



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Caracterización de compuestos fenólicos en extractos de origen vegetal

Alumno/a: Esther Robles Solano

Junio, 2021



UNIVERSIDAD DE JAÉN



Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Caracterización de compuestos fenólicos en cítricos

Esther Robles Solano

Jaén, Junio, 2021

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN:.....	2
1.1. Cítricos	2
1.2. Características botánicas de los cítricos	3
1.1.1. <i>Naranja amarga (C. Aurantium)</i>	3
1.1.2. <i>Citrus myrtifolia Raf: (Chnotta, Naranja moruno, naranja mirtifolia)</i>	4
1.1.3. <i>Citrus sinensis (Naranja dulce)</i>	5
1.1.4. <i>Citrus madurensis Lour (Naranja china)</i>	7
1.1.5. <i>Citrus excelsa Wester (Royal lemon)</i>	8
1.1.6. <i>Citrus limón (Limonero)</i>	8
1.1.7. <i>Citrus pyriformis (Limón ponderosa)</i>	9
1.1.8. <i>Citrus paradisi (Pomelo)</i>	9
2.COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS CÍTRICOS	10
2.1. Hidratos de carbono	11
2.2. Ácidos orgánicos	11
2.3. Compuestos nitrogenados	12
2.3.1. <i>Aminoácidos</i>	12
2.3.2. <i>Aminas</i>	12
2.3.3. <i>Proteínas</i>	12
2.3.4. <i>Vitaminas</i>	13
2.3.5. <i>Minerales</i>	13
2.3.6. <i>Lípidos</i>	14
2.4. Terpenos	14
2.4.1. <i>Carotenoides</i>	14
2.4.2. <i>Aceites esenciales</i>	14
2.4.3. <i>Limonoides</i>	14
3. COMPUESTOS FENÓLICOS	15
3.1. Principales familias de flavonoides en cítricos	16
3.1.1. <i>Flavonas</i>	17
3.1.2. <i>Flavanonas</i>	18
3.1.3. <i>Isoflavonas</i>	18
3.1.4. <i>Flavonoles</i>	19

3.1.5. Antocianinas	19
3.1.6. Flavanoles.....	20
3.2. Nomenclatura y estructura de los flavonoides.....	20
4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE COMPUESTOS FLAVONOIDES	22
4.1. Determinación del contenido total de compuestos flavonoides y ensayos de capacidad antioxidante	23
4.1.1. Mecanismos de reacción.....	23
4.1.2. Determinación del contenido total de compuestos flavonoides (Ensayo de Folin- Ciocalteau).....	24
4.1.3. Determinación del contenido total de flavonoides.....	25
4.1.4. Ensayo DPPH.....	26
4.1.5. Ensayo ABTS.....	27
4.1.6. Ensayo FRAP.....	28
5. SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.....	28
5.1. Técnicas cromatográficas utilizadas en separación, análisis cualitativo y cuantitativo de flavonoides	28
5.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	28
5.1.2. Espectrometría de masas	31
5.1.3. Otras técnicas cromatográficas.....	40
5.2. Otros métodos de separación y cuantificación de flavonoides.....	41
5.2.1. Electroforesis capilar (CE)	41
6. CONCLUSIONES.....	42
7. REFERENCIAS.....	43

RESUMEN

Los flavonoides son metabolitos secundarios de los vegetales encargados de proteger al organismo del daño producido por agentes oxidantes, tales como sustancias químicas presentes en alimentos, contaminación, entre otros, por lo que presenta un amplio campo de aplicación en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

En este trabajo de fin de grado, se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de los principales métodos para la identificación y cuantificación de los principales flavonoides presentes en cítricos. Se han incluido tanto los métodos utilizados para la determinación del contenido total de flavonoides como los ensayos de capacidad antioxidante. Estos últimos están basados en medidas de absorción molecular mientras que la separación, elucidación estructural y cuantificación de los flavonoides sencillos y conjugados se suele llevar a cabo mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

Palabras clave: *Citrus Rutaceae*, flavonoides, compuestos fenólicos, cromatografía.

ABSTRACT

Flavonoids are secondary metabolites of plants responsible for protecting the body from damage caused by oxidizing agents, such as chemical substances present in food, pollution, among others, so it has a wide field of application in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. In this work, a literature review of the main methods for the identification and quantification of flavonoids present in citrus fruits has been carried out. It covers the methods used to determine the total content of flavonoids, as well as antioxidant capacity assays. The latter are based on molecular absorption measurements while the separation, structural elucidation and quantification of simple and conjugated flavonoids is usually carried out by means of high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS).

