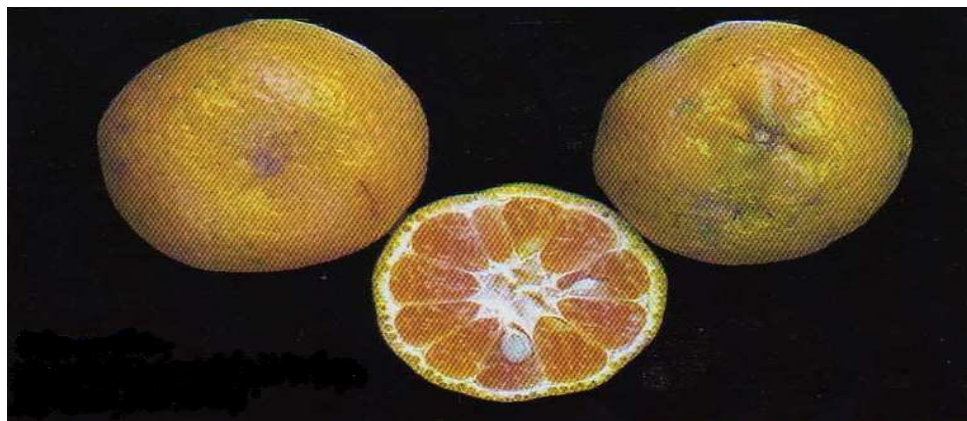
*Mandarina onecco*



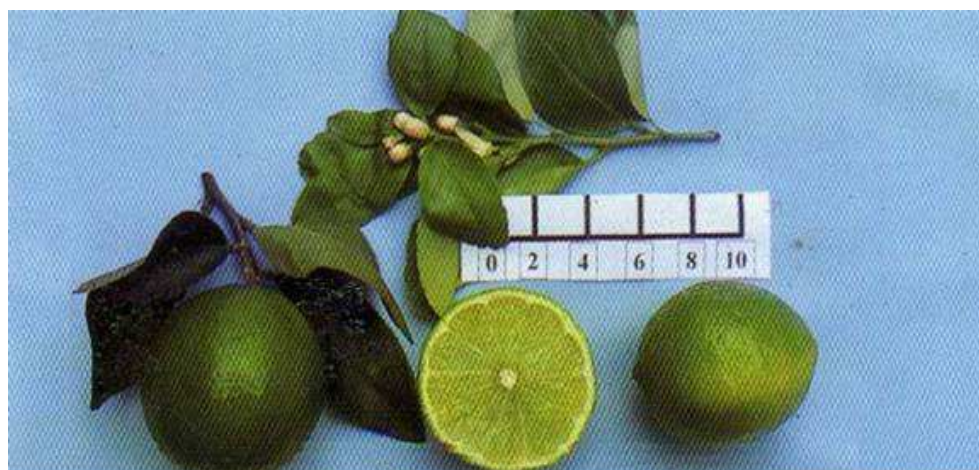
*Mandarina arrayana*



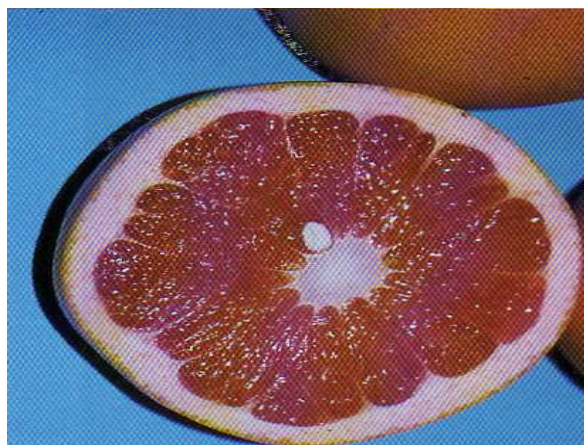
*Mandarina clementina*



Mandarina *común o china*



Lima *ácida tahití*



Toronja *star ruby*

## 2.4 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Con cada variedad de las frutas recolectadas se hizo un cuarteo, y se seleccionaron al azar 5 frutas por triplicado, para su procesamiento y análisis.

Las frutas se partieron en dos y se exprimieron, para la caracterización fisicoquímica se tomarán 20 mL de cada jugo y se siguió el protocolo de las normas referenciadas.

Para la determinación de flavanonas se tomó una alícuota de 2 mL de cada jugo y se le adicionaron 2 mL de etanol anhidro, la solución resultante se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min, el sobrenadante se pasó por un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm y se tomó 1 mL del filtrado para el análisis por HPLC.

## 2.5 CARACTERIZACIÓN DE JUGOS CÍTRICOS

Las muestras de jugos se caracterizaron en cuanto a su composición fisicoquímica, según los parámetros establecidos en la NORMA ICONTEC 404, de la siguiente manera [48]:

- pH, por potenciometría, utilizando como referencia la norma AOAC 10.041/84.
- Sólidos solubles, en grados Brix por refractometría, usando la técnica descrita en la norma AOAC 22.024/84, 932.12/90.
- Acidez por volumetría, expresada como porcentaje de ácido cítrico, según la norma AOAC 31.231/84, 942.15/90.

El contenido de naringina, naringenina, hesperidina y hesperetina se determinó por HPLC según el método que se evaluó y estandarizó usando la metodología descrita en la **Sección 2.2**.

## 2.6 ANÁLISIS DE JUGOS CÍTRICOS POR HPLC.

### 2.6.1 Análisis cualitativo.

Se obtuvieron cromatogramas de los jugos cítricos con el fin de determinar las flavanonas presentes en cada uno de ellos, y de esa manera establecer el método de cuantificación.

### 2.6.2 Análisis cuantitativo.

La cuantificación de naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina en los jugos analizados, se hizo por el método del estándar externo, y la cuantificación en el jugo de mandarina sometido al tratamiento enzimático, se hizo por el método del estándar interno, las mediciones se hicieron por triplicado.

La cuantificación por estándar externo se hizo de la siguiente manera:

Para una ecuación de la recta de la forma:  $Y = bx + a$

$$X = \frac{Y - a}{b}$$

Donde:

X = Concentración de flavanona en la muestra;

Y = Respuesta del detector;

a = Ordenada en el origen;

b = Pendiente de la recta de regresión.

El resultado se reportó con su respectiva desviación estándar

$$X \pm S_x$$

La cuantificación por estándar interno se realizó utilizando la siguiente ecuación [49]:

$$C_i = \frac{A_i}{A_{IS}} \times C_{IS}$$

Donde:

$C_i$  : Concentración del analito de interés;

$A_i$  : Área del analito de interés;

$C_{IS}$ : Concentración del estándar interno (naringina 70 ppm);

$A_{IS}$ : Área del estándar interno.

## 2.7 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA NARINGINASA EN EL JUGO DE MANDARINA.

Teniendo en cuenta que a nivel industrial los procesos sin control de temperatura son mucho más económicos que aquellos en los que se eleva la temperatura, se hizo una prueba por triplicado realizando el tratamiento enzimático a 40°C, según lo reportado en la bibliografía, pero se obtuvo el mismo resultado que al realizar el tratamiento sin control de temperatura, por esta razón se decidió realizar todo el proceso de análisis del efecto enzimático a temperatura ambiente.

El jugo de mandarina *común* recién exprimido, se trató con una solución de naringinasa de acuerdo al procedimiento descrito a continuación:

A. Se preparó una solución de naringinasa de 10 mg/mL en buffer de acetato de sodio, 0,1 M y pH 4.0 [49].

B. Se agregaron 20 µL de solución enzimática a 2 mL de jugo de mandarina, la enzima se dejó actuar durante, 15, 30, 45,60, 120 y 180 min.

D. Al cabo de los tiempos establecidos, se detuvo la reacción, agregando 2 mL de etanol anhidro al sistema de reacción.

C. Se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se pasó por un filtro de acetato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  [49].

D. Se pasaron 650  $\mu\text{L}$  del sobrenadante filtrado a un vial, y se les agregaron 350  $\mu\text{L}$  de una solución de naringina (estándar interno) de 200 ppm, la solución resultante se analizó por HPLC.

E. Paralelamente se analizó un blanco de jugo.

La conversión, medida como la desaparición de sustrato, se calculó con base en la ecuación [50]:

$$X = \frac{S_o - S_f}{S_o} \times 100$$

Donde:

X = Porcentaje de conversión;

S<sub>o</sub> = Concentración inicial de hesperidina;

S<sub>f</sub> = Concentración final de hesperidina.

### **Determinación de la actividad específica de la enzima.**

Con los resultados obtenidos para la conversión de sustrato, se realizó la gráfica de concentración de hesperidina vs. tiempo, y con la pendiente de la parte lineal de la curva se calculó la actividad volumétrica de la naringinasa [50]:

$$AV = \frac{U}{v} = \frac{S}{t \times v}$$

Donde,

AV = Actividad volumétrica,  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$ ;

U = Actividad enzimática,  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ;

S = Sustrato transformado,  $\mu\text{mol}$ ;

t = Tiempo de reacción, min;

v = Volumen, mL.

La actividad específica se definió como la actividad volumétrica por la concentración de proteína, de acuerdo a la ecuación [51]:

$$A = \frac{AV}{P}$$

Donde:

A = Actividad específica,  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$  proteína;

AV = Actividad volumétrica,  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$ ;

P = Concentración de proteína,  $\text{mg}/\text{mL}$ .

La proteína se determinó por el método colorimétrico de Bradford [52].

## 2.8 ANÁLISIS SENSORIAL

### **Reconocimiento de los sabores básicos.**

Ésta prueba se desarrolló siguiendo los métodos ASTM (1981) [37]. Para Los sabores primarios se presentaron a los catadores soluciones de: sacarosa (2%), ácido cítrico (0,07%), cloruro sódico (0,2%) y cafeína (0,07%). La cantidad a presentar en cada muestra fue de 25 mL. Al final de la prueba, el analista identificó las soluciones y los catadores se invitaron a probar las soluciones de nuevo, con el fin de que se familiarizaran con los sabores.

### **Discriminación entre los diversos niveles de una propiedad.**

Se presentaron a los catadores 4 muestras de cafeína y de sacarosa que variaron en concentración en un orden aleatorio. La tarea del catador consistió en clasificarlas por orden creciente de intensidad. Se utilizaron soluciones de cafeína y de sacarosa en concentraciones de 0,1, 0,15, 0,22 y 0,34 g/L [37].

### **Determinación de la precisión sensorial de los sujetos.**

Se utilizaron soluciones acuosas diluidas de cafeína y de sacarosa para establecer las diferencias de umbral de los sujetos, por ejemplo, los umbrales de detección, de reconocimiento y de diferenciación. Las soluciones se presentaron por orden de concentración creciente, separadas por un factor constante [37].

Los catadores tomaron cada uno de los recipientes que contenían 15 mL de la solución, probaron el contenido y anotaron inmediatamente en un formulario, bien la ausencia de sensación, o bien las sensaciones gustativas percibidas, de la manera siguiente: **0** para la ausencia de percepción, **X** percepción de sabor, **XX** reconocimiento del sabor (debe indicar el nombre del sabor) y **XXX** apreciación de la diferencia de concentración. A continuación, se esperó 1 minuto para la degustación de la solución siguiente, de modo que la persistencia del sabor en la boca hubiera desaparecido. Por la misma razón, debieron enjuagarse la boca con agua.

Las concentraciones para la cafeína en (g/100mL) fueron: 0,0000, 0,0030, 0,0060, 0,0090, 0,0120, 0,0150, 0,0180. Las concentraciones para la sacarosa en (g/100mL) fueron: 0,00, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60 [37].

### **Estudio de las diferencias menores entre muestras.**

Se presentó una gama de sabores de mandarina: zumo recién exprimido y zumos de mandarina de diferentes marcas. Estos jugos se presentaron sin identificar a los catadores, éstos debieron degustar individualmente las muestras y anotar sus sensaciones. Una discusión de grupo siguió a la degustación, al mismo tiempo que se reveló la identidad de las muestras. Las referencias ayudaron a los catadores a asimilar el concepto de sabor de mandarina. Después de este ejercicio, los catadores debieron adquirir la capacidad de diferenciar los zumos de

mandarina recién exprimidos y los zumos preparados industrialmente con anterioridad.

### **Estudio orientado del amargor en el jugo de mandarina.**

Los catadores recibieron las muestras de jugo de mandarina antes y después del tratamiento enzimático, así como jugos de mandarina recién exprimidos y a ciertos intervalos de tiempo después de exprimirlos. Se les pidió que asignaran a todas las muestras un valor correspondiente a la intensidad de amargor, de la siguiente manera:

0: ausencia

1: apenas perceptible

2: ligero

3: moderado

4: elevado

5: extremo

Los resultados obtenidos fueron tabulados y relacionados con los de HPLC.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 DESARROLLO DEL MÉTODO POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE NARINGINA, NARINGENINA, HESPERIDINA Y HESPERETINA EN JUGOS CÍTRICOS.

##### 3.1.1 Pruebas preliminares:

**Selección de la longitud de onda:** De los espectros ultravioleta-visible tomados en el rango de 190 a 450 nm a soluciones de 5 ppm de cada flavanona, se establecieron las longitudes de onda de máxima absorción (**Tabla 4**), fijándose entonces, dos longitudes de onda, 282,4nm y 290,4nm, donde los 4nm representan la anchura de absorción, es decir, el detector de arreglo de diodos podrá mostrar todo lo que absorba de 280-284nm y de 288-292nm.

**Tabla 4.** Longitud de onda de máxima absorción para cada flavanona.

FLAVANONA	LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA ABSORCIÓN (nm).
Naringina	281
Hesperidina	282
Naringenina	290
Hesperetina	289

Igualmente, se tomó el espectro al solvente de las flavanonas (etanol 50%) para garantizar que no absorbía en esas longitudes de onda.

❖ **Selección de la columna:** Se evaluaron las columnas ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) y SUPELCOSIL LC-8 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) bajo los mismos parámetros cromatográficos, obteniendo mejor resolución con la columna C-18 (**Anexo 1**), además, la mayor longitud de la columna C-8 aumenta el tiempo de análisis y el volumen de solventes utilizados.

❖ **Selección de la fase móvil:** Los resultados obtenidos con los diferentes tipos y proporciones de fase móvil se mencionan en la **Tabla A** del **Anexo 1**. La fase móvil escogida fue MeOH:H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH 35:62,4:2,6; v/v/v.

❖ **Selección de la temperatura de la fase móvil y del flujo:** De acuerdo con los resultados obtenidos, se estableció una temperatura de 35°C, y un flujo de 1.3 mL/min para la corrida cromatográfica.

En la **Tabla B** del **Anexo 1**, se muestran los valores de los factores de retención (k), factores de separación ( $\alpha$ ) y resolución (R), para las condiciones cromatográficas con las cuales se obtuvo la separación de las flavanonas en menos de 20 minutos. El tiempo muerto de la columna fue de 1,15 min (**Anexo1**).

Con base en lo anterior, el método de trabajo seleccionado por presentar los mejores parámetros cromatográficos fue:

Columna: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (15 µm x 4,6 mm x 5 µm).

Fase móvil: MeOH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 35:62,4:2,6; v/v/v.

Temperatura de la fase móvil: 35°C

Flujo: 1,3 mL/min.

### **3.1.2 Determinación de las figuras analíticas de mérito.**

**3.1.2.1 Repetibilidad del método para tiempos de retención, tiempos de retención relativos, áreas y áreas relativas de las flavanonas.** Los valores correspondientes a los tiempos de retención ( $t_R$ ), tiempos de retención relativos ( $t_{RR}$ ), áreas (A), y áreas relativas ( $A_R$ ), y la repetibilidad alcanzada en su medición, se reportan en las **Tablas 5 - 12**.

Los resultados demuestran la precisión del método según Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), que establece repetibilidades de un valor máximo permisible de 2% para los tiempos de retención, y de 10% para las áreas. Por lo tanto, se confirma la idoneidad del sistema analítico para el método desarrollado, dada la buena repetibilidad de los  $t_R$ ,  $t_{RR}$ , A y  $A_r$ .

**Tabla 5.** Evaluación de la repetibilidad del tiempo de retención de la naringina.

Concentración ppm	Tiempo de retención, min			
	t <sub>R</sub>	X	S	CV, %
2,5	4,15	4,15	2,12x10 <sup>-3</sup>	0,06
	4,15			
5	4,15	4,15	1,41x10 <sup>-3</sup>	0,04
	4,16			
10	4,16	4,16	2,12x10 <sup>-3</sup>	0,06
	4,16			
20	4,17	4,17	3,54x10 <sup>-3</sup>	0,10
	4,17			
40	4,17	4,17	2,12x10 <sup>-3</sup>	0,06
	4,18			
60	4,18	4,18	1,41x10 <sup>-3</sup>	0,04
	4,18			
80	4,19	4,19	3,54x10 <sup>-3</sup>	0,10
	4,20			
100	4,20	4,20	2,83x10 <sup>-3</sup>	0,08
	4,20			
120	4,21	4,21	1,41x10 <sup>-3</sup>	0,04
	4,21			
130	4,22	4,22	2,12x10 <sup>-3</sup>	0,06
	4,22			
<b>Repetibilidad, %</b>				<b>Sr = 0,02</b>
				<b>r = 0,07</b>

**Tabla 6.** Evaluación de la repetibilidad del área de la naringina.

Concentración ppm	Área, mAU*s			
	Área	X	S	CV, %
2,5	1,34x10 <sup>1</sup>	1,35x10 <sup>1</sup>	2,90x10 <sup>-2</sup>	0,21
	1,35x10 <sup>1</sup>			
5	2,72x10 <sup>1</sup>	2,72x10 <sup>1</sup>	5,16x10 <sup>-2</sup>	0,19
	2,73x10 <sup>1</sup>			
10	5,58x10 <sup>1</sup>	5,57x10 <sup>1</sup>	1,13x10 <sup>-1</sup>	0,20
	5,57x10 <sup>1</sup>			
20	1,13x10 <sup>2</sup>	1,14x10 <sup>2</sup>	9,66x10 <sup>-2</sup>	0,09
	1,14x10 <sup>2</sup>			
40	2,24x10 <sup>2</sup>	2,24x10 <sup>2</sup>	7,41x10 <sup>-2</sup>	0,03
	2,24x10 <sup>2</sup>			
60	3,40x10 <sup>2</sup>	3,40x10 <sup>2</sup>	4,51x10 <sup>-2</sup>	0,01
	3,40x10 <sup>2</sup>			
80	4,59x10 <sup>2</sup>	4,59x10 <sup>2</sup>	8,99x10 <sup>-2</sup>	0,02
	4,59x10 <sup>2</sup>			
100	5,78x10 <sup>2</sup>	5,78x10 <sup>2</sup>	2,46x10 <sup>-2</sup>	0,00
	5,78x10 <sup>2</sup>			
120	6,95x10 <sup>2</sup>	6,95x10 <sup>2</sup>	4,52x10 <sup>-2</sup>	0,01
	6,95x10 <sup>2</sup>			
130	7,50x10 <sup>2</sup>	7,50x10 <sup>2</sup>	6,90x10 <sup>-2</sup>	0,01
	7,50x10 <sup>2</sup>			
<b>Repetibilidad, %</b>				<b>Sr = 0,99</b>
				<b>r = 0,29</b>

**Tabla 7.** Evaluación de la repetibilidad de los tiempos de retención y de los tiempos de retención relativos de la hesperidina.