Keywords: *Citrus Rutaceae*, flavonoids, phenolic compounds, chromatography.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Cítricos

Los cítricos, cultivados desde hace 4000 años, constituyen una de las especies más consumidas a nivel mundial. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, la superficie ocupada para la cosecha de cítricos a nivel mundial es de 7,72 millones de hectáreas, produciéndose al año 75 millones de toneladas de naranjas, entre 30 y 42 millones de toneladas de limones y entre 16 y 25 millones de toneladas de pomelos. El 30% de esta masa posee cantidades relativamente altas de flavonoides, los compuestos bioactivos que son objeto de estudio en este trabajo.

Los cítricos pertenecen a la familia Rutaceae del género *Citrus*, género con origen en las zonas del sur y sudeste de Asia, en particular en zonas templadas de China, Australia e Islas del Pacífico sudoccidental. (Scora,1975). Se caracterizan por la agradable fragancia que presentan debido a la flor de azahar y por el aporte adecuado de vitamina C (ácido ascórbico) con respecto a la cantidad diaria recomendada. (Milind S. Ladaniya,2008). Este ácido ascórbico, contribuye al sabor ácido que percibimos al consumirlos. Además, están constituidos por compuestos bioquímicos entre los que destacan los compuestos fenólicos, siendo el grupo principal los flavonoides, objeto de estudio de esta memoria. Además, contienen complejos de vitamina B y nutrientes que desempeñan funciones en el organismo como los nutraceuticos. (Zhang W, Zhou C, Chen K,2007)

Desde hace unas décadas hasta la actualidad, los flavonoides presentes en los cítricos poseen una gran importancia por los beneficios que aportan para la salud (**Figura 1**). Se han llevado a cabo estudios que demuestran que el consumo de flavonoides reduce el riesgo de sufrir algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y daños neuronales debido al estrés oxidativo y a la presencia de radicales libres (Rajadurai M, Stanely Mainzen, 2006).

El estrés oxidativo se puede entender como un desequilibrio celular que ocurre debido al aumento de radicales libres, hecho que conlleva una disminución de antioxidantes, produciéndose daños celulares que pueden desencadenar distintas enfermedades.

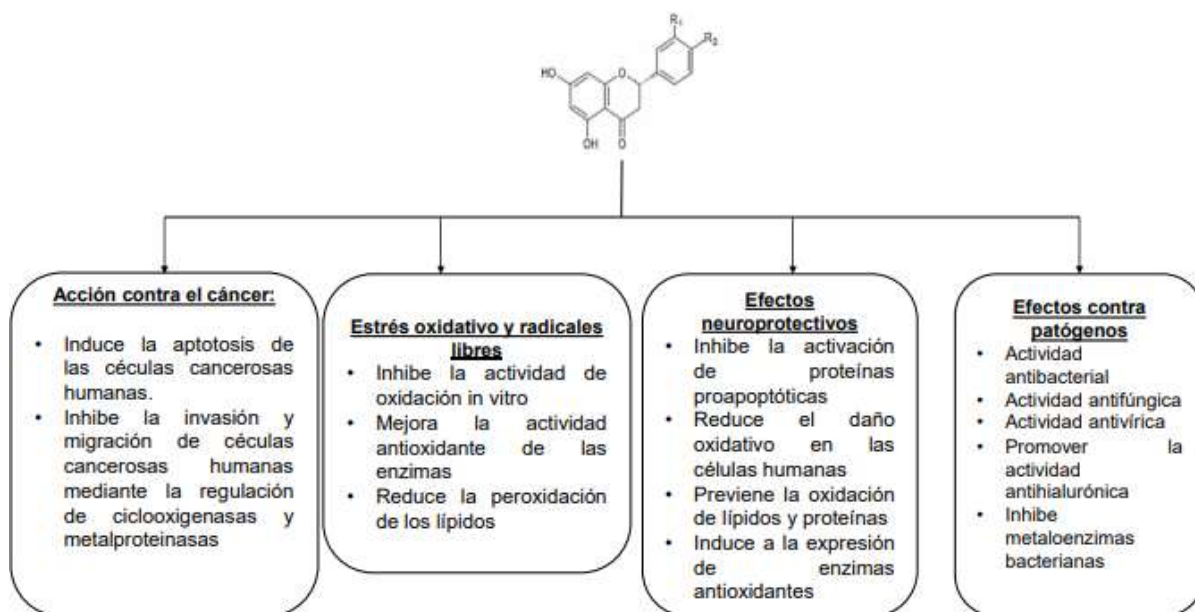


Figura 1. Algunas propiedades bioactivas de los cítricos flavonoides (Watson et al., 2019).

1.2. Características botánicas de los cítricos

Las rutáceas son una familia constituida por 160 géneros y 1600 especies, poseyendo la mayoría de ellas una notable importancia económica a nivel mundial. Las plantas que constituyen esta familia se caracterizan por ser angiospermas, leñosas y raramente herbáceas. Los cítricos son plantas que se desarrollan en climas templados-cálidos, resistentes a temperaturas en torno a 38-42°C, en condiciones en las que la tierra de cultivo se encuentre húmeda ya que son árboles no resistentes a la sequía

Grosso modo, los cítricos están constituidos por el tronco y ramas principales que contienen diversas ramificaciones en las que se encuentran tanto hojas como flores y frutos. Los árboles pueden alcanzar una altura de 3 a 15 metros. La clasificación del género *Citrus* es *muy compleja* debido a que se llevan a cabo procesos de hibridación y de apoximis (Xiang y Roose, 1988; García et al., 1999). Con respecto a los cítricos que van a ser objeto de estudio, podemos distinguir distintos tipos de especies que se describen a continuación.

1.1.1. Naranja amarga (*C. Aurantium*)

Especie con origen en las zonas límite de China y Birmania. Es un híbrido entre zamboa y mandarino. Los árabes llevaron a cabo su introducción en Europa, con fines

medicinales y como planta ornamental de jardín. Fue el primer cítrico que llegó al continente americano gracias a los españoles.

Es un árbol de tamaño mediano, rústico y resistente en el que se pueden apreciar espinas y hojas elípticas (**Figura 2 (izquierda)**). Contiene flores con pétalos blancos y anteras amarillas, las cuales desprenden un aroma muy agradable debido a la presencia de aceites esenciales, siendo el aceite de neroli el más destacado. Los frutos se caracterizan por ser esféricos, aunque también se pueden encontrar frutos achatados. Este fruto presenta una corteza de intensa tonalidad naranja, con un grosor característico y áspero al tacto. Su pulpa es de tonalidad naranja pálido teniendo en cuenta que las características principales son su acidez y su sabor amargo.

En relación a sus usos y aprovechamientos, se puede destacar la obtención de aceites esenciales procedentes tanto de las flores como de las hojas, la elaboración de mermelada de naranja amarga por parte de la cultura anglosajona. El uso más importante a tener en cuenta desde el punto de vista citrícola es la calidad que presenta al ser usado como patrón portainjertos.

1.2.2. Citrus myrtifolia Raf: (Chnotto, Naranja moruno, naranja mirtifolia)

Esta especie presenta su origen en la zona suroriental de China. Hay estudios que han considerado esta especie una variedad de naranja amarga (*Citrus Aurantium*), pero como no presentan muchas similitudes entre sí, hoy día se considera una especie totalmente independiente.

Es un árbol pequeño con crecimiento lento, poco robusto y con carencia de espinas. La copa del árbol es muy densa debido a que presenta ramas cortas, por lo que las hojas se encuentran muy próximas. Estas hojas son de tonalidad verde oscuro, son de tamaño pequeño y textura similar a la del cuero (**Figura 2 (derecha)**). Las flores, al igual que en la naranja amarga tiene pétalos blancos y anteras amarillas, con la diferencia de que son flores solitarias. El fruto es esférico y pequeño, cuya corteza es rugosa y de tonalidad naranja intensa. La pulpa es jugosa y de tonalidad naranja, destacando como características principales su sabor ácido y amargo. En relación a sus usos y aprovechamientos, su zumo se usa como aromatizante esencial en Italia en un aperitivo muy conocido denominado *Campari*. Como los frutos son demasiado amargos, se suelen consumir confitados.