Concentración ppm	Tiempo de retención, min			Promedio, min		Desviación estándar, min		CV, %	
	trH	trIS	trR	trH	trR	trH	trR	trH	trR
2,5	4,80	4,17	1,15	4,80	1,15	$2,12 \times 10^{-3}$	$4,20 \times 10^{-3}$	0,04	0,37
	4,80	4,19	1,15						
5	4,80	4,18	1,15	4,79	1,16	$4,95 \times 10^{-3}$	$1,14 \times 10^{-2}$	0,10	0,99
	4,79	4,12	1,16						
10	4,78	4,11	1,16	4,82	1,17	$5,37 \times 10^{-2}$	$3,23 \times 10^{-3}$	1,12	0,28
	4,86	4,16	1,17						
20	4,84	4,16	1,16	4,82	1,16	$2,69 \times 10^{-2}$	$1,73 \times 10^{-3}$	0,56	0,15
	4,80	4,14	1,16						
40	4,80	4,14	1,16	4,84	1,16	$5,02 \times 10^{-2}$	$4,95 \times 10^{-3}$	1,04	0,43
	4,88	4,18	1,17						
60	4,86	4,20	1,16	4,84	1,15	$2,90 \times 10^{-2}$	$5,35 \times 10^{-3}$	0,60	0,46
	4,82	4,19	1,15						
80	4,84	4,18	1,16	4,83	1,16	$8,49 \times 10^{-3}$	$4,38 \times 10^{-3}$	0,18	0,38
	4,83	4,19	1,15						
100	4,80	4,18	1,15	4,80	1,15	$2,83 \times 10^{-3}$	$4,54 \times 10^{-3}$	0,06	0,40
	4,80	4,20	1,14						
120	4,80	4,18	1,15	4,80	1,15	$4,95 \times 10^{-3}$	$3,11 \times 10^{-3}$	0,10	0,27
	4,80	4,16	1,15						
130	4,79	4,19	1,14	4,79	1,15	$1,20 \times 10^{-2}$	$5,20 \times 10^{-3}$	0,25	0,45
	4,80	4,17	1,15						
<b>Repetibilidad, %</b>								<b>Sr = 0,41</b>	<b>Sr = 0,22</b>
								<b>r = 1,29</b>	<b>r = 0,71</b>

**Tabla 8.** Evaluación de la repetibilidad de las áreas y de las áreas relativas de la hesperidina.

Concentración ppm	Área mAU*s			Promedio mAU*s		Desviación estándar, mAU*s		CV, %	
	AH	Ais	AR	AH	AR	AH	AR	AH	AR
2,5	1,69x10 <sup>1</sup>	4,07x10 <sup>2</sup>	4,16x10 <sup>-2</sup>	1,65x10 <sup>1</sup>	4,07x10 <sup>-2</sup>	5,72x10 <sup>-1</sup>	1,31x10 <sup>-3</sup>	3,5	3,23
	1,61x10 <sup>1</sup>	4,05x10 <sup>2</sup>	3,97x10 <sup>-2</sup>						
5	3,33x10 <sup>1</sup>	4,07x10 <sup>2</sup>	8,18x10 <sup>-2</sup>	3,33x10 <sup>1</sup>	8,18x10 <sup>-2</sup>	4,59x10 <sup>-2</sup>	1,82x10 <sup>-5</sup>	0,14	0,02
	3,34x10 <sup>1</sup>	4,08x10 <sup>2</sup>	8,18x10 <sup>-2</sup>						
10	6,21x10 <sup>1</sup>	4,06x10 <sup>2</sup>	1,53x10 <sup>-1</sup>	6,20x10 <sup>1</sup>	1,53x10 <sup>-1</sup>	1,19x10 <sup>-1</sup>	3,86x10 <sup>-4</sup>	0,19	0,25
	6,20x10 <sup>1</sup>	4,06x10 <sup>2</sup>	1,53x10 <sup>-1</sup>						
20	1,24x10 <sup>2</sup>	4,07x10 <sup>2</sup>	3,04x10 <sup>-1</sup>	1,24x10 <sup>2</sup>	3,05x10 <sup>-1</sup>	7,41x10 <sup>-2</sup>	1,12x10 <sup>-4</sup>	0,06	0,04
	1,24x10 <sup>2</sup>	4,07x10 <sup>2</sup>	3,05x10 <sup>-1</sup>						
40	2,47x10 <sup>2</sup>	4,13x10 <sup>2</sup>	5,97x10 <sup>-1</sup>	2,47x10 <sup>2</sup>	5,99x10 <sup>-1</sup>	7,13x10 <sup>-2</sup>	2,34x10 <sup>-3</sup>	0,03	0,39
	2,47x10 <sup>2</sup>	4,11x10 <sup>2</sup>	6,01x10 <sup>-1</sup>						
60	3,61x10 <sup>2</sup>	4,07x10 <sup>2</sup>	8,88x10 <sup>-1</sup>	3,61x10 <sup>2</sup>	8,86x10 <sup>-1</sup>	4,19x10 <sup>-2</sup>	2,66x10 <sup>-3</sup>	0,01	0,30
	3,61x10 <sup>2</sup>	4,08x10 <sup>2</sup>	8,84x10 <sup>-1</sup>						
80	5,00x10 <sup>2</sup>	4,11x10 <sup>2</sup>	1,22x10 <sup>0</sup>	5,00x10 <sup>2</sup>	1,22x10 <sup>0</sup>	9,21x10 <sup>-2</sup>	2,27x10 <sup>-3</sup>	0,02	0,19
	5,00x10 <sup>2</sup>	4,10x10 <sup>2</sup>	1,22x10 <sup>0</sup>						
100	6,02x10 <sup>2</sup>	4,06x10 <sup>2</sup>	1,48x10 <sup>0</sup>	6,02x10 <sup>2</sup>	1,48x10 <sup>0</sup>	1,35x10 <sup>-2</sup>	2,26x10 <sup>-4</sup>	0,00	0,02
	6,02x10 <sup>2</sup>	4,06x10 <sup>2</sup>	1,48x10 <sup>0</sup>						
120	7,46x10 <sup>2</sup>	4,17x10 <sup>2</sup>	1,79x10 <sup>0</sup>	7,46x10 <sup>2</sup>	1,79x10 <sup>0</sup>	6,86x10 <sup>-2</sup>	1,32x10 <sup>-3</sup>	0,01	0,07
	7,46x10 <sup>2</sup>	4,16x10 <sup>2</sup>	1,79x10 <sup>0</sup>						
130	7,71x10 <sup>2</sup>	3,95x10 <sup>2</sup>	1,95x10 <sup>0</sup>	7,71x10 <sup>2</sup>	1,95x10 <sup>0</sup>	1,07x10 <sup>-1</sup>	3,49x10 <sup>-3</sup>	0,01	0,18
	7,70x10 <sup>2</sup>	3,96x10 <sup>2</sup>	1,95x10 <sup>0</sup>						
<b>Repetibilidad, %</b>								<b>Sr = 1,08</b>	<b>Sr = 0,98</b>
								<b>r = 3,45</b>	<b>r = 3,12</b>

**Tabla 9.** Evaluación de la repetibilidad de los tiempos de retención y de los tiempos de retención relativos de la naringenina.

Concentración ppm	Tiempo de retención, min			Promedio, min		Desviación estándar, min		CV, %	
	t <sub>Rn</sub>	t <sub>RIS</sub>	t <sub>RR</sub>	t <sub>Rn</sub>	t <sub>RR</sub>	t <sub>Rn</sub>	t <sub>RR</sub>	t <sub>Rn</sub>	t <sub>RR</sub>
2,5	14,55	4,19	3,47	14,51	3,48	5,37x10 <sup>-2</sup>	4,21x10 <sup>-3</sup>	0,37	0,12
	14,47	4,16	3,48						
5	14,39	4,15	3,47	14,41	3,48	3,68x10 <sup>-2</sup>	1,54x10 <sup>-2</sup>	0,26	0,44
	14,44	4,13	3,49						
10	14,25	4,11	3,47	14,29	3,47	4,53x10 <sup>-2</sup>	8,60x10 <sup>-4</sup>	0,32	0,02
	14,32	4,13	3,47						
20	14,26	4,14	3,44	14,25	3,45	1,63x10 <sup>-2</sup>	1,38x10 <sup>-2</sup>	0,11	0,40
	14,24	4,11	3,46						
40	14,26	4,10	3,48	14,29	3,47	4,24x10 <sup>-2</sup>	4,01x10 <sup>-3</sup>	0,30	0,12
	14,32	4,13	3,47						
60	14,25	4,11	3,47	14,32	3,49	9,90x10 <sup>-2</sup>	2,71x10 <sup>-2</sup>	0,69	0,78
	14,39	4,10	3,51						
80	14,21	4,10	3,47	14,24	3,47	3,96x10 <sup>-2</sup>	7,86x10 <sup>-3</sup>	0,28	0,23
	14,27	4,10	3,48						
100	14,14	4,10	3,45	14,21	3,47	1,01x10 <sup>-1</sup>	2,23x10 <sup>-2</sup>	0,71	0,64
	14,29	4,10	3,48						
110	14,25	4,10	3,48	14,25	3,48	2,12x10 <sup>-3</sup>	2,49x10 <sup>-3</sup>	0,01	0,07
	14,25	4,09	3,48						
120	14,21	4,10	3,47	14,21	3,47	2,83x10 <sup>-3</sup>	1,29x10 <sup>-3</sup>	0,02	0,04
	14,21	4,10	3,47						
<b>Repetibilidad, %</b>								<b>Sr = 0,24</b>	<b>Sr = 0,27</b>
								<b>r = 0,77</b>	<b>r = 0,85</b>

**Tabla 10.** Evaluación de la repetibilidad de las áreas y de las áreas relativas de la naringenina.

Concentración ppm	Área mAU*s			Promedio mAU*s		Desviación estándar mAU*s		CV, %	
	An	Ais	AR	An	AR	AH	AR	An	AR
2,5	3,16x10 <sup>1</sup>	3,73x10 <sup>2</sup>	8,47x10 <sup>-2</sup>	3,21x10 <sup>1</sup>	8,59x10 <sup>-2</sup>	7,75x10 <sup>-1</sup>	1,74x10 <sup>-3</sup>	2,4	2,03
	3,27x10 <sup>1</sup>	3,75x10 <sup>2</sup>	8,71x10 <sup>-2</sup>						
5	6,40x10 <sup>1</sup>	3,75x10 <sup>2</sup>	1,71x10 <sup>-1</sup>	6,43x10 <sup>1</sup>	1,71x10 <sup>-1</sup>	4,71x10 <sup>-1</sup>	4,23x10 <sup>-4</sup>	0,73	0,25
	6,46x10 <sup>1</sup>	3,78x10 <sup>2</sup>	1,71x10 <sup>-1</sup>						
10	1,30x10 <sup>2</sup>	3,82x10 <sup>2</sup>	3,39x10 <sup>-1</sup>	1,29x10 <sup>2</sup>	3,37x10 <sup>-1</sup>	1,86x10 <sup>-1</sup>	3,33x10 <sup>-3</sup>	0,14	0,99
	1,29x10 <sup>2</sup>	3,87x10 <sup>2</sup>	3,34x10 <sup>-1</sup>						
20	2,61x10 <sup>2</sup>	3,76x10 <sup>2</sup>	6,94x10 <sup>-1</sup>	2,63x10 <sup>2</sup>	6,98x10 <sup>-1</sup>	3,45x10 <sup>0</sup>	5,15x10 <sup>-3</sup>	1,31	0,74
	2,66x10 <sup>2</sup>	3,79x10 <sup>2</sup>	7,01x10 <sup>-1</sup>						
40	5,35x10 <sup>2</sup>	3,82x10 <sup>2</sup>	1,40x10 <sup>0</sup>	5,34x10 <sup>2</sup>	1,38x10 <sup>0</sup>	1,27x10 <sup>0</sup>	2,08x10 <sup>-2</sup>	0,24	1,50
	5,34x10 <sup>2</sup>	3,89x10 <sup>2</sup>	1,37x10 <sup>0</sup>						
60	7,93x10 <sup>2</sup>	3,83x10 <sup>2</sup>	2,07x10 <sup>0</sup>	7,97x10 <sup>2</sup>	2,05x10 <sup>0</sup>	5,43x10 <sup>0</sup>	1,93x10 <sup>-2</sup>	0,68	0,94
	8,01x10 <sup>2</sup>	3,92x10 <sup>2</sup>	2,04x10 <sup>0</sup>						
80	1,06x10 <sup>3</sup>	3,90x10 <sup>2</sup>	2,72x10 <sup>0</sup>	1,06x10 <sup>3</sup>	2,71x10 <sup>0</sup>	4,02x10 <sup>-1</sup>	1,43x10 <sup>-2</sup>	0,04	0,53
	1,06x10 <sup>3</sup>	3,92x10 <sup>2</sup>	2,70x10 <sup>0</sup>						
100	1,33x10 <sup>3</sup>	3,94x10 <sup>2</sup>	3,38x10 <sup>0</sup>	1,34x10 <sup>3</sup>	3,36x10 <sup>0</sup>	3,57x10 <sup>0</sup>	2,13x10 <sup>-2</sup>	0,27	0,63
	1,34x10 <sup>3</sup>	3,99x10 <sup>2</sup>	3,35x10 <sup>0</sup>						
110	1,49x10 <sup>3</sup>	4,08x10 <sup>2</sup>	3,65x10 <sup>0</sup>	1,49x10 <sup>3</sup>	3,67x10 <sup>0</sup>	3,19x10 <sup>-1</sup>	3,06x10 <sup>-2</sup>	0,02	0,83
	1,49x10 <sup>3</sup>	4,03x10 <sup>2</sup>	3,69x10 <sup>0</sup>						
120	1,62x10 <sup>3</sup>	3,97x10 <sup>2</sup>	4,08x10 <sup>0</sup>	1,63x10 <sup>3</sup>	4,18x10 <sup>0</sup>	8,73x10 <sup>0</sup>	1,37x10 <sup>-1</sup>	0,54	3,28
	1,63x10 <sup>3</sup>	3,82x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>0</sup>						
<b>Repetibilidad, %</b>								<b>Sr = 0,74</b>	<b>Sr = 0,90</b>
								<b>r = 2,36</b>	<b>r = 2,87</b>

**Tabla 11.** Evaluación de la repetibilidad de los tiempos de retención y de los tiempos de retención relativos de la hesperetina.

Concentración ppm	Tiempo de retención, min			Promedio, min		Desviación estándar, min		CV, %	
	t <sub>Rh</sub>	t <sub>RI</sub>	t <sub>RR</sub>	t <sub>Rh</sub>	t <sub>RR</sub>	t <sub>Rh</sub>	t <sub>RR</sub>	t <sub>Rh</sub>	t <sub>RR</sub>
2,5	18,93	4,21	4,50	18,90	4,51	4,38x10 <sup>-2</sup>	1,54x10 <sup>-2</sup>	0,23	0,34
	18,87	4,17	4,52						
5	18,78	4,11	4,57	18,76	4,53	1,91x10 <sup>-2</sup>	5,56x10 <sup>-2</sup>	0,10	1,23
	18,75	4,18	4,49						
10	18,72	4,19	4,47	18,75	4,49	3,89x10 <sup>-2</sup>	2,15x10 <sup>-2</sup>	0,21	0,48
	18,77	4,17	4,50						
20	18,81	4,18	4,50	18,83	4,50	2,69x10 <sup>-2</sup>	4,22x10 <sup>-3</sup>	0,14	0,09
	18,85	4,19	4,50						
40	18,86	4,18	4,51	18,85	4,51	1,91x10 <sup>-2</sup>	6,09x10 <sup>-3</sup>	0,10	0,14
	18,83	4,18	4,50						
60	18,81	4,16	4,52	18,81	4,53	4,95x10 <sup>-3</sup>	8,89x10 <sup>-3</sup>	0,03	0,20
	18,81	4,15	4,53						
80	18,75	4,17	4,50	18,74	4,50	1,63x10 <sup>-2</sup>	2,97x10 <sup>-3</sup>	0,09	0,07
	18,73	4,16	4,50						
100	18,78	4,16	4,51	18,78	4,51	3,54x10 <sup>-3</sup>	6,84x10 <sup>-4</sup>	0,02	0,02
	18,78	4,16	4,51						
120	18,79	4,17	4,51	18,79	4,51	4,95x10 <sup>-3</sup>	7,32x10 <sup>-3</sup>	0,03	0,16
	18,79	4,16	4,52						
130	18,88	4,19	4,51	18,83	4,49	7,07x10 <sup>-2</sup>	2,22x10 <sup>-2</sup>	0,38	0,49
	18,78	4,20	4,48						
<b>Repetibilidad, %</b>								<b>Sr = 0,11</b>	<b>Sr = 0,36</b>
								<b>r = 0,36</b>	<b>r = 1,15</b>

**Tabla 12.** Evaluación de la repetibilidad de las áreas y de las áreas relativas de la hesperetina.

Concentración ppm	Área mAU*s			Promedio mAU*s		Desviación estándar mAU*s		CV, %	
	Ah	Ais	AR	Ah	AR	Ah	AR	Ah	AR
2,5	3,29x10 <sup>1</sup>	3,70x10 <sup>2</sup>	8,90x10 <sup>-2</sup>	3,29x10 <sup>1</sup>	8,89x10 <sup>-2</sup>	6,23x10 <sup>-2</sup>	1,62x10 <sup>-4</sup>	0,2	0,18
	3,28x10 <sup>1</sup>	3,69x10 <sup>2</sup>	8,88x10 <sup>-2</sup>						
5	5,11x10 <sup>1</sup>	3,70x10 <sup>2</sup>	1,38x10 <sup>-1</sup>	5,11x10 <sup>1</sup>	1,38x10 <sup>-1</sup>	7,55x10 <sup>-2</sup>	2,30x10 <sup>-4</sup>	0,15	0,17
	5,12x10 <sup>1</sup>	3,70x10 <sup>2</sup>	1,38x10 <sup>-1</sup>						
10	1,23x10 <sup>2</sup>	3,80x10 <sup>2</sup>	3,23x10 <sup>-1</sup>	1,23x10 <sup>2</sup>	3,23x10 <sup>-1</sup>	5,01x10 <sup>-2</sup>	2,43x10 <sup>-4</sup>	0,04	0,07
	1,23x10 <sup>2</sup>	3,79x10 <sup>2</sup>	3,24x10 <sup>-1</sup>						
20	2,73x10 <sup>2</sup>	3,74x10 <sup>2</sup>	7,29x10 <sup>-1</sup>	2,73x10 <sup>2</sup>	7,30x10 <sup>-1</sup>	3,98x10 <sup>-2</sup>	4,99x10 <sup>-4</sup>	0,01	0,07
	2,73x10 <sup>2</sup>	3,74x10 <sup>2</sup>	7,30x10 <sup>-1</sup>						
40	5,25x10 <sup>2</sup>	3,81x10 <sup>2</sup>	1,38x10 <sup>0</sup>	5,25x10 <sup>2</sup>	1,38x10 <sup>0</sup>	3,37x10 <sup>-2</sup>	1,25x10 <sup>-3</sup>	0,01	0,09
	5,25x10 <sup>2</sup>	3,82x10 <sup>2</sup>	1,37x10 <sup>0</sup>						
60	7,69x10 <sup>2</sup>	3,88x10 <sup>2</sup>	1,98x10 <sup>0</sup>	7,69x10 <sup>2</sup>	1,98x10 <sup>0</sup>	2,57x10 <sup>-2</sup>	4,39x10 <sup>-3</sup>	0,00	0,22
	7,69x10 <sup>2</sup>	3,89x10 <sup>2</sup>	1,98x10 <sup>0</sup>						
80	1,07x10 <sup>3</sup>	3,91x10 <sup>2</sup>	2,74x10 <sup>0</sup>	1,07x10 <sup>3</sup>	2,74x10 <sup>0</sup>	4,54x10 <sup>-2</sup>	1,05x10 <sup>-3</sup>	0,00	0,04
	1,07x10 <sup>3</sup>	3,91x10 <sup>2</sup>	2,74x10 <sup>0</sup>						
100	1,34x10 <sup>3</sup>	3,87x10 <sup>2</sup>	3,47x10 <sup>0</sup>	1,34x10 <sup>3</sup>	3,47x10 <sup>0</sup>	3,63x10 <sup>-2</sup>	9,77x10 <sup>-4</sup>	0,00	0,03
	1,34x10 <sup>3</sup>	3,87x10 <sup>2</sup>	3,47x10 <sup>0</sup>						
120	1,63x10 <sup>3</sup>	3,86x10 <sup>2</sup>	4,23x10 <sup>0</sup>	1,63x10 <sup>3</sup>	4,24x10 <sup>0</sup>	3,13x10 <sup>-2</sup>	4,85x10 <sup>-3</sup>	0,00	0,11
	1,63x10 <sup>3</sup>	3,85x10 <sup>2</sup>	4,24x10 <sup>0</sup>						
130	1,78x10 <sup>3</sup>	3,79x10 <sup>2</sup>	4,69x10 <sup>0</sup>	1,78x10 <sup>3</sup>	4,68x10 <sup>0</sup>	4,74x10 <sup>-2</sup>	5,21x10 <sup>-3</sup>	0,00	0,11
	1,78x10 <sup>3</sup>	3,80x10 <sup>2</sup>	4,68x10 <sup>0</sup>						
<b>Repetibilidad, %</b>								<b>Sr = 0,07</b>	<b>Sr = 0,06</b>
								<b>r = 0,22</b>	<b>r = 0,20</b>

**3.1.2.2 Evaluación de la eficiencia del método.** Los resultados obtenidos de la evaluación de la eficiencia del método, expresada como porcentaje de recuperación de cada flavanona en los jugos enriquecidos de lima tahití y mandarina común, para las calibraciones por estándar externo e interno, respectivamente, se muestran en la **Tabla 13**.

Los porcentajes de recuperación demuestran la exactitud de la extracción de las flavanonas, según lo recomendado por la literatura, donde se aceptan porcentajes de recuperación en el rango 70-120%.

**Tabla 13.** Evaluación de la eficiencia del método.

**A.** Calibración por estándar interno.

<b>FLAVANONA</b>	<b>C<sub>E</sub><sup>*</sup></b> <b>(ppm)</b>	<b>C<sub>NE</sub><sup>**</sup></b> <b>(ppm)</b>	<b>C<sub>SE</sub><sup>***</sup></b> <b>(ppm)</b>	<b>R, %</b>	<b>x</b>	<b>S</b>	<b>CV,</b> <b>%</b>
	1,94	N.D.	2,0	97			
NARINGINA	1,90	N.D.	2,0	95	95	1,5	1,6
	1,88	N.D.	2,0	94			
	250,97	159,97	100	91			
HESPERIDINA	249,01	161,01	100	88	92	4,0	4,4
	256,38	160,38	100	96			
	4,35	2,51	2,0	92			
NARINGENINA	4,54	2,58	2,0	98	95	3,1	3,2
	4,48	2,60	2,0	94			
	1,72	N.D.	2,0	86			
HESPERETINA	1,76	N.D.	2,0	88	90	5,9	6,5
	1,94	N.D.	2,0	97			

**B. Calibración por estándar externo.**

<b>FLAVANONA</b>	<b>C<sub>E</sub>*</b> <b>(ppm)</b>	<b>C<sub>NE</sub>**</b> <b>(ppm)</b>	<b>C<sub>SE</sub>***</b> <b>(ppm)</b>	<b>R, %</b>	<b>x</b>	<b>S</b>	<b>CV,</b> <b>%</b>
	17,51	7,81	10	97			
NARINGINA	16,99	7,69	10	93	96	2,6	2,8
	17,53	7,73	10	98			
	59,49	32,49	30	90			
HESPERIDINA	63,26	34,16	30	97	93	3,6	3,9
	62,50	34,90	30	92			
	31,24	17,59	15	91			
NARINGENINA	31,48	17,38	15	94	93	2,1	2,2
	32,52	18,27	15	95			
	1,78	N.D.	2,0	89			
HESPERETINA	1,74	N.D.	2,0	87	89	2,5	2,8
	1,84	N.D.	2,0	92			

\* C<sub>E</sub> = Concentración de flavanona en la muestra enriquecida;

\*\* C<sub>NE</sub> = Concentración de flavanona en la muestra no enriquecida;

\*\*\*C<sub>SE</sub> = Concentración de la solución enriquecedora.

**3.1.2.3 Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método.** Los resultados obtenidos para la evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método, mediante las curvas de calibración por estándar interno y externo (**Anexo 2**), se muestran en la **Tabla 14**.

Los coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) son aceptados según la guía de validación de métodos analíticos, y demuestran la linealidad del método bajo los rangos de concentración evaluados (**Sección 2.2.2.3** del Desarrollo Experimental).

Las pendientes indican una alta sensibilidad del método, y sus desviaciones demuestran la precisión de la curva de calibración. Ello permite concluir que el método es aplicable bajo los intervalos de concentración analizados.

**Tabla 14.** Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.

**A.** Calibración por estándar interno.

Flavanona	Hesperedina	Naringenina	Hesperetina
<b>Ecuación</b>	$y = 1,04x + 0,0043$	$y = 2,38x + 4,48 \times 10^{-3}$	$y = 2,49x - 3,97 \times 10^{-2}$
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9998	0,9987	0,9988
<b>Pendiente (b)</b>	1,04	2,38	2,49
<b>s<sub>b</sub></b>	$3,31 \times 10^{-3}$	$2,00 \times 10^{-2}$	$2,07 \times 10^{-2}$
<b>b ± ts<sub>b</sub></b>	$1,04 \pm 7,65 \times 10^{-3}$	$2,38 \pm 4,63 \times 10^{-2}$	$2,49 \pm 4,79 \times 10^{-2}$

**B.** Calibración por estándar externo.

Flavanona	Naringina	Hesperedina	Naringenina	Hesperetina
<b>Ecuación</b>	$y = 5,80x - 3,28$	$y = 6,42x + 2,31 \times 10^{-1}$	$y = 15,63x - 6,90$	$y = 15,30x - 7,12 \times 10^{-2}$
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9999	0,9995	0,9970	0,9996
<b>Pendiente (b)</b>	5,80	6,42	15,63	15,30
<b>s<sub>b</sub></b>	$1,27 \times 10^{-2}$	$3,42 \times 10^{-2}$	$2,02 \times 10^{-1}$	$7,4 \times 10^{-2}$
<b>b ± ts<sub>b</sub></b>	$5,80 \pm 2,93 \times 10^{-2}$	$6,42 \pm 7,85 \times 10^{-2}$	$15,63 \pm 4,67 \times 10^{-1}$	$15,30 \pm 1,71 \times 10^{-1}$

**3.1.2.4 Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para las flavanonas analizadas.** Los criterios utilizados para la determinación de los LOD y de los LOQ se describieron en la **Sección 2.2.2.4** del Desarrollo Experimental. Los límites de detección y de cuantificación estimados se reportan en la **Tabla 15**.

Estudios reportados anteriormente [14, 16, 18, 20, 25-28, 40, 53-56] habían permitido desarrollar métodos para la cuantificación por HPLC de naringenina y hesperidina; de naringina, hesperidina y naringenina; de naringenina y hesperetina; de naringina y naringenina; y de hesperidina, hesperetina y naringenina. El método desarrollado en este trabajo permitió el análisis de las cuatro flavanonas (naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina) en forma simultánea, con mejores límites de detección y cuantificación y en un tiempo de corrida cromatográfica menor que los reportados. Se contribuye de esta manera con la caracterización de jugos cítricos, en cuanto a la determinación de compuestos importantes como las flavanonas.

**Tabla 15.** Límites de detección y de cuantificación para cada flavanona

FLAVANONA	Conc. (ppm)	Área (mAU*s)	r	b	a	Área Teórica (mAU*s)	Área Residual (mAU*s)	RMSE	c <sub>L</sub> (ppm)	c <sub>q</sub> (ppm)
NARINGINA	0,02	3,85x10 <sup>-1</sup>	0,9929	5,38	0,32	4,24x10 <sup>-1</sup>	3,83x10 <sup>-2</sup>	1,12x10 <sup>-1</sup>	0,06	0,13
	0,10	9,33x10 <sup>-1</sup>				8,54x10 <sup>-1</sup>	7,93x10 <sup>-2</sup>			
	0,20	1,42x10 <sup>6</sup>				1,39x10 <sup>6</sup>	2,91x10 <sup>-2</sup>			
	0,30	1,78x10 <sup>6</sup>				1,93x10 <sup>6</sup>	1,51x10 <sup>-1</sup>			
	0,40	2,55x10 <sup>5</sup>				2,47x10 <sup>6</sup>	8,05x10 <sup>-2</sup>			
HESPERIDINA	0,02	2,15x10 <sup>-1</sup>	0,9869	6,87	0,07	2,11x10 <sup>-1</sup>	4,17x10 <sup>-3</sup>	1,97x10 <sup>-1</sup>	0,09	0,17
	0,10	8,19x10 <sup>-1</sup>				7,60x10 <sup>-1</sup>	5,93x10 <sup>-2</sup>			
	0,20	1,49x10 <sup>5</sup>				1,45x10 <sup>6</sup>	4,50x10 <sup>-2</sup>			
	0,30	1,85x10 <sup>5</sup>				2,13x10 <sup>6</sup>	2,84x10 <sup>-1</sup>			
	0,40	3,00x10 <sup>5</sup>				2,82x10 <sup>6</sup>	1,75x10 <sup>-1</sup>			
NARINGENINA	0,02	3,66x10 <sup>-1</sup>	0,9947	12,78	0,07	3,22x10 <sup>-1</sup>	4,41x10 <sup>-2</sup>	2,32x10 <sup>-1</sup>	0,05	0,11
	0,10	1,50x10 <sup>5</sup>				1,34x10 <sup>5</sup>	1,58x10 <sup>-1</sup>			
	0,20	2,40x10 <sup>5</sup>				2,62x10 <sup>5</sup>	2,23x10 <sup>-1</sup>			
	0,30	3,71x10 <sup>5</sup>				3,90x10 <sup>5</sup>	1,95x10 <sup>-1</sup>			
	0,40	5,40x10 <sup>5</sup>				5,18x10 <sup>5</sup>	2,16x10 <sup>-1</sup>			
HESPERETINA	0,10	1,57x10 <sup>5</sup>	0,9940	12,71	0,13	1,40x10 <sup>5</sup>	1,77x10 <sup>-1</sup>	2,55x10 <sup>-1</sup>	0,06	0,12
	0,20	2,66x10 <sup>5</sup>				2,67x10 <sup>5</sup>	5,36x10 <sup>-3</sup>			
	0,30	3,92x10 <sup>5</sup>				3,94x10 <sup>5</sup>	2,60x10 <sup>-1</sup>			
	0,40	5,04x10 <sup>5</sup>				5,21x10 <sup>5</sup>	1,71x10 <sup>-1</sup>			
	0,50	6,74x10 <sup>5</sup>				6,48x10 <sup>5</sup>	2,59x10 <sup>-1</sup>			

### 3.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE JUGOS CÍTRICOS.

Los resultados obtenidos en cuanto a la determinación de pH, °Brix, Índice de acidez como porcentaje de ácido cítrico y vitamina C, se muestran en la **Tabla 16**. Los resultados obtenidos se corresponden con lo reportado para las diferentes especies analizadas. En el caso de las variedades de mandarina se establece que no hay diferencias significativas en cuanto a estos parámetros.

**Tabla 16.** Análisis fisicoquímico de jugos cítricos.

VARIEDAD	pH	°Brix	Índice de Acidez, %*
Lima <i>tahití</i>	2,26±0,04	8,6±0,4	8,31±0,14
Limón <i>común</i>	2,15±0,01	8,7±0,5	7,83±0,09
Naranja <i>valencia campbell</i>	3,56±0,28	8,4±0,4	2,74±0,05
Naranja <i>valencia frost</i>	3,52±0,02	8,6±0,2	2,78±0,10
Toronja <i>ica hático</i>	2,90±0,04	11,0±0,3	4,39±0,11
Toronja <i>star ruby</i>	2,94±0,02	11,1±0,1	4,37±0,08
Mandarina <i>común</i>	3,21±0,05	9,3±0,3	2,34±0,07
Mandarina <i>clementina</i>	3,55±0,03	9,0±0,2	2,30±0,09
Mandarina <i>arrayana</i>	3,50±0,00	8,7±0,7	2,27±0,08
Mandarina <i>onecco</i>	3,26±0,02	9,2±0,2	2,17±0,03

\*Expresada como gramos de ácido cítrico anhidro por 100 mL de jugo.

### 3.3 ANÁLISIS DE JUGOS CÍTRICOS POR HPLC.

#### 3.3.1 Análisis cualitativo.

La **Tabla 17** muestra las flavanonas presentes en los jugos cítricos analizados.

**Tabla 17.** Análisis cualitativo de flavanonas en jugos cítricos.

JUGO	NARINGINA	HESPERIDINA	NARINGENINA	HESPERETINA
MANDARINA	N.D.			N.D.
NARANJA				N.D.
TORONJA				N.D.
LIMÓN				N.D.
LIMA				N.D.

N.D. No detectada.

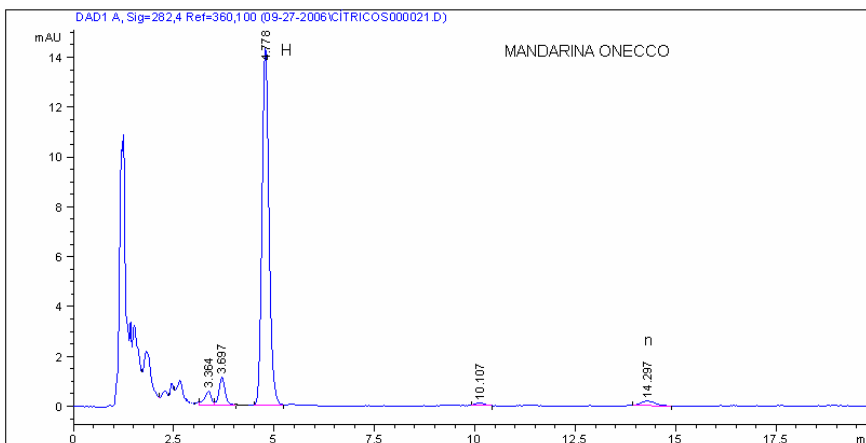
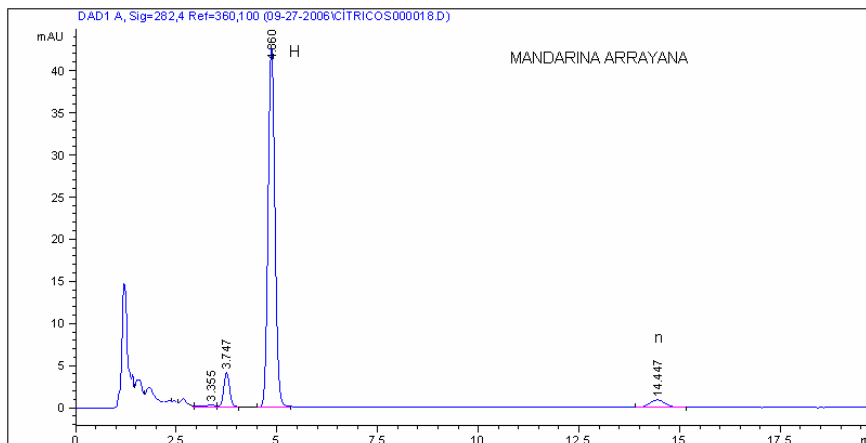
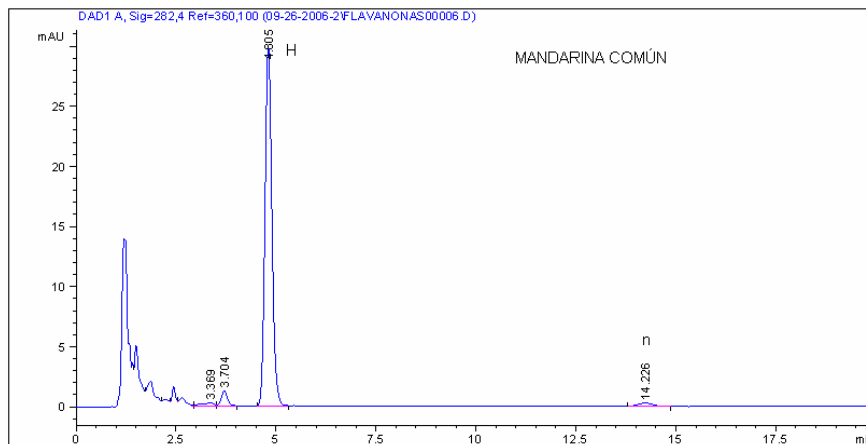
Los jugos de naranja, toronja, limón y lima contienen naringina, hesperidina y naringenina.

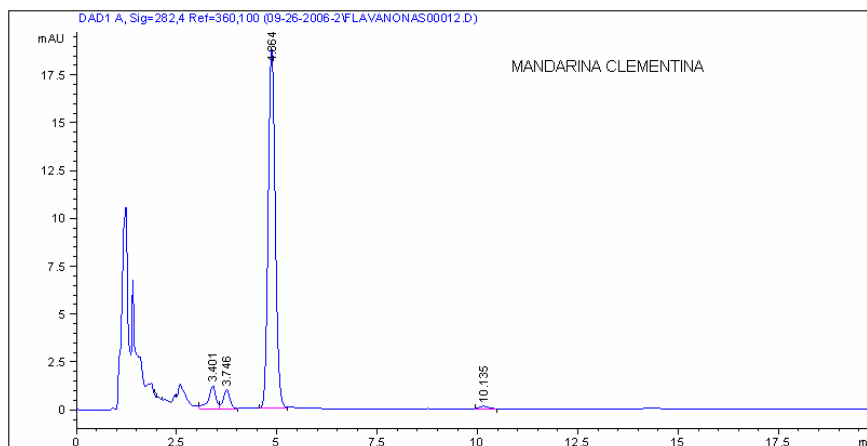
En el caso de la mandarina, se detecta la presencia de hesperidina en todas las variedades analizadas. La naringenina está presente en los jugos de mandarina *común*, *onecco* y *arrayana*, pero en el jugo de mandarina *clementina* no se detectó.

Ninguno de los jugos cítricos de las variedades evaluadas presentó hesperitina.

En la **Figura 13** se presentan los cromatogramas obtenidos para los jugos de mandarina de cada una de las variedades analizadas.

**Figura 13.** Cromatogramas de jugos de mandarina.





### 3.3.2 Análisis cuantitativo.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de las flavanonas en las muestras analizadas (**Tabla 18**) permiten hacer las siguientes observaciones:

- ❖ La toronja *ica hático* es el cítrico cuyo jugo presentó la mayor concentración de naringina, seguida por la toronja *star ruby*, la lima *tahití*, el limón *común*, la naranja *valencia campbell* y la naranja *valencia frost*.
- ❖ La hesperidina se presentó en mayor concentración en el jugo de mandarina *común*, seguido por los jugos de mandarina *arrayana*, *clementina* y *onecco*; limón *común*, naranja *valencia frost*, naranja *valencia campbell*, lima *tahití*, toronja *ica hático* y toronja *star ruby*.
- ❖ El jugo de lima *tahití* presentó la mayor concentración de naringenina, seguido por los jugos de limón *común*, toronja *ica hático*, toronja *star ruby*, mandarina *arrayana*, naranja *valencia frost*, naranja *valencia campbell* y mandarina *onecco*. En el jugo de mandarina *clementina* no se detectó la naringenina.

- ❖ En ninguno de los jugos analizados se detectó la hesperetina.

Las anteriores observaciones permiten establecer que la concentración de flavanonas varía entre las frutas cítricas, y entre las variedades de un cítrico en particular. Pero en términos generales, se puede concluir que los jugos de toronja presentan la mayor concentración de naringina, los de mandarina poseen la mayor concentración de hesperidina y los de lima la mayor concentración de naringenina.

En la **Tabla 19** se resumen las concentraciones reportadas en la bibliografía para las flavanonas analizadas en jugos cítricos.

**Tabla 18.** Análisis cuantitativo de flavanonas en jugos cítricos.

<b>JUGO</b>	<b>NARINGINA (ppm)</b>	<b>HESPERIDINA (ppm)</b>	<b>NARINGENINA (ppm)</b>	<b>HESPERETINA (ppm)</b>
Toronja <i>ica hático</i>	192,17 ± 5,25	4,44 ± 0,17	4,97 ± 0,02	ND.
Toronja <i>star ruby</i>	179,31 ± 1,97	3,43 ± 0,09	2,77 ± 0,07	ND.
Naranja <i>valencia campbell</i>	3,40 ± 0,09	44,89 ± 1,38	2,44 ± 0,10	ND.
Naranja <i>valencia frost</i>	3,28 ± 0,14	50,13 ± 0,58	2,58 ± 0,09	ND.
Limón <i>común</i>	5,79 ± 0,15	59,30 ± 0,78	7,95 ± 0,22	ND.
Lima <i>tahití</i>	7,74 ± 0,18	33,85 ± 1,23	17,75 ± 0,47	ND.
Mandarina <i>común</i>	ND.	159,71 ± 1,08	2,36 ± 0,09	ND.
Mandarina <i>arrayana</i>	ND.	122,69 ± 3,36	2,74 ± 0,24	ND.
Mandarina <i>clementina</i>	ND.	105,78 ± 3,85	ND.	ND.
Mandarina <i>onecco</i>	ND.	84,26 ± 2,50	2,17 ± 0,10	ND.

ND. No detectada.