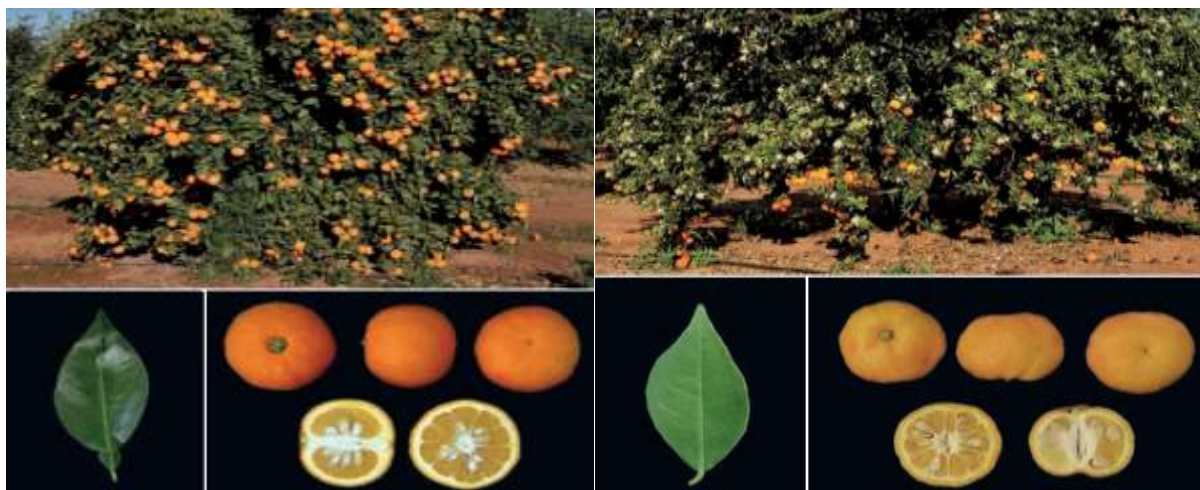


Figura 2 (izquierda). Árbol, hoja y fruto de *Citrus Aurantium* (Ancillo et al., 2014).

Figura 2 (derecha). Árbol, hoja y fruto de *Citrus myrtifolia* Raf. (Ancillo et al., 2014).

1.2.3. *Citrus sinensis* (Naranja dulce)

Es uno de los árboles más cultivados del mundo (Osbeck, 2018). Su zona de origen es el sur de China y la zona nordeste de India. Es una especie híbrida entre zamboa y mandarina.

Sus árboles son grandes y vigorosos en los que se pueden apreciar espinas en mayor o menor cantidad en relación a la variedad existente de este grupo. Contiene hojas elípticas y grandes. Destaca por presentar como flor la flor de azahar, que presenta pétalos blancos y anteras amarillas, y desprende un olor muy agradable. Sus frutos son de tamaño grande y redondeados, constituidos por una corteza naranja lisa al tacto y una pulpa jugosa y tierna, cuya tonalidad es una escala cromática entre naranja pálido y rojo sangre. Se caracterizan por contener gran cantidad de zumo y por su sabor dulce y ácido simultáneamente. En relación a sus usos y aprovechamientos, su principal uso es su consumo natural o en forma de zumo. A la hora de exprimir se obtienen la pulpa y la corteza, los cuales se pueden usar en la elaboración de piensos. Dentro del ámbito industrial, durante el período de floración se obtiene miel de azahar, además de la obtención de perfume de azahar.

Dentro de esta especie de naranjos, podemos destacar cuatro grupos:

- **Naranjas blancas.** Se incluyen aquellas que presentan pigmentación roja y escasa acidez (**Figura 3 (izquierda)**). Su cultivo se ha reducido mucho debido a las naranjas navelinas, naranjas de mejor calidad desde el punto de vista organoléptico. Su uso principal es la elaboración de zumo industrial. Las variedades a destacar de este tipo de naranjas son: *valenciana*, *pera* y *salustiana*.