**Tabla 19.** Resultados reportados en la bibliografía para el análisis de flavanonas

Referencia	Flavanona	Mandarina (ppm)	Naranja (ppm)	Toronja (ppm)	Limón (ppm)	Lima (ppm)
Peterson, et al. 2006 [53].	Naringina Hesperidina	0,00 43,1-470,8	0,00-17,3 25,6-392,6	NA	NA	NA
Belajová and Suhaj.; 2004 [26].	Naringina Hesperidina	NA	2,0 92,7	211,0 15,4	NA	NA
Kanaze, et al. 2003 [16].	Naringina Hesperidina	0,5-1,2 45,9-237,7	N.D. 53,8-735,3	351,3-584,7 43,9-164,0	N.D. 15,9-47,2	NA.
Ho, et al. 2000 [18].	Naringina Naringenina	NA.	NA.	350; 141; 371; 257. ND. ND. ND.	NA.	NA.
Drewnowski, and Gomez, 2000 [4].	Naringina	NA.	NA.	300-750	NA.	NA.
Mouly, Gaydou, and Auffray, 1998 [25].	Naringina Hesperidina	NA.	ND. 475	428 5,8	NA.	NA.
Nogata, Y. et al. 1994 [54].	Naringina Hesperidina	ND. 87	NA.	NA.	NA.	NA.
Yusof, Ghazali, and King, 1990 [14].	Naringina	NA.	NA.	NA.	NA.	98,4
Rouseff, R.; Martin, S.F. and Youtsey, C.O. 1987 [55].	Naringina Hesperidina	NA	ND. 151	73 Star ruby 16	NA.	NA.
Fisher, J.F. 1978 [56].	Naringina Hesperidina	NA	ND 98, 107, 120	NA	NA	NA

NA: No analizado

ND: No detectado.

Para los jugos de toronja se reporta la presencia de naringina y de hesperidina en concentraciones variables, como es el caso de los trabajos reportados por HO, et al (2000) y KANAZE, et al (2003), quienes analizaron diferentes variedades. En la presente investigación se obtuvieron concentraciones de 192,17 ppm y 4,44 ppm de naringina y hesperidina para la toronja *ica hático* y de 179,31 ppm y 3,44 ppm de naringina y hesperidina para la toronja *star ruby*.

En el caso de la naranja, todos los estudios muestran la presencia de la hesperidina en concentraciones entre 25 a 735 ppm, mientras que sólo algunos muestran la presencia de naringina en concentraciones que oscilan entre 2,0 a 18 ppm. En los jugos de las variedades de cítricos analizadas en este trabajo se obtuvieron valores de 44,89 ppm de hesperidina y 3,40 ppm de naringina para la naranja *valencia campbell* y de 50,13 ppm de hesperidina y 3,28 ppm de naringina para la naranja *valencia frost*.

En cuanto a la mandarina, los tres estudios encontrados reportan la presencia de hesperidina en concentraciones que oscilan entre 43 y 470 ppm. Solamente KANASE, et al (2003), señala la presencia de naringina en concentraciones de 0,5-1,2 ppm. En el presente trabajo las mandarinas analizadas mostraron valores de hesperidina que oscilaron entre 84,26 (mandarina *onecco*) y 159,71 ppm (mandarina *común*) y ninguna variedad presentó naringina.

No se encuentran reportes sobre el contenido de naringenina y hesperetina en los jugos de las variedades evaluadas. Sin embargo, en este trabajo se observó la presencia de naringenina en todos los jugos (excepto en el jugo de mandarina *clementina*), y la ausencia de hesperetina.

### 3.4 EFECTO DE LA NARINGINASA COMERCIAL SOLUBLE EN EL JUGO DE MANDARINA.

A pesar de que en el jugo de mandarina no se detectó la presencia de naringina, se procedió a evaluar el efecto de la naringinasa, enzima que como se mencionó anteriormente, ha sido empleada para disminuir el sabor amargo de los jugos de toronja. La naringinasa además de actuar sobre la naringina, actúa sobre la hesperidina, al ser los dos compuestos de naturaleza química similar, y se ha reportado que uno de los productos de hidrólisis de la hesperidina (la hesperetina-glucósido) tiene propiedades edulcorantes [6].

Para este estudio se escogió la mandarina *común* teniendo en cuenta que es la variedad de mayor cultivo en la región.

En la **Tabla 20**, se reportan las concentraciones de los compuestos presentes en el jugo de mandarina *común* recién exprimido y después de ciertos intervalos de tiempo, tanto en el jugo tratado con la enzima, como en el jugo blanco (jugo sin adicionar enzima). En esta tabla se señalan unos compuestos identificados con sus tiempos de retención, cuyos nombres no se conocen porque no se contaba con los patrones, pero que se consideran porque presentan variaciones importantes (excepto el compuesto en 3,37 min) al ser tratados con la enzima.

**Tabla 20.** Efecto de la naringinasa comercial soluble en el jugo de mandarina.

Compuesto	t <sub>R</sub>	t = 0	t = 15		t = 30		t = 45	
			Blanco (ppm)	T.E. (ppm)	Blanco (ppm)	T.E. (ppm)	Blanco (ppm)	T.E. (ppm)
1. NI.	3,15±0,02	ND.	ND.	2,17	ND.	2,21	ND.	2,28
2. NI.	3,37±0,03	4,20	4,27	4,16	4,25	4,12	4,21	4,19
3. N.I.	3,72±0,04	11,39	11,37	3,45	11,38	2,27	11,31	2,11
<b>4.Hesperidina</b>	<b>4,71±0,06</b>	<b>160,45</b>	<b>156,31</b>	<b>74,44</b>	<b>150,10</b>	<b>18,22</b>	<b>142,41</b>	<b>11,05</b>
5. NI.	5,42±0,07	1,20	1,35	73,36	1,49	123,7	1,93	129,01
6. NI.	6,00±0,03	0,8	2,74	1,38	8,78	2,47	16,07	2,91
<b>7.Naringenina</b>	<b>14,21±0,20</b>	<b>2,56</b>	<b>2,57</b>	<b>2,55</b>	<b>2,52</b>	<b>5,76</b>	<b>2,59</b>	<b>5,80</b>
8. N.I.	16,41±0,09	ND.	1,97	3,16	1,95	5,24	1,99	5,68
<b>9.Hesperetina</b>	<b>18,89±0,09</b>	<b>ND.</b>	<b>ND.</b>	<b>10,58</b>	<b>ND.</b>	<b>16,48</b>	<b>ND.</b>	<b>17,52</b>

NI.: No Identificado. ND. No detectado.

Continuación, Tabla 20.

Compuesto	t <sub>R</sub>	t = 60		t = 120		t = 180	
		Blanco (ppm)	T.E. (ppm)	Blanco (ppm)	T.E. (ppm)	Blanco (ppm)	T.E. (ppm)
1. N.I.	3,15±0,02	ND.	2,34	ND.	2,35	ND.	2,35
2. N.I.	3,37±0,03	4,23	4,15	4,26	4,22	4,27	4,14
3. N.I.	3,72±0,04	11,34	2,05	11,30	2,02	11,29	2,01
<b>4. Hesperidina</b>	<b>4,81±0,06</b>	<b>137,89</b>	<b>10,86</b>	<b>130,51</b>	<b>10,77</b>	<b>123,11</b>	<b>10,15</b>
5. N.I.	5,42±0,07	2,04	127,15	2,07	127,34	2,10	127,69
6. N.I.	6,00±0,03	20,21	3,38	27,83	3,99	35,01	4,01
<b>7. Naringenina</b>	<b>14,21±0,20</b>	<b>2,62</b>	<b>5,82</b>	<b>2,70</b>	<b>5,83</b>	<b>2,66</b>	<b>5,83</b>
8. N.I.	16,41±0,09	2,00	5,70	1,97	5,71	2,01	5,69
<b>9. Hesperetina</b>	<b>18,887±0,09</b>	<b>ND.</b>	<b>19,21</b>	<b>ND.</b>	<b>19,25</b>	<b>ND.</b>	<b>19,28</b>

El análisis de la **Tabla 20** permite hacer las siguientes observaciones:

- ❖ Después de transcurridos 15 min del tratamiento enzimático, apareció un compuesto cuyo tiempo de retención es **3,15 min**, y su concentración aumentó levemente durante las 3 horas del tratamiento. Este compuesto no se detectó en el jugo recién exprimido ni en los blancos, lo cual sugiere que se trata de uno de los productos de hidrólisis enzimática.
  
- ❖ La concentración del compuesto que presentó un tiempo de retención de **3,37 min** permaneció constante durante las 3 horas, tanto en el blanco como en el jugo tratado con la enzima.
  
- ❖ La concentración del compuesto en **3,72 min**, no presentó cambios en el jugo al cual no se le agregó enzima, pero disminuyó a medida que transcurrió el tiempo con el tratamiento enzimático; lo anterior indica que ese compuesto es un sustrato de la naringinasa, que debe presentar un enlace ramnosa-glucosa 1,2 y/o 1,6.

Adicionalmente, la concentración de la naringenina permaneció constante en el jugo blanco y aumentó con el tratamiento enzimático; esta flavanona es el producto de hidrólisis de la naringina y de la narirutina, pero teniendo en cuenta que la naringina no se encuentra presente en el jugo de mandarina, se podría suponer que el compuesto con  $t_R$  de 3,72 min sea la narirutina. La **narirutina** es un isómero insípido de la naringina, y se diferencian entre sí por el enlace ramnosa-glucosa, 1,6 en el primer caso y 1,2 en el segundo. Sin embargo, para determinar exactamente que se trata de la narirutina, es necesario hacer el análisis por HPLC–Masas o buscar el patrón que para este trabajo no se consiguió.

La variación de estos compuestos con el tiempo se muestra en la **Figura 14**.

❖ **La hesperidina** disminuye tanto en el jugo blanco como en el jugo sometido al tratamiento enzimático, pero la velocidad y la proporción de disminución es mucho mayor en el segundo caso. En el jugo tratado con la enzima se observa la aparición de la hesperetina, y el aumento de su concentración con el transcurrir del tiempo (**Figura 15**), de igual manera se aprecia el aumento significativo de la concentración de un compuesto cuyo tiempo de retención es **5,42 min**. La hesperetina no se observa en ninguno de los jugos blanco, mientras que el compuesto en 5,42 min se detecta en todos, y su concentración aumenta levemente con el tiempo.

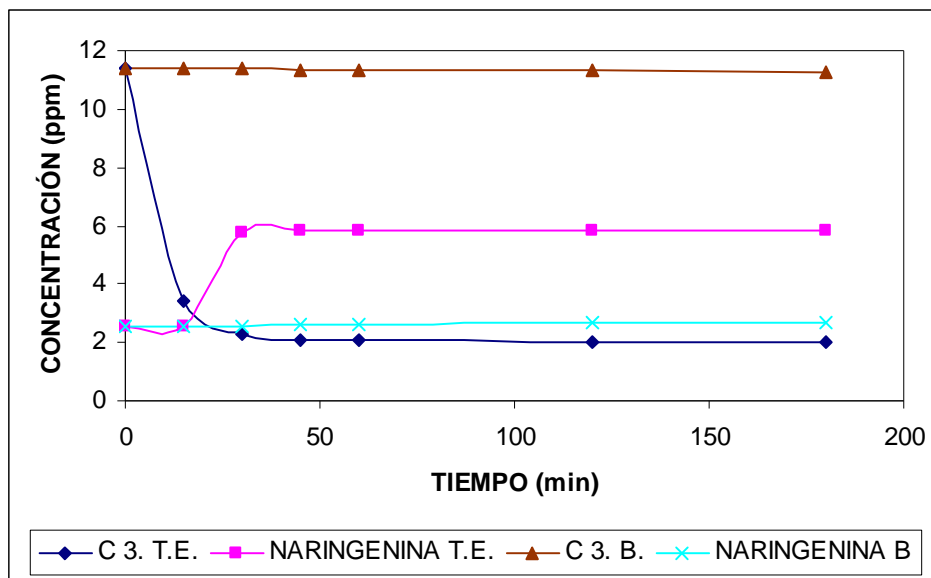
La hesperetina es el aglicón de la hesperidina, y por lo tanto, el único producto de hidrólisis enzimática esperado (**Figura 9**), teniendo en cuenta que la naringinasa de *Penicillium decumbens* utilizada en esta investigación, según las especificaciones del proveedor, sólo posee actividad glucosidasa. Sin embargo, la aparición de dos productos de hidrólisis de la hesperidina muestra que la enzima utilizada presenta en realidad dos actividades, ramnosidasa y glucosidasa, actuando como se ilustra en la **Figura 9**, y que el pico en 5,42 min podría ser la hesperetina-glucósido.

❖ A un tiempo de retención de 6,00 min aparece un producto que aumenta tanto en el jugo blanco como en el jugo tratado con la enzima, pero los cambios son más representativos en los blancos.

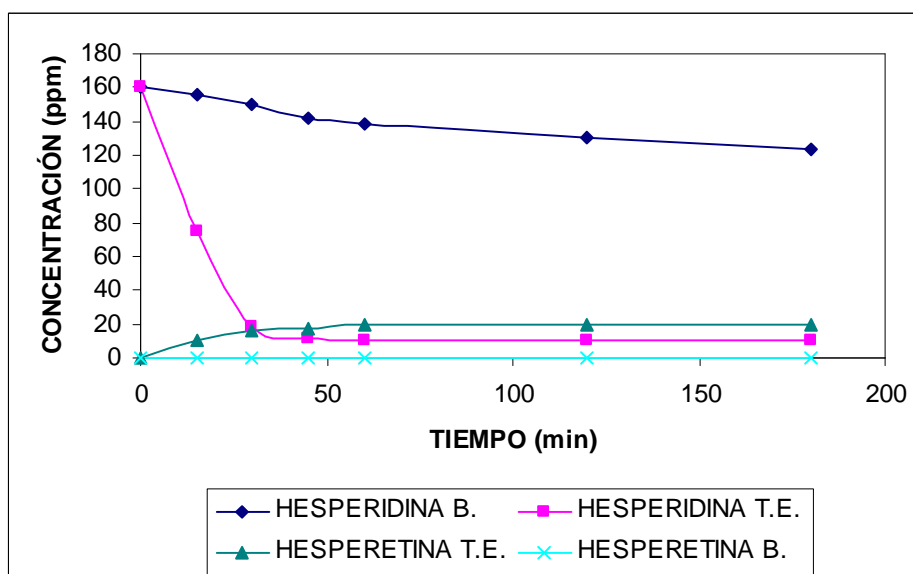
❖ La concentración del compuesto que aparece en 16,41 min permanece constante durante las 3 horas en el jugo blanco, pero aumenta gradualmente en el jugo sometido al tratamiento enzimático.

De lo anterior se establece que la naringinasa no actúa sólo sobre la naringina, también lo hace sobre la hesperidina y podría hacerlo sobre la narirutina, es decir, la naringinasa hidroliza los enlaces ramnosa-glucosa 1,2 y 1,6 de las flavanonas.

**Figura 14.** Variación en la concentración del compuesto en 3,72 min y de la naringenina en jugo sin tratar y en jugo tratado con enzima.



**Figura 15.** Variación en la concentración de la hesperidina y la hesperetina en jugo sin tratar y en jugo tratado con enzima.



Con los datos de la **Tabla 20** se calculó el porcentaje de conversión de la hesperidina y se obtuvieron los resultados mostrados en la **Tabla 21**

**Tabla 21.** Porcentajes de Conversión de la hesperidina

Tiempo, min	Conversión, %
15	53,61
30	88,64
45	93,11
60	93,23
120	93,29
180	93,67

Se observan aumentos significativos en el porcentaje de conversión de la hesperidina hasta los 45 min, después de ese tiempo la actividad catalítica de la naringinasa permanece constante en las condiciones de reacción utilizadas.

La actividad específica de la naringinasa, calculada como se explica en la **Sección 2.7** fue de 1,123 U/mg proteína.

### 3.5 ANÁLISIS SENSORIAL

Los resultados reportados por los catadores en el estudio orientado del amargor en el jugo de mandarina se observan en la **Tabla 22**.

Los resultados sugieren que el amargor en el jugo de mandarina se va presentando a medida que transcurre el tiempo, siendo apenas perceptible en el jugo recién exprimido, este fenómeno se conoce como “amargor retardado”, producido por la formación de limonina en el jugo, tal como se explica en la **Sección 1.2.1** del Marco Teórico.

**Tabla 22.** Estudio orientado del amargor en el jugo de mandarina *común*.

Tiempo (min)*	0	15	30	45	60	120
<b>Intensidad de amargor A.</b>	Ausencia	Apenas perceptible	Apenas perceptible	Ligero	Ligero	Moderado
<b>Intensidad de amargor B.</b>	Ausencia	Apenas perceptible	Apenas perceptible	Ligero	Ligero	Moderado

\* Durante estas pruebas el jugo se mantuvo a temperatura ambiente

**A.** Jugo blanco.      **B.** Jugo tratado con enzima.

Los resultados del análisis sensorial también indican que la naringinasa no tiene ningún efecto en el amargor del jugo, es decir, la hidrólisis de la hesperidina no afecta el amargor retardado que se va presentando en el jugo de mandarina.

En la **Tabla 23** se observan las diferencias en el sabor del jugo de mandarina recién exprimido y después de uno, dos y tres días de su extracción. Este jugo se almacenó refrigerado a 10 °C porque la calidad del jugo se deteriora completamente, al cabo de un día, si se almacena a temperatura ambiente.

**Tabla 23.** Sabor del jugo de mandarina días después de su extracción.

Día	0	1	2	3
<b>Intensidad de amargor.</b>	Apenas perceptible	Moderado	Elevado	Extremo

Con un día de procesamiento el jugo presenta un sabor amargo moderado, y después de dos días las características organolépticas del jugo refrigerado se deterioran por completo.

#### 4. CONCLUSIONES

- El método por HPLC estandarizado en este trabajo, permitió el análisis de las flavanonas naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina en forma simultánea, cumpliendo en todos los casos con los requisitos establecidos por las GLP en cuanto a desarrollo y validación de métodos.
- La concentración de flavanonas varía entre las frutas cítricas, y entre las variedades de un cítrico en particular. Pero en términos generales, se puede concluir que los jugos de toronja presentan la mayor concentración de naringina, los de mandarina poseen la mayor concentración de hesperidina, y los de lima la mayor concentración de naringenina.
- La toronja *ica hático*, la mandarina *común* y la lima *tahití*, son las variedades de cítricos que presentaron la mayor concentración de naringina, hesperidina y naringenina, respectivamente.
- La naringinasa hidroliza la hesperidina presente en el jugo de mandarina, dando lugar a la formación de hesperetina y de un compuesto con tiempo de retención de 5,47 min.
- La naringinasa da lugar al aumento de la concentración de naringenina en el jugo de mandarina.
- El análisis sensorial permitió establecer que la naringinasa no ejerce efecto sobre el sabor amargo del jugo de mandarina.

## 5. RECOMENDACIONES

- Debido a las propiedades funcionales de las flavanonas analizadas, se recomienda determinar su concentración en los jugos cítricos extraídos durante diferentes períodos de maduración de las frutas, para establecer en que etapa de madurez es más saludable ingerir estos zumos.
- Adquirir los patrones de diosmina, neohesperidina, narirutina, quercetina y rutina, para hacer una caracterización completa de los cítricos en cuanto su concentración de flavonoides.
- Determinar la concentración de flavonoides en la semilla, el albedo y la cáscara de los cítricos regionales, con el fin de establecer la distribución de estos compuestos en las frutas cítricas.
- Determinar la concentración de flavonoides en jugos comerciales de diversas marcas, con el fin de evidenciar las diferencias nutricionales entre los jugos naturales y los jugo procesados.
- Adquirir el patrón de narirutina, el isómero no amargo de la naringina, para confirmar que ese compuesto es el sustrato de la naringinasa cuyo producto de hidrólisis es la naringenina.
- Con el fin de esclarecer el mecanismo de acción de la naringinasa sobre la hesperidina, se recomienda adquirir el patrón de la hesperetina-glucósido, compuesto posiblemente producido durante la hidrólisis enzimática y cuyo tiempo de retención es  $5,42 \pm 0,07$  min.
- Estandarizar un método por HPLC para la cuantificación de limonina en jugos cítricos recién exprimidos y a ciertos intervalos de tiempo después de su extracción.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio Agrocadenas Colombia. La cadena de cítricos en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Bogotá: 2005. 61p. Disponible en <http://www.agrocadenas.gov.co>.
2. SHI, J.X. et al. Physiological responses of 'Murcott' mandarins and 'Star Ruby' grapefruit to anaerobic stress conditions and their relation to fruit taste, quality and emission of off-flavor volatiles. *Postharvest Biology and Technology*. 2005; **38**:99-105.
3. AFRICANO, L.M. y HERRERA, C.M. Propuesta de diseño y localización de una planta productora de vinos para el aprovechamiento integral de la mandarina en el municipio de Lebrija. Tesis de Pregrado de Ingeniería Industrial, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. 2004. p. 50-55.
4. DREWNOWSKI, A. and GOMEZ, C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *American Clinical Journal Nutrition*. 2000; **72**:1424-35.
5. PURI, M.; BANERJEE, U.C. Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnology Advances*. 2000; **18**:207-217.
6. MANZANARES, P.; GRAAFF, L.H. and VISSER, J. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letter*. 1997; **157**:279-283.

7. MANZANARES, P. et al. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. *Letter in Applied Microbiology*. 2000; **31**:196-202.
8. VILLA, Jorge. Cítricos. 1<sup>a</sup>. ed. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Medellín. 1996. p. 31- 46.
9. GARCÍA, M. et al. Plantas cítricas en el tratamiento de enfermedades vasculares. *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vascolar*. 2002; **32**:39-46.
10. KITA, M. et al. Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoide UDP-glucosyltransferase in *Citrus*. *FEBS Letters*. 2000; **469**:173-178.
11. MERINO, M.T. et al. High-performance liquid chromatography quantitation of limonin D-ring lactone hydrolase and limonoate dehydrogenase activities. *Journal of Chromatography A*. 1997; **760**:173-178.
12. VAN BEEK, T.A. and BLAAKMEER, A. Determination of limonin in grapefruit juice and other citrus juices by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 1989; **464**:375-386.
13. KARIM, M.R. and HASHINAGA, F. Preparation and properties of immobilizes pummelo limonoide glucosyltransferase. *Process Biochemistry*. 2002; **38**:809-814.
14. YUSOF, S.; GHAZALI, H.M. and KING, G.S. Naringin content in local citrus fruits. *Food Chemistry*. 1990; **37**:113-121.

15. GIANNUZZO, A. et al. Extracción de naringina de *citrus paradisi* L. Estudio comparativo y optimización de técnicas extractivas. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2000; **20**:257-261.
16. KANAZE, F.I. et al. Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003; **33**:243-249.
17. DAVIS, W.B. Determination of Flavanones in Citrus Fruits. *Analytical Chemistry*. 1947; **19**:476-478.
18. HO, P. et al. Content of CYP3A4 inhibitors, naringin, naringenin and bergapten in grapefruit and grapefruit juice products. *Pharmaceutica Acta Helveticae*. 2000; **74**:379-385.
19. ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. 2004; **24**:851-874.
20. FISHER, J.F. and WHEATON, T.A. A High-Pressure Liquid Chromatographic Method for the Resolution and Quantitation of Naringin and Naringenin Rutinoides in Grapefruit Juice. *Journal Agriculture Food and Chemistry*. 1976; **24**:898-899.
21. HAGEN, R.E. et al. A Chromatographic-Fluorometric Method for Determination of Naringin, Naringenin Rutinoides, and Related Flavanone Glycosides in Grapefruit Juice and Juice Sacs. *Analytical Biochemistry*. 1965; **12**:472-482.

22. ARNAO, M.B. et al. An Enzymatic Colorimetric Method for Measuring Naringin Using 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) (ABTS) in the Presence of Peroxidase. *Analytical Biochemistry*. 1990; **185**:335-338.
23. CHRISTOV, R. and BANKOVA, V. Gas chromatographic analysis of underivatized phenolic constituents from propolis using an electron-capture detector. *Journal of Chromatography*. 1992; **623**:182-185.
24. FERNANDEZ, M.P.; WATSON, P.A. and BREUIL, C. Gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of wood extractive compounds in quaking aspen. *Journal of Chromatography*. 1992; **922**:225-233.
25. MOULY, P.; GAYDOU, E.M. and AUFFRAY, A. Simultaneous separation of flavanona glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1998; **800**:171-179.
26. BELAJOVÀ, E. and SUHAJ, M. Determination of phenolic constituents in citrus juices: Method of high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2004; **86**:339-343.
27. VANAMALA, J; et al. Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006; **19**:157-166.
28. CHIEN, P.J.; SHEU, F. and SHYU, Y.T. Monitoring enzymatic debittering in grapefruit juice by high performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2001; **9**:115-120.

29. HUMANES, L. et al. Purification and Characterization of Limonoate Dehydrogenase from *Rhodococcus fascians*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997; **63**:3385-3389.
30. MARWAHA, S.S. et al. Optimization of parameters for hydrolysis of limonin for debittering of kinnow mandarin juice by *Rhodococcus fascians*. *Enzyme Microb. Technol.* 1996; **16**:723-725.
31. RIBEIRO, M. et al. Response surface modelling of the consumption of bitter compounds from orange juice by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Molecular Catalysis*. 2003; **21**:81-88.
32. LEE, H.S. and KIM, J.G. Effects of debittering on red grapefruit juice concentrate. *Food Chemistry*. 2003; **82**:177-180.
33. TSEN, H.Y. y TSAI, S.Y. Comparison of the Kinetics and Factors Affecting the Stabilities of Chitin-Immobilized Naringinases from Two Fungal Sources. *Journal of Fermentation Technology*. 1988; **66**:193-198.
34. PURI, M.; MARWAHA, S.S. and KOTHARI, R.M. Studies on the applicability of alginate-entrapped naringinase for the debittering of kinnow juice. *Enzyme and Microbial Technology*. 1996; **18**: 281-285.
35. SOARES, N.F.F. and HOTCHKISS, J.H. Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringina concentration in graperfruit juice. *Journal of Food Science*. 1998; **63**:61-65.
36. PRAKASH, S.; SINGHAL, R.S. and KULKARNI, P.R. Enzymatic debittering of Indian grapefruit (*Citrus paradise*) juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2002; **4**:394-397.

37. JACINTHE, F. and DESPLANCKE, C. Guía de selección y entrenamiento de un panel de catadores. España: Acribia S.A. 2001. 97 p.
38. AGILENT TECHNOLOGIES. Guía de Soluciones y Suministros para Cromatografía y Espectroscopía 2006-2007. p. 633.
39. MA, Y. et al. LC/MS/MS quantitative assay for pharmacokinetics of naringenin and double peaks phenomenon in rats plasma. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; **307**:292-299.
40. EL-SHAFAE, A. and EL-DOMIATY, M. Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001; **26**:539-545.
41. AGILENT ECLIPSE XDB-C18. Datasheet.
42. MEYER, Veronika. Practical High-Performance Liquid Chromatography. 4<sup>a</sup> ed. Switzerland: Wiley. 2004. 357 p.
43. GRITTI, F.; MARTIN, M. and GUIOCHON, G. Influence of pressure on the properties of chromatographic columns II. The column hold-up volume. *Journal of Chromatography A*. 2005; 1070:13-22.
44. BURGESS, Christopher. Valid Analytical Method and Procedure. Cambridge Royal Society of Chemistry. 2000. p. 87.
45. RANGEL, Andrea. ANÁLISIS DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS VOLÁTILES EN CERVEZA. Tesis de pregrado en Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. 2001. p. 57.

46. COY, Gustavo Alfonso. Protocolo estandarización de métodos analíticos. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales –IDEAM-. 1999. 10 p.
47. CORLEY, Johannes. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. Handbood of residue analytical methods for agrochemicals. 2002. 18 p.
48. BERNAL, Ines. ANÁLISIS DE LOS ALIMENTOS. 2ª ed. Santafé de Bogotá: Guadalupe Eslava. 1994. p.104-115.
49. STASHENKO, Elena. Apuntes de clase, electiva Cromatografía de Gases. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, 2005.
50. ACEVEDO, F.; GENTINA, J.C. and ILLANES, A. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Chile: Universidad Católica de Valparaíso 2002. p. 43.
51. MURRAY, R. et al. Bioquímica de Harper. México: Manual Moderno. 2001. p. 91.
52. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the. Quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; **72**:248-254.
53. PETERSON, J.; et al. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006; **19**:S66-S73.

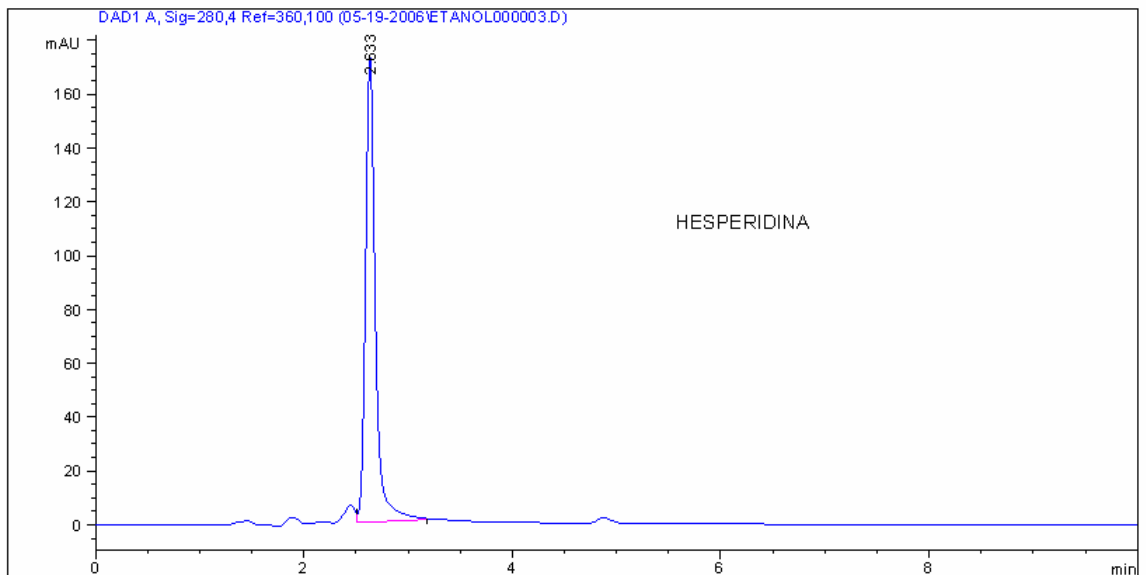
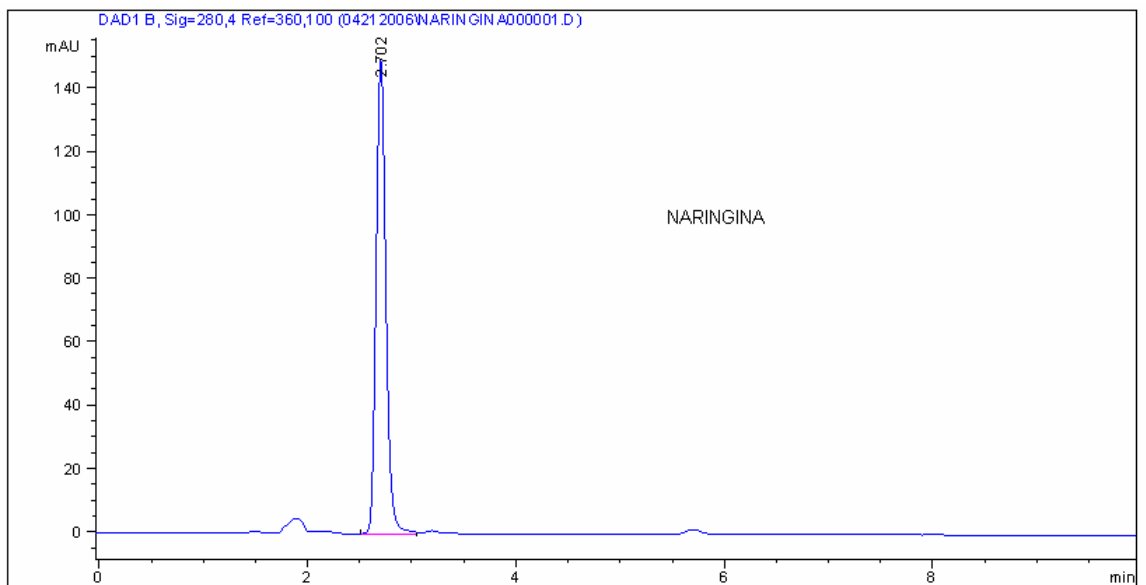
54. NOGATA, Y.; et al. High-Performance liquid chromatographic determination of naturally occurring flavonoids in *Citrus* with a photodiode-array detector. *Journal of Chromatography A*. 1994; **667**:59-66.
55. ROUSEFF, F.; MARTIN, S. and YOUTSEY, C. Quantitative survey of narirutin, naringina, hesperidin and neohesperidin in *Citrus*. *J. Agric. Food Chem.* 1987; **35**:1027-1030.
56. FISHER, J.F. A High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Quantitation of Hesperidin in Orange Juice. *J. Agric. Food Chem.* 1978; **26**:1459-1460.

# **ANEXOS**

# ANEXO 1. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

## 1.1 SELECCIÓN DE LA COLUMNA.

Fase móvil: ACN:30 H<sub>2</sub>O:70  
Flujo: 0,8 mL/min  
Modo isocrático  
Temperatura no controlada  
Columna C-18



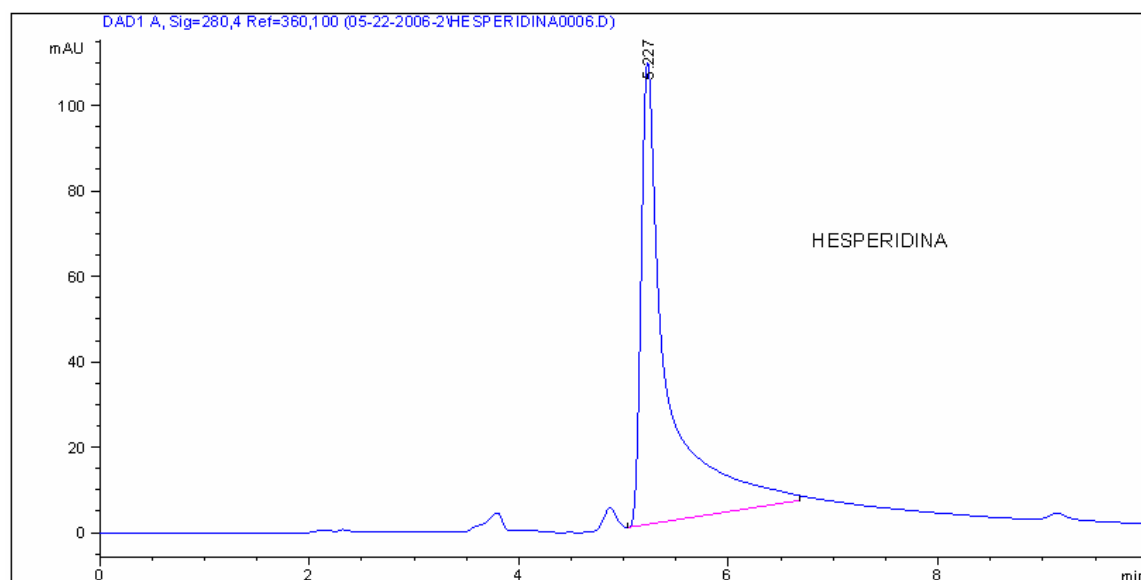
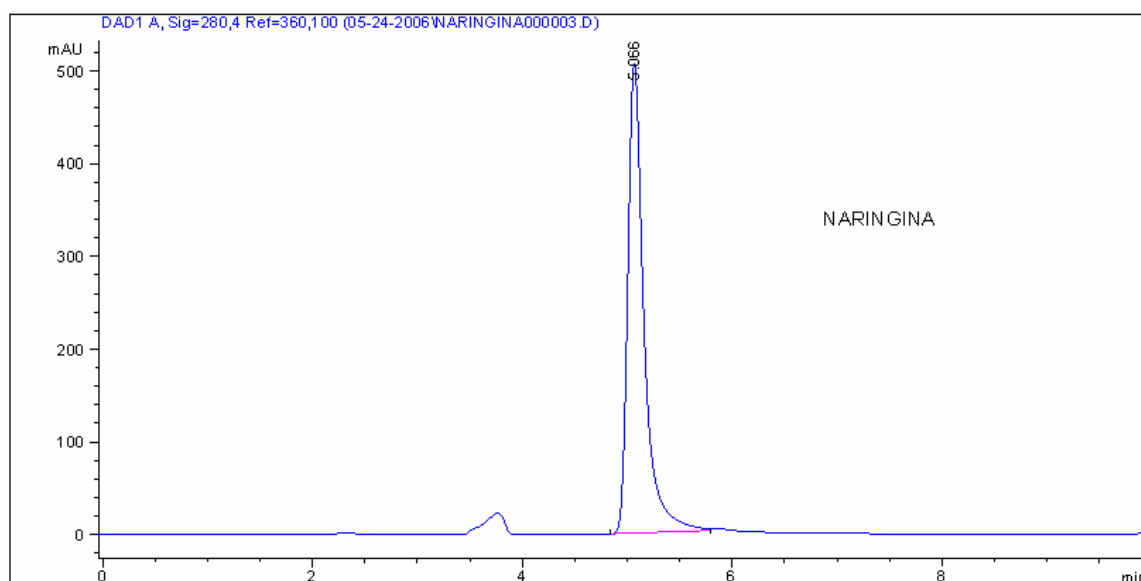
Fase móvil: ACN:30 H<sub>2</sub>O:70

Flujo: 0,8 MI/min

Modo isocrático

Temperatura no controlada

Columna C-8



## 1.2 SELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL.

**Tabla A.** Tipos, proporciones y observaciones de las fases móvil probadas a 1mL/min.

FASE MÓVIL						OBSERVACIONES			
ACN:H <sub>2</sub> O (30:70)						Coeluyen la naringina y la hesperidina.			
ACN:H <sub>2</sub> O						Coeluyen la naringina y la hesperidina.			
Tiempo (min)	0.0	3.0	5.0	6.0	10				
% ACN (mL)	20	20	90	20	20				
ACN:H <sub>2</sub> O El mismo gradiente anterior, pero se adicionaron al agua 0,15 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc./L H <sub>2</sub> O.						Coeluyen la naringina y la hesperidina. Después del pico de interés, sale una banda anda y asimétrica.			
Tetrahidrofurano: Agua: Ácido acético 21:77:2						La naringina y la hesperidina se separan, pero la naringenina sale a 55 minutos.			
ACN:H <sub>2</sub> O; 4%CH <sub>3</sub> COOH en el agua.						Separa la naringina y la hesperidina pero sus tiempos de retención son 19,595 y 21,175 min, respectivamente, el pico de la naringenina sale a 28,240 min y es muy asimétrico.			
Tiempo (min)	0	12	43	44	49			50	60
% ACN (mL)	0.0	8.0	34	70	70			0	0
ACN:H <sub>2</sub> O (20:80)						Separa la naringina y la hesperidina pero el pico de la naringenina es muy asimétrico y de poca intensidad.			

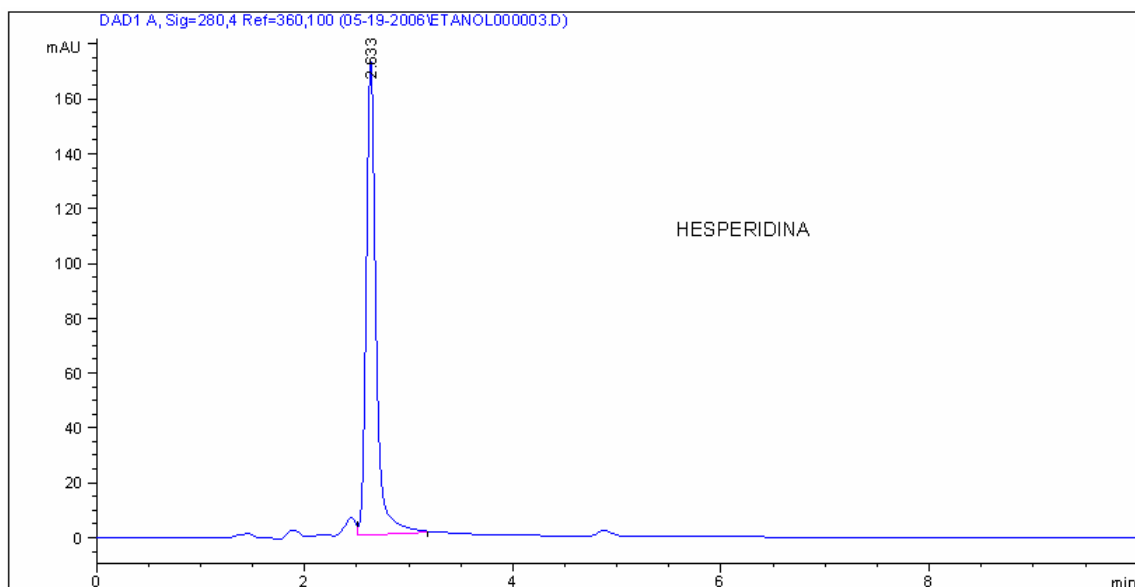
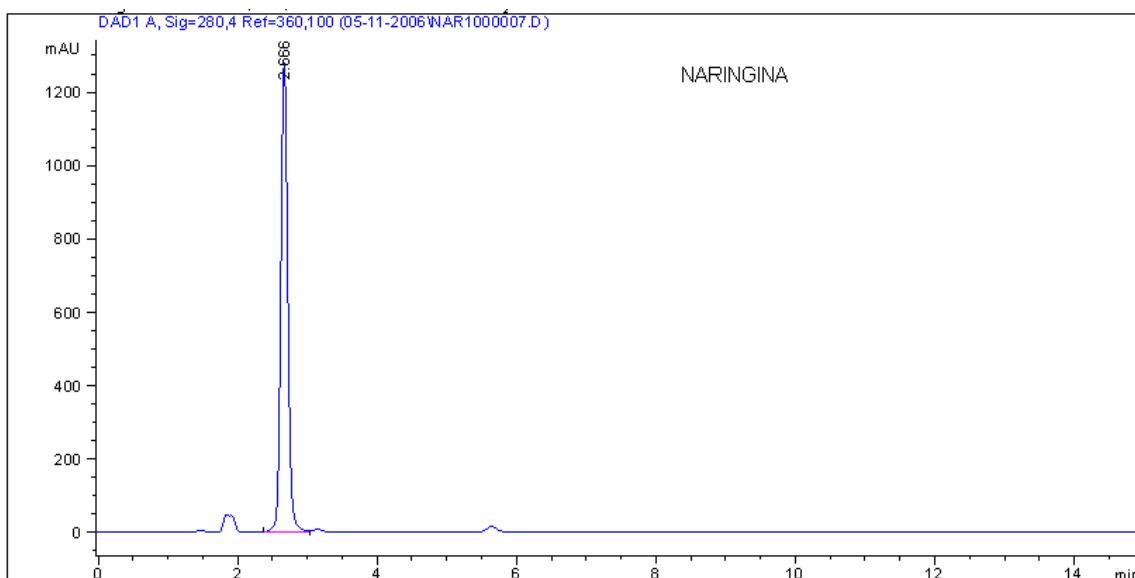
ACN:H <sub>2</sub> O (25:75)	Poca resolución en los picos de la naringina y la hesperidina. El pico de la naringenina es asimétrico.
Metanol:Agua 35:65	Separa los picos de la naringina y la hesperidina, y el pico de la naringenina tiene buena simetría, pero sale a los 30,828 min de la corrida cromatográfica.
Metanol:Agua 40:60	Separa los picos de la naringina y la hesperidina, el pico de la naringenina tiene buena simetría, y la corrida cromatográfica tarda 20 minutos. Cuando se pasa el jugo, los picos de interés tienen poca sensibilidad, mientras que los picos que salen en un tiempo próximo al tiempo muerto de la columna tienen gran sensibilidad, por eso se descartó esta proporción de fase móvil.
ACN:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH 20:76.8:3.2	Buena resolución de los picos de naringina y hesperidina, el pico de la naringenina es simétrico y se observa a los 23,802 min.
ACN:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH 25:72:3	Poca resolución entre los picos de la naringina y la hesperidina.
CH <sub>3</sub> OH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH 35:62.4:2.6	Buena resolución de los picos de naringina y hesperidina, buena sensibilidad hacia la naringenina, el tiempo de retención de la naringenina es 19,025 min.

CH <sub>3</sub> OH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH 38:59.5:2.5	Buena resolución de los picos de naringina y hesperidina, buena sensibilidad hacia la naringenina, el tiempo de retención de la naringenina es 14,436 min.
CH <sub>3</sub> OH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH 38:61:1	Buena resolución de los picos de naringina y hesperidina, buena sensibilidad hacia la naringenina, el tiempo de la naringenina es 18,135 min.

**Cromatogramas de las fases móvil mencionadas en la Tabla A1.**

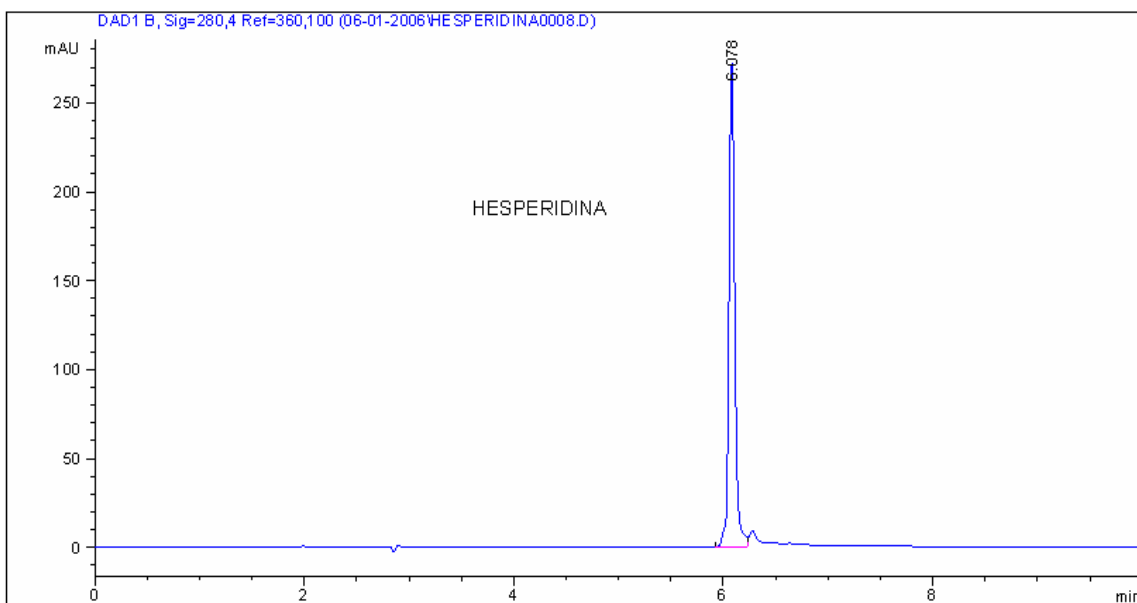
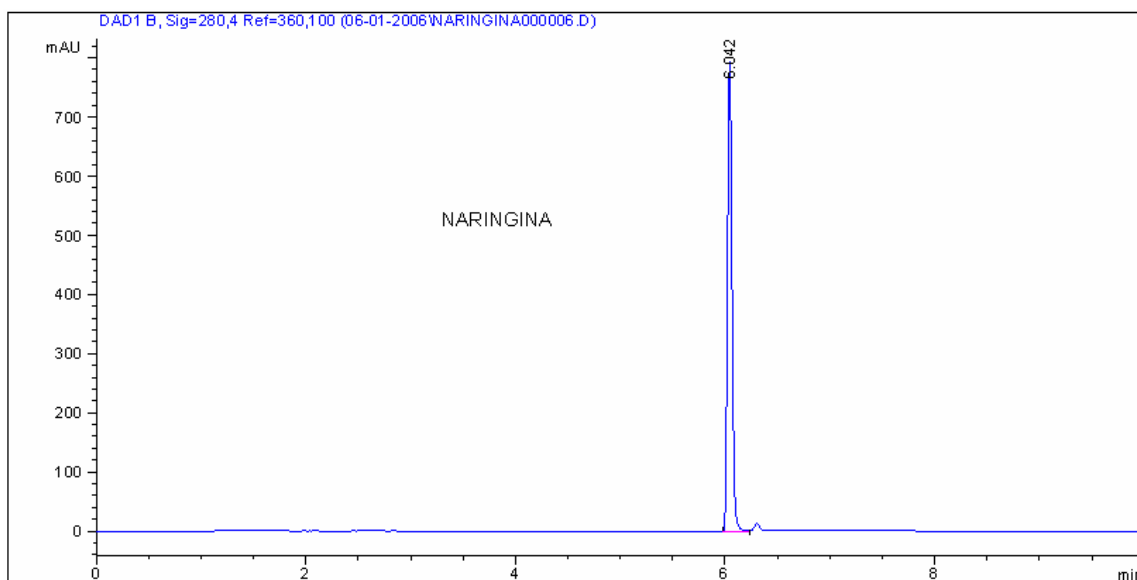
**Columna C-18, Flujo 1mL/min, 35°C.**

ACN:H<sub>2</sub>O 30:70

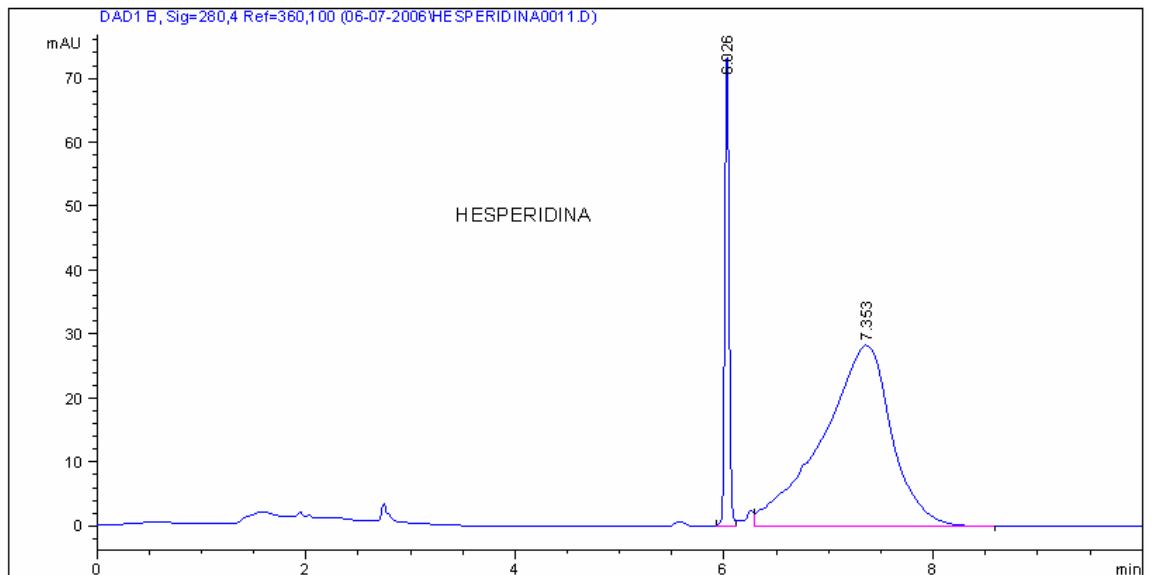
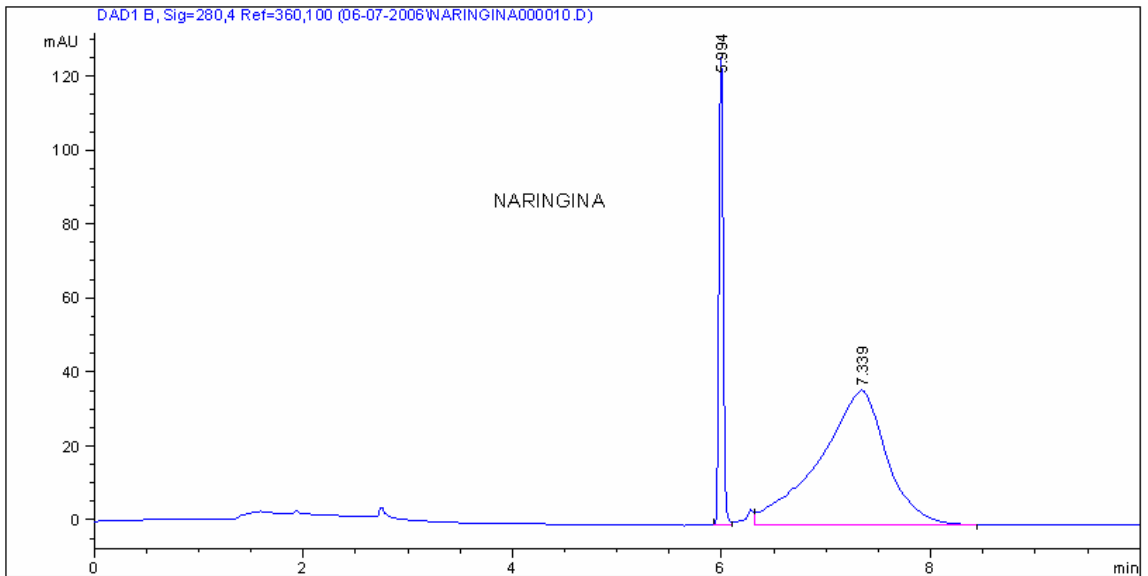


ACN:H<sub>2</sub>O

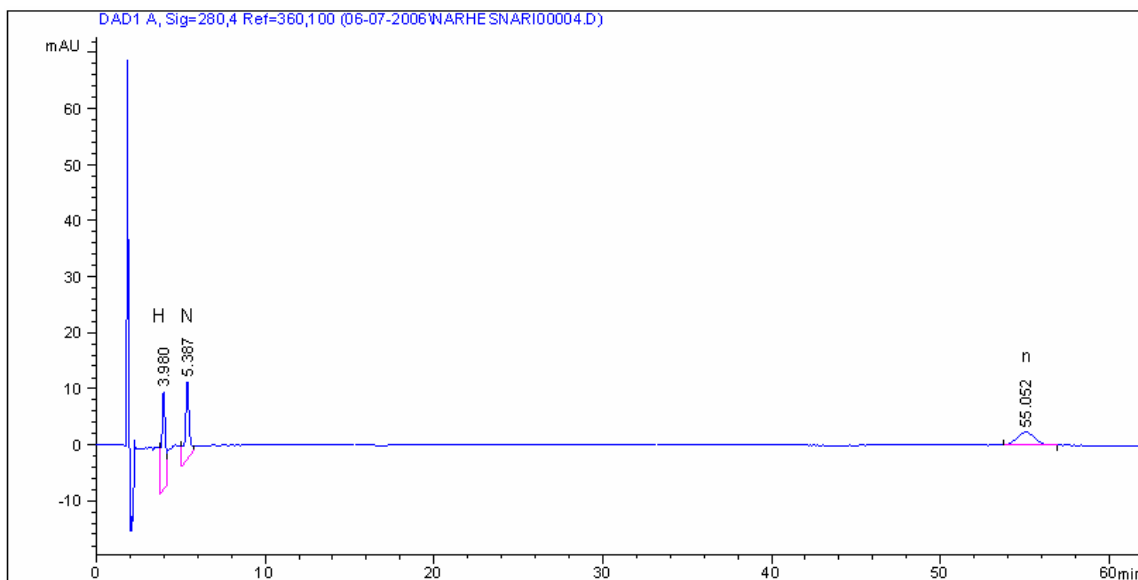
Tiempo (min)	0.0	3.0	5.0	6.0	10
%ACN	20	20	90	20	20



ACN:H<sub>2</sub>O El mismo gradiente anterior, pero se adicionaron 0,15 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc./L H<sub>2</sub>O.

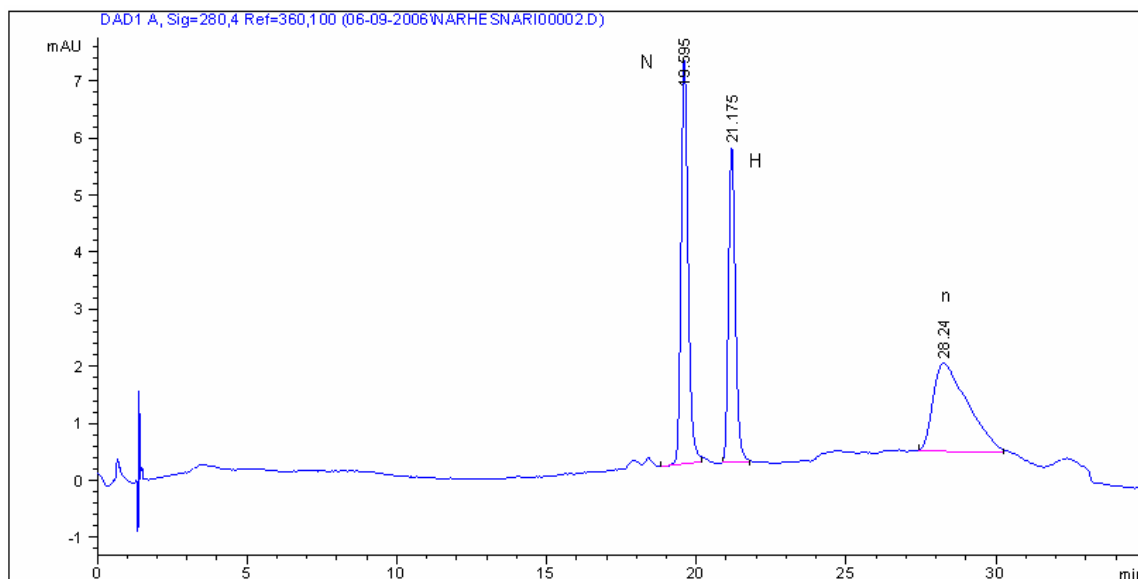


Fase móvil: THF:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 21:77:2

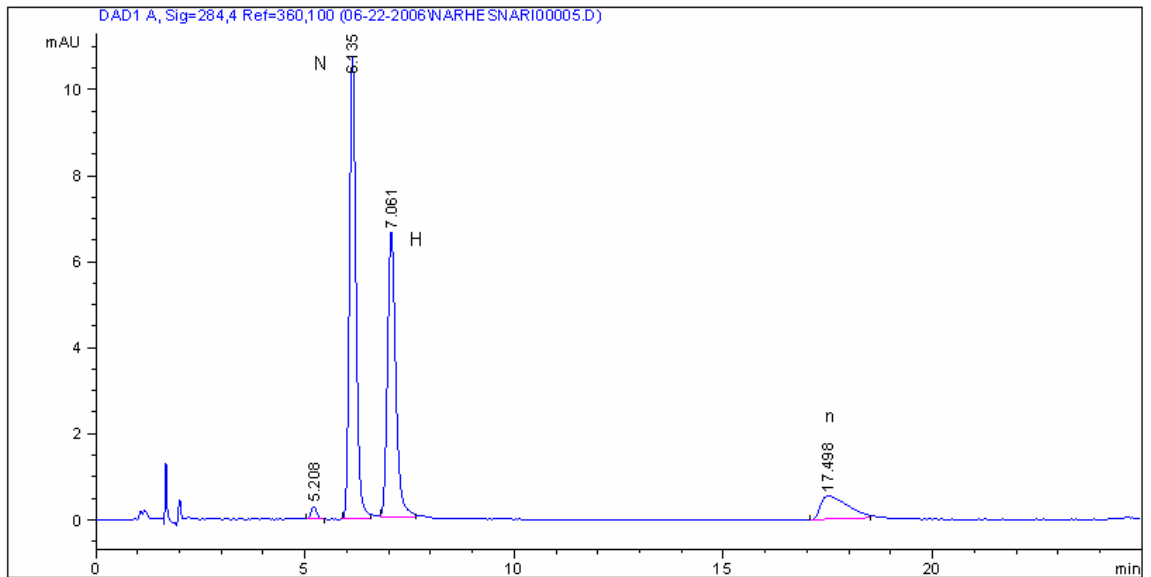


Fase móvil: ACN:H<sub>2</sub>O; 4%CH<sub>3</sub>COOH en el agua.

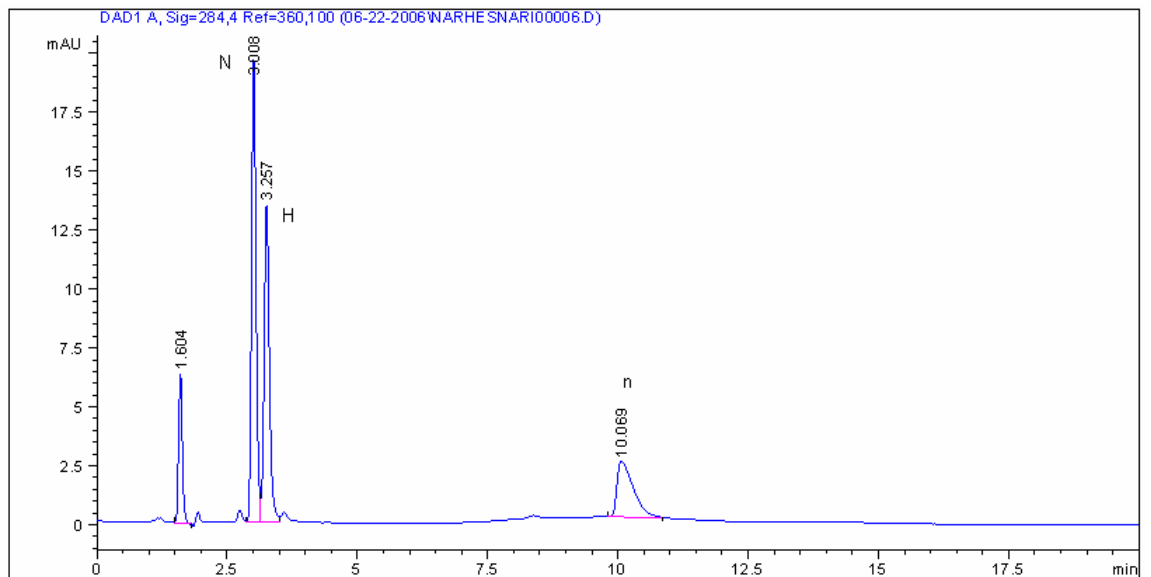
Tiempo (min)	0	12	43	44	49	50	60
% ACN (mL)	0.0	8.0	34	70	70	0	0



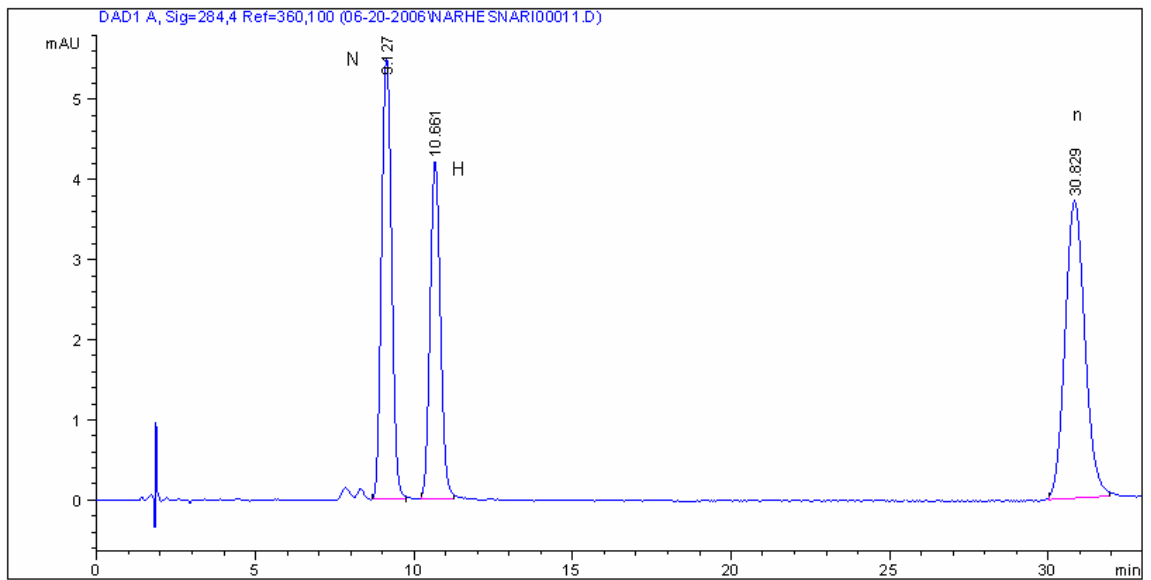
ACN:H<sub>2</sub>O (20:80)



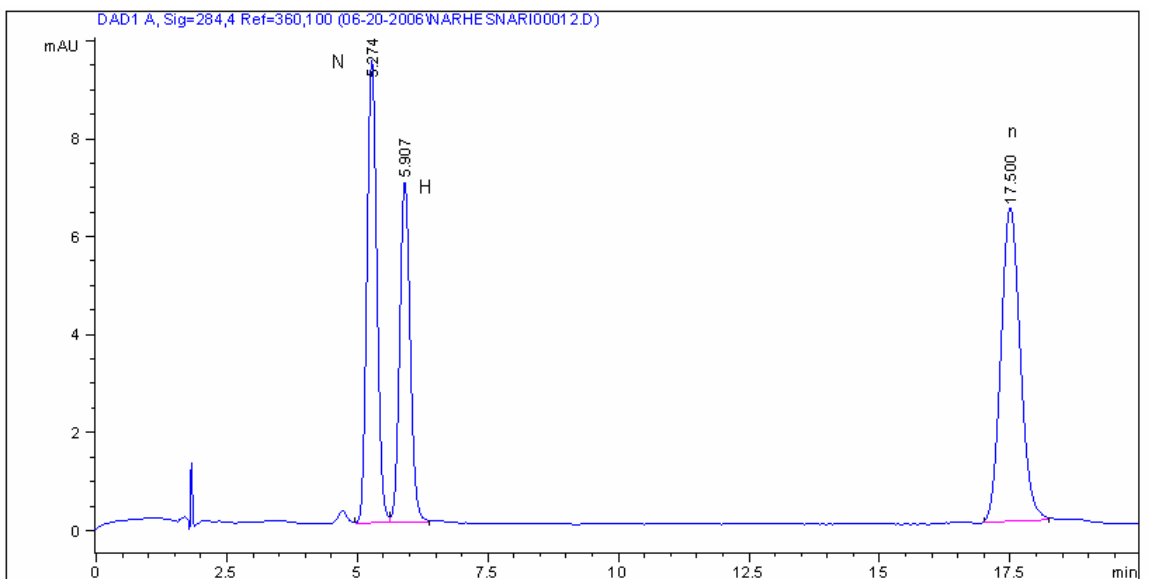
ACN:H<sub>2</sub>O (25:75)



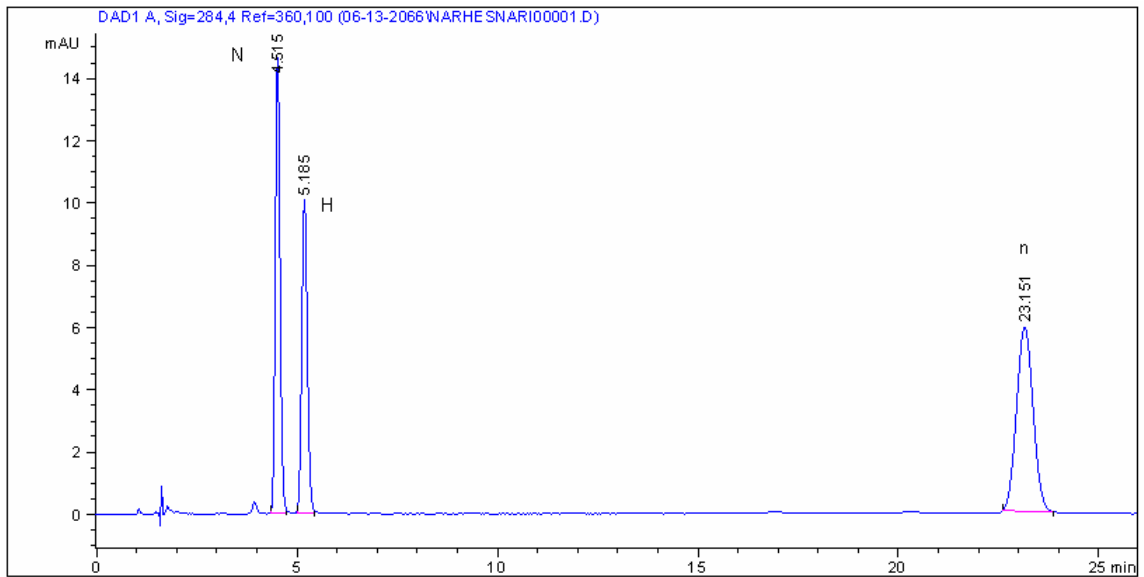
Metanol:Agua 35:65



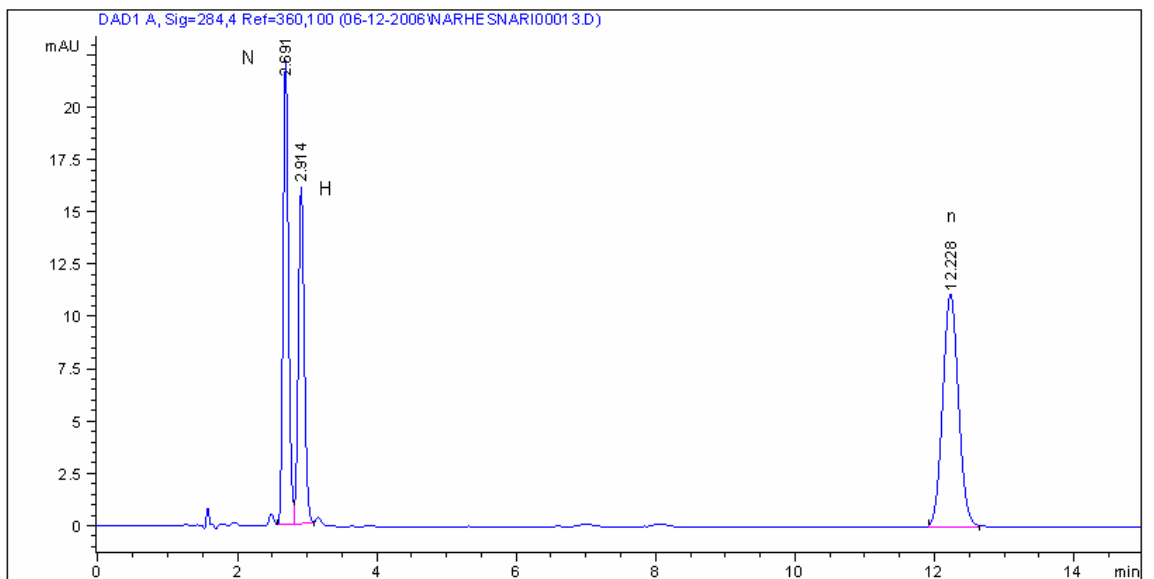
Metanol:Agua 40:60



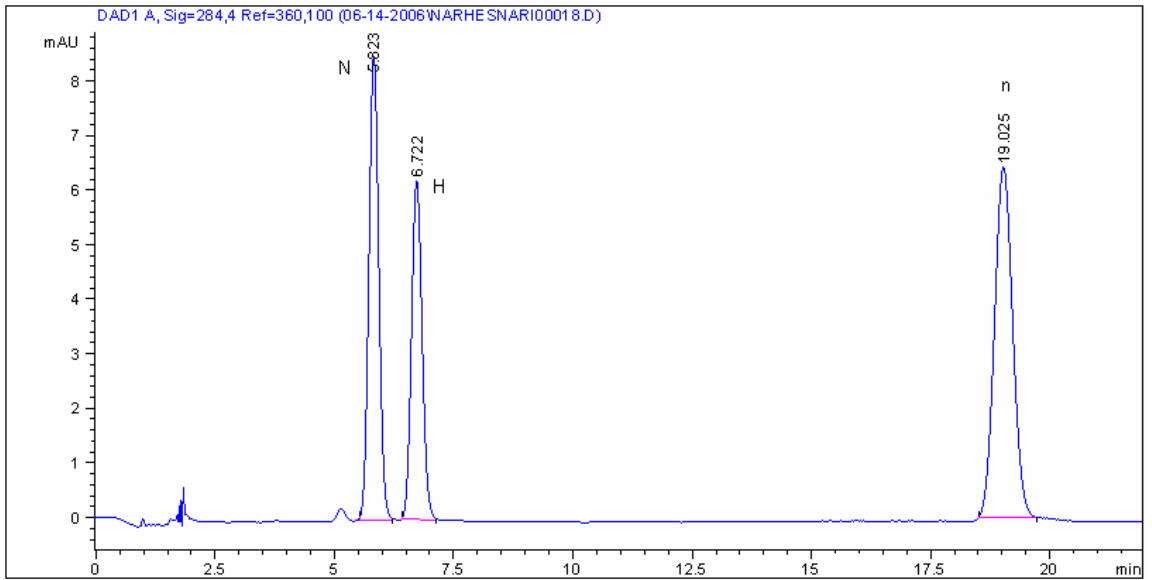
ACN:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 20:76.8:3.2



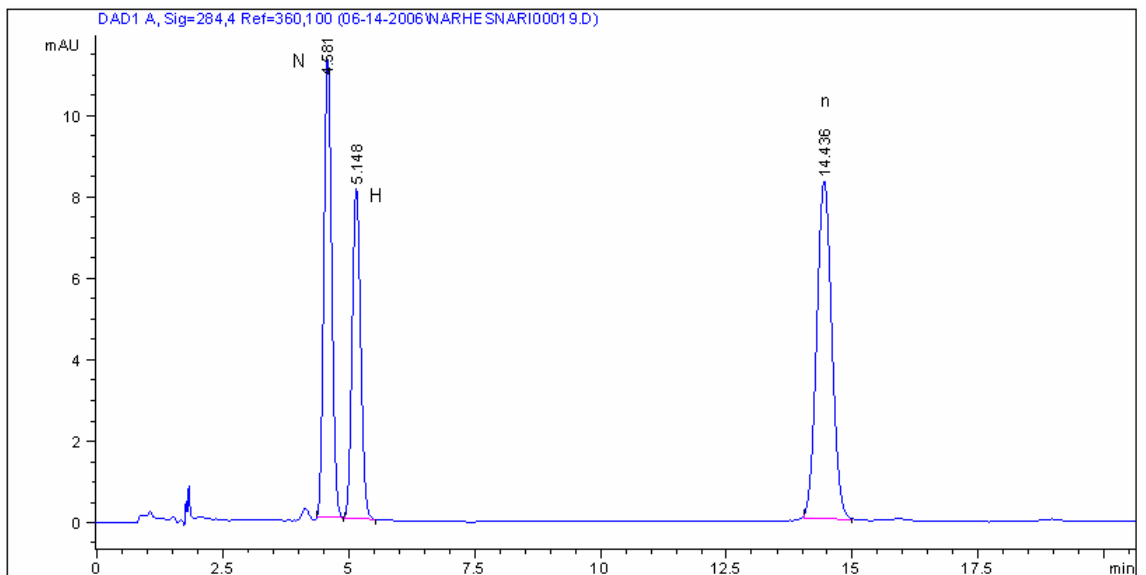
ACN:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 25:72:3



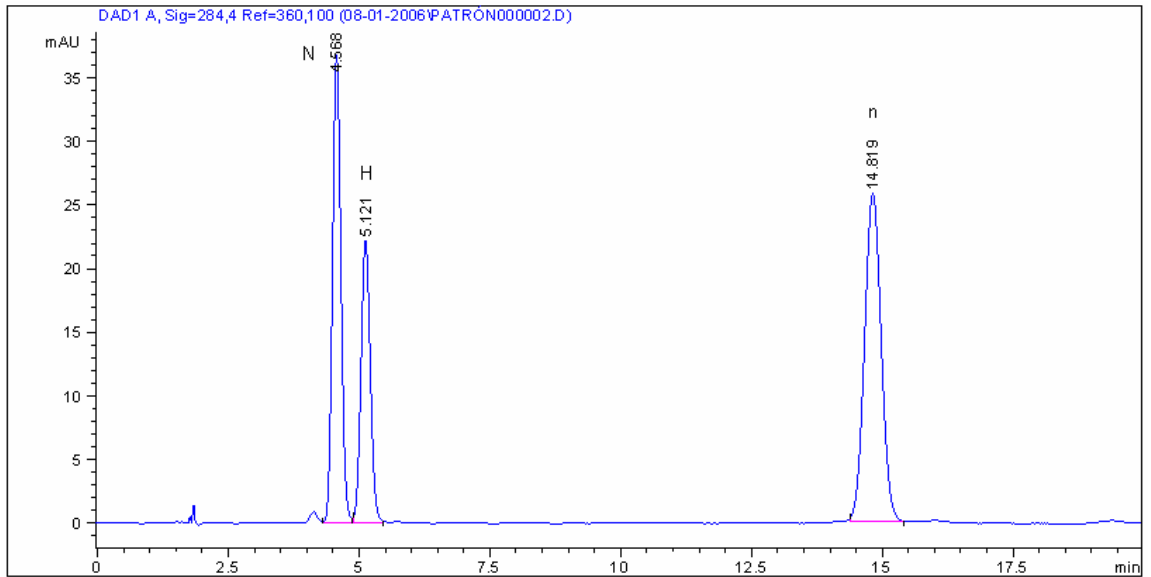
CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 35:62.4:2.6



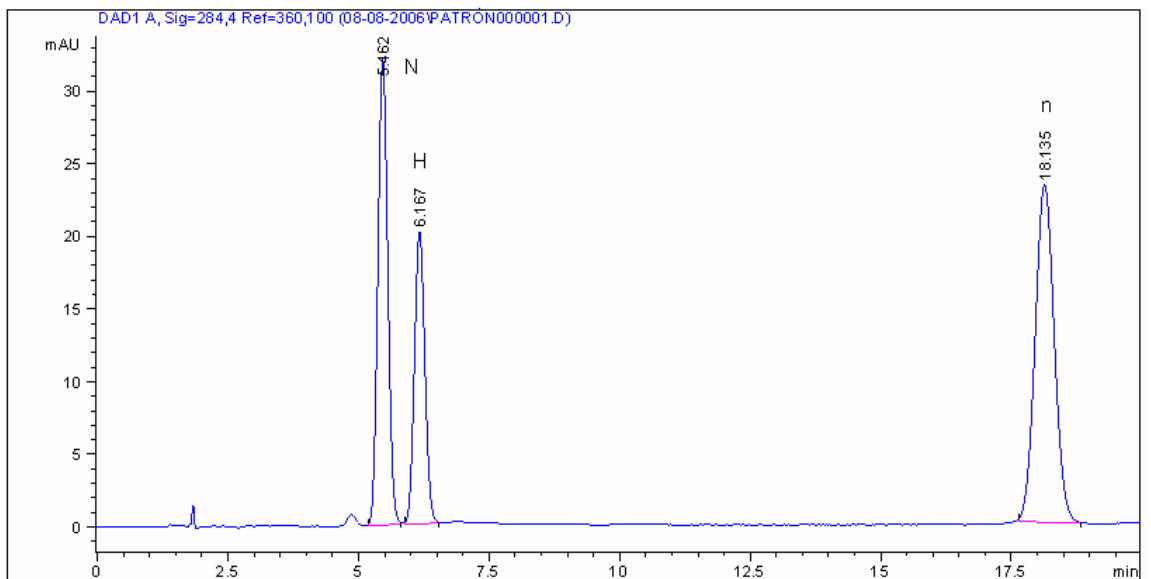
CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 38:59.5:2.5



CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 38:59.5:2.5



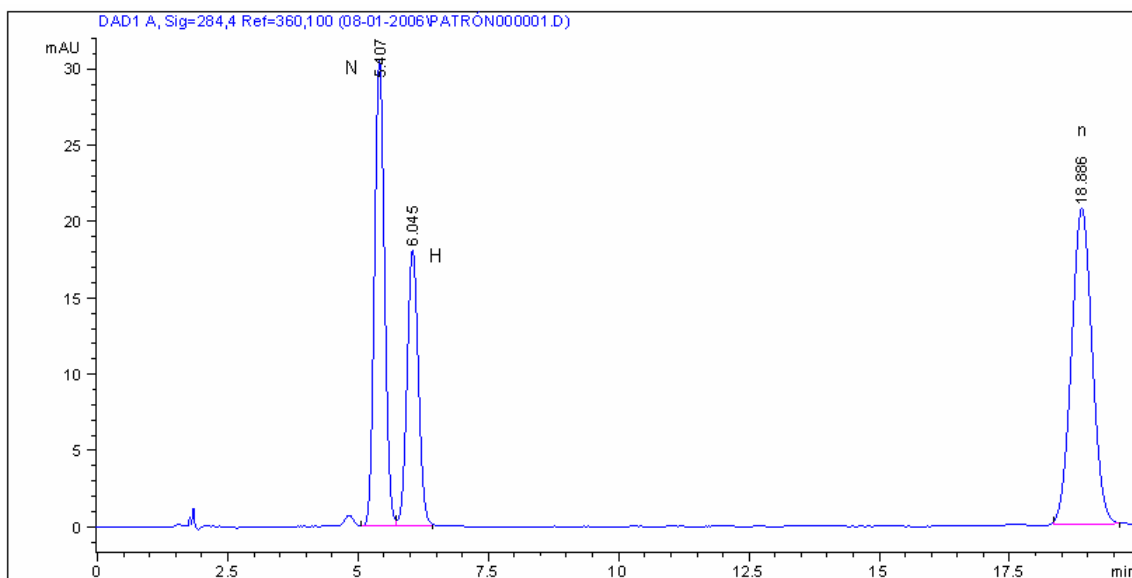
CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 38:61:1



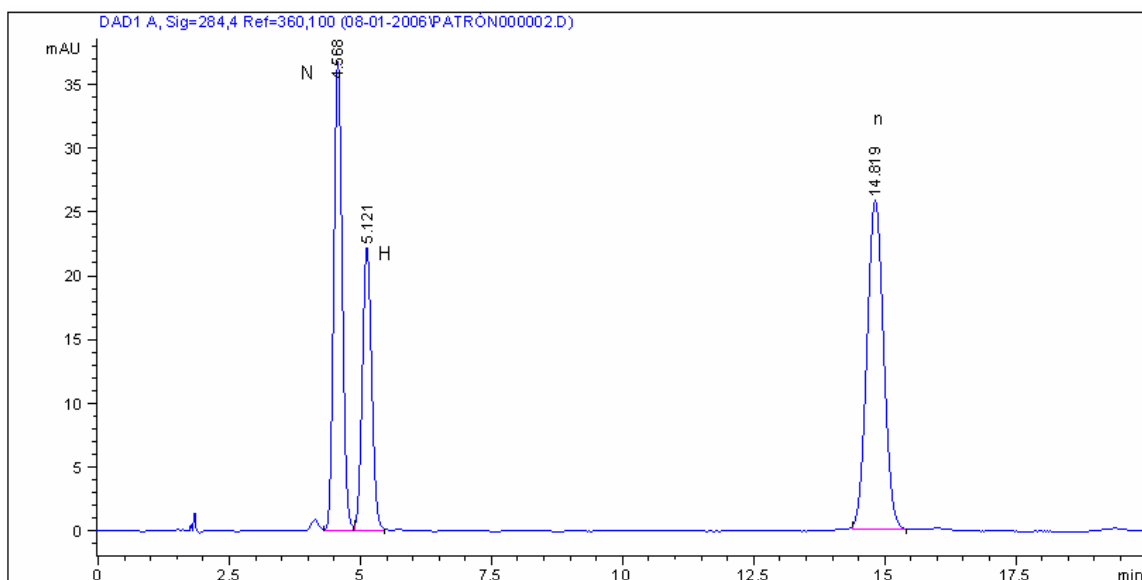
### 1.3 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Columna C-18  
Fase móvil: CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 38:59.5:2.5  
Flujo: 1mL/min

25°C.



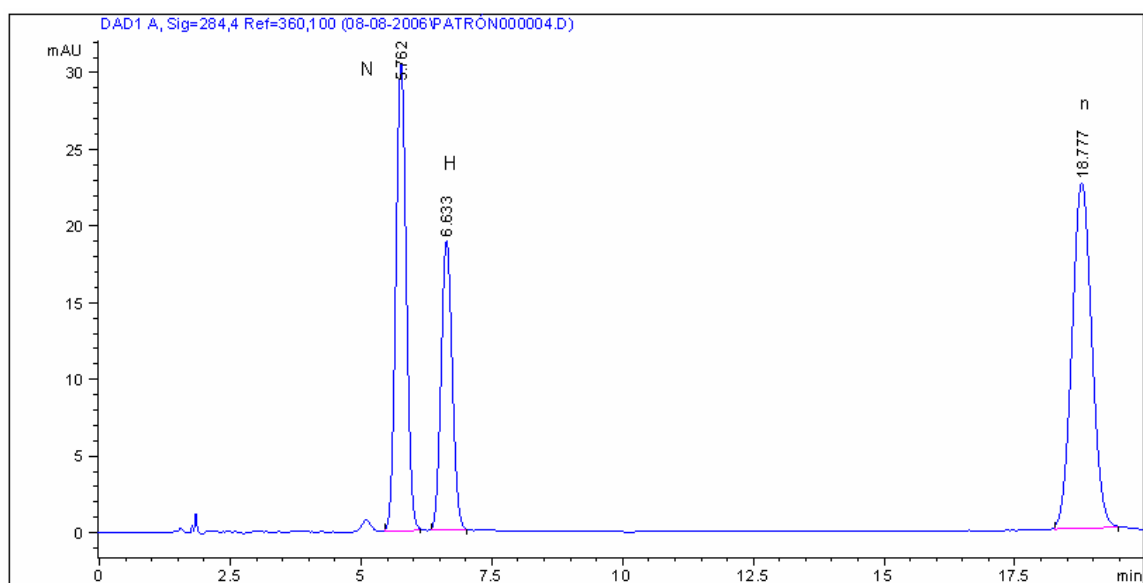
35°C.



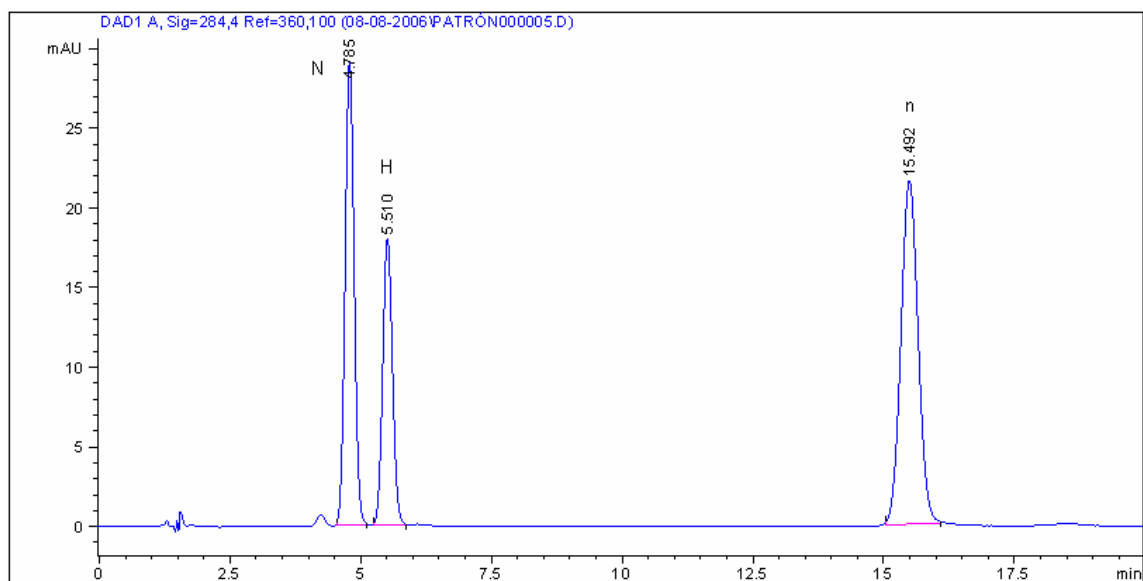
## 1.4 EFECTO DEL FLUJO

Columna C-18  
Fase móvil: CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 35:62.4:2.6  
35°C

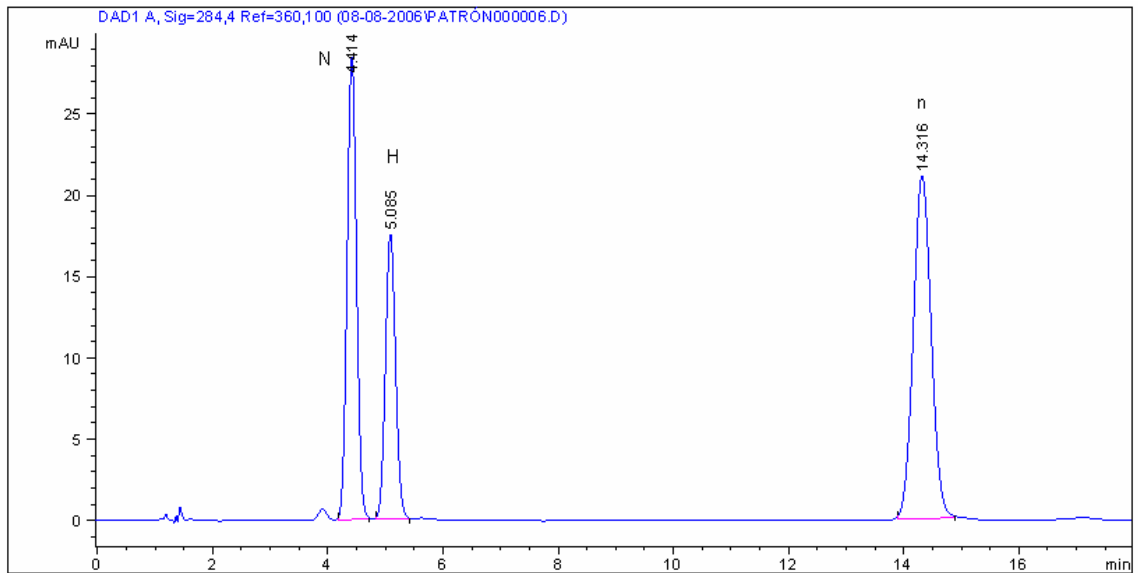
1mL/min



1.2mL/min

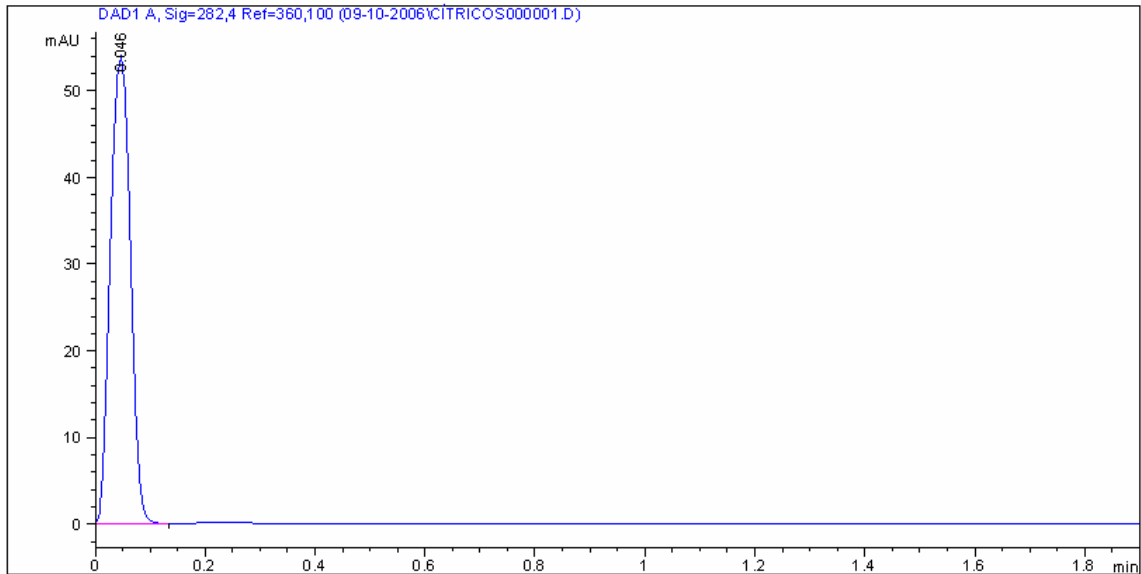


### 1.3mL/min

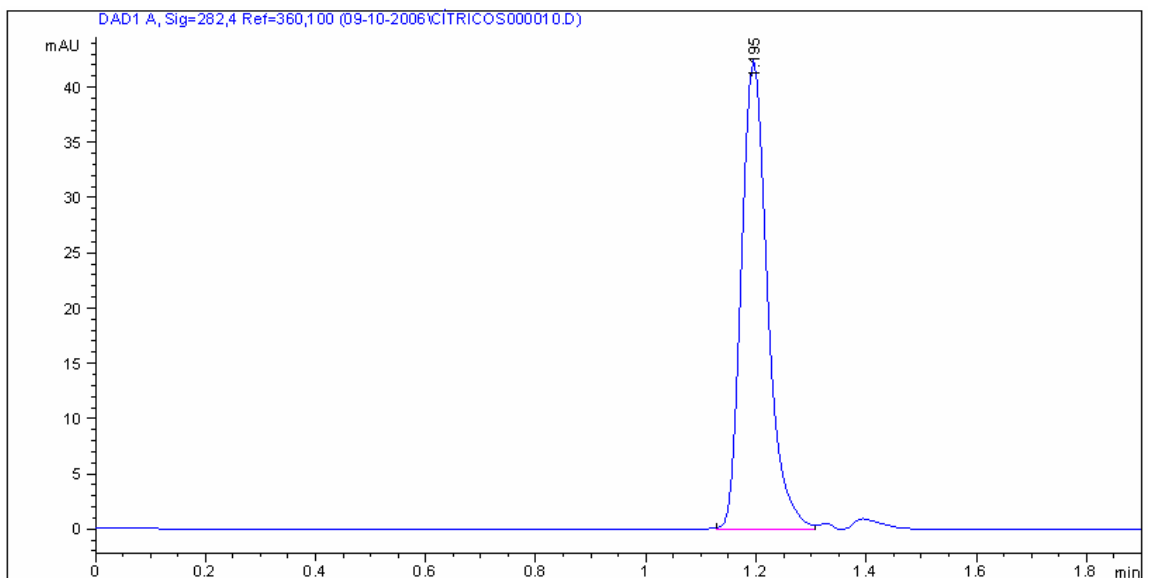


## 1.5 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO MUERTO DE LA COLUMNA

### TIEMPO DE RETENCIÓN DE LA TIUREA SIN COLUMNA NI PRECOLUMNA



### TIEMPO DE RETENCIÓN DE LA TIUREA CON COLUMNA Y PRECOLUMNA



**Tabla B. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA LAS DIFERENTES CONDICIONES DEL MÉTODO ANALIZADAS.**

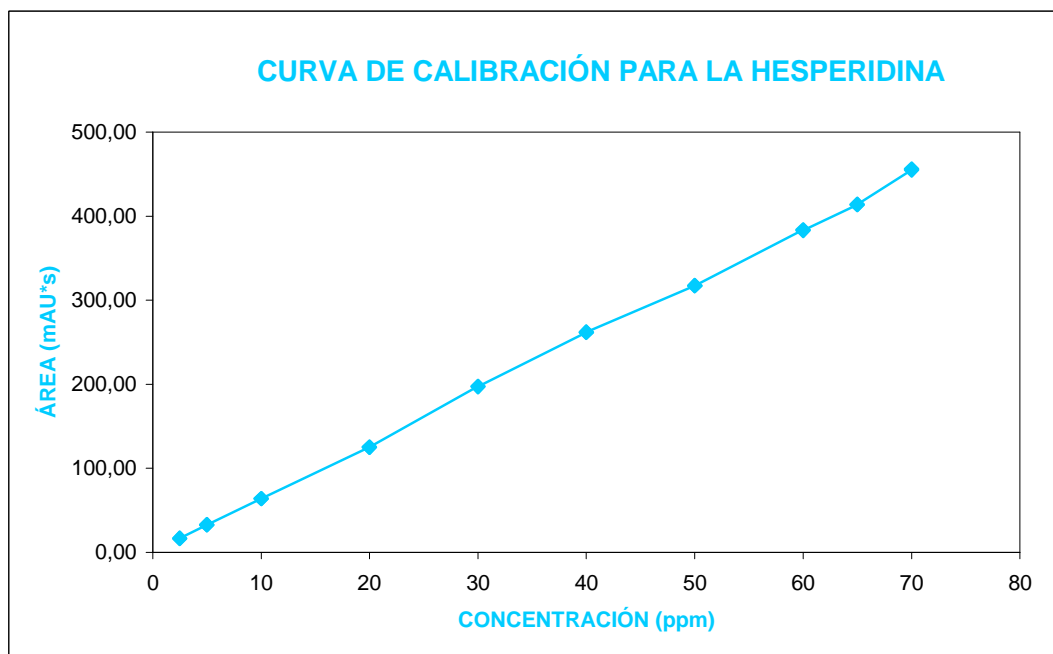
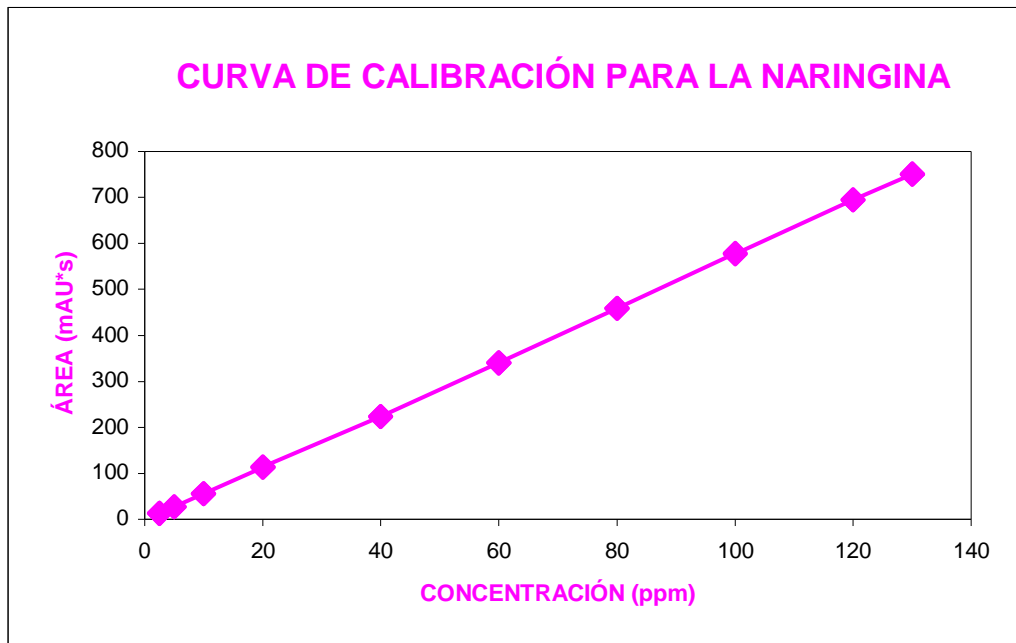
Fase móvil, v/v/v, mL	Temperatura, °C	Flujo, mL/min	Flavanona	k, min	$\alpha$	R
MeOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH 35,0:62,4:2,6	35	1,2	1. N.I.*	2,69		
			Naringina	3,16	1,18	1,87
			Hesperidina	3,80	1,20	2,14
			Naringenina	12,48	3,29	21,22
MeOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH 35,0:62,4:2,6	35	1,3	N.I.	2,40		
			Naringina	2,84	1,19	1,87
			Hesperidina	3,43	1,21	2,19
			Naringenina	11,46	3,35	20,68
MeOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH 38,0:61,0:1,0	35	1,2	N.I.	2,52		
			Naringina	2,95	1,17	1,75
			Hesperidina	3,46	1,17	1,87
			Naringenina	12,04	3,48	21,73
MeOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH 38,0:59,5:2,5	35	1	N.I.	2,59		
			Naringina	2,98	1,15	1,56
			Hesperidina	3,46	1,16	1,77
			Naringenina	11,90	3,44	21,23

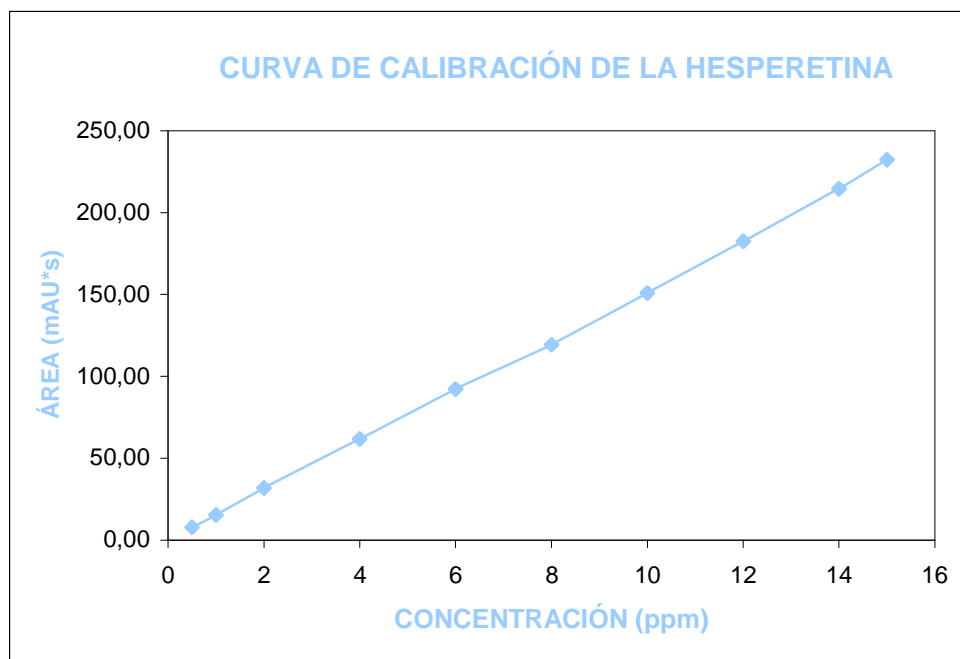
\* Impureza de la hesperidina presente en los jugos, por eso fue importante tener en cuenta su factor de separación con la naringina.

Las condiciones de la fila sombreada presentan los mejores factores de separación y la mejor resolución entre el compuesto 1 y la naringina y entre la naringina y la hesperidina, en el menor tiempo de corrida cromatográfica.

## ANEXO 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LAS FLAVANONAS ANALIZADAS.

POR ESTÁNDAR EXTERNO.





**POR ESTÁNDAR INTERNO.**