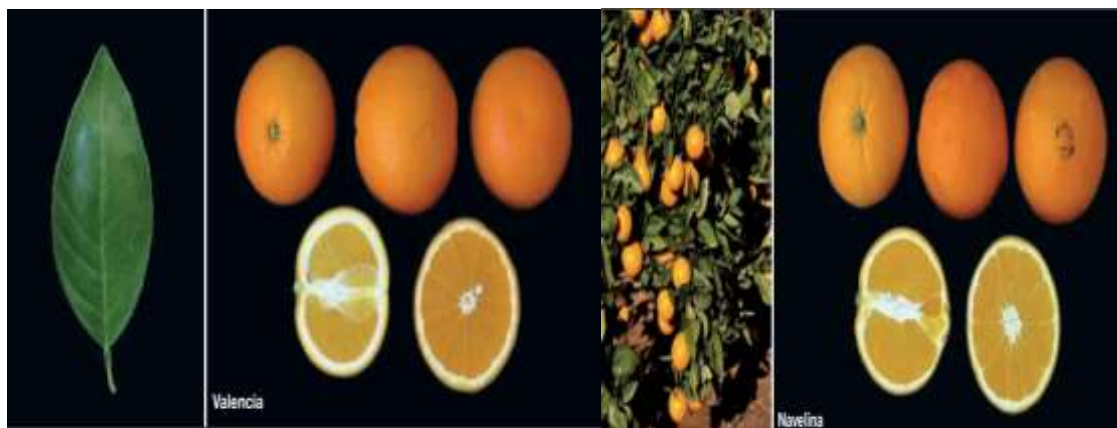


Figura 3 (izquierda). Hoja y fruto de naranja de Valencia (Ancillo et al., 2014).

Figura 3 (derecha). Hoja y fruto de naranja navelina (Ancillo et al., 2014).

- **Naranjas navelinas.** Se caracterizan por tener las anteras de las flores de color amarillo y por carecer de semillas (**Figura 3 (derecha)**). Desde el punto de vista organoléptico, son las naranjas de mejor calidad por lo que se consumen directamente. No son adecuadas para la elaboración de zumo ya que contienen una elevada cantidad de limonina, compuesto orgánico de la familia de las furanolactonas que le proporciona a la naranja un elevado amargor. Las variedades a destacar de este tipo de naranjas son: *navelina*, *Washington navel* y *lanelate*.
- **Naranjas del grupo sangre.** Presentan similitudes con las naranjas blancas, diferenciándose entre ambas por la presencia de pigmentos rojos denominados antocianos en la corteza, pulpa y zumo (**Figura 4 (izquierda)**). Su uso principal es la obtención de zumo rojizo, con una gran importancia en Italia. La variedad más destacable dentro de este grupo es la naranja sanguinelli.
- **Naranjas sucreñas.** Son las naranjas de peor calidad por lo que no presentan importancia comercial (**Figura 4 (derecha)**). Se diferencian de las naranjas blancas ya que el contenido de ácido de poseen es casi nulo. La variedad más destacable dentro de este grupo es la naranja *sucréña* o *imperial*.



Figura 4 (izquierda). Hoja y fruto de naranja sanguinelli. (Ancillo et al., 2014)

Figura 4 (derecha). Flor y fruto de naranja sucreña (Ancillo et al., 2014).

1.2.4. *Citrus madurensis* Lour (Naranja china)

Originario de China con rápida expansión en Indonesia y Filipinas. Sus árboles son medianos y densamente ramificados con escasas espinas, muy resistentes a bajas temperaturas y con una gran productividad. Posee hojas pequeñas, ovaladas y con un aroma característico (**Figura 5**). Sus flores contienen pétalos blancos y anteras amarillas. Su fruto es pequeño, achatado, de tonalidad naranja intenso, cuya pulpa es tierna y jugosa. Su corteza está caracterizada por ser muy fina y contener glándulas de aceite esencial. Este cítrico se considera el más ácido. Con respecto a sus usos y aprovechamientos, se destaca su zumo para la elaboración de bebidas refrescantes y condimentos para pescado. Presenta diversos usos medicinales como antiinflamatorio natural y remedio para la tos. Es un excelente acondicionador del cabello y destacable desodorante corporal.



Figura 5. Hoja y fruto *Citrus madurensis* Lour. (Ancillo et al., 2014)

1.2.5. *Citrus excelsa* Wester (Royal lemon)

Especie cultivada en Filipinas que debe su nombre al alto standing del que goza el país. Árbol de tamaño medio, con ramas entrecruzadas constituido por espinas finas y rectas. Hojas elípticas y flores caracterizadas por presentar trazas púrpuras en sus pétalos y anteras amarillas. Fruto de tamaño medio cuya tonalidad depende de su grado de madurez comprendida en una escala cromática verdosa-amarillenta (**Figura 6 (izquierda)**). Corteza lisa y fina y pulpa amarilla en la que se pueden apreciar gran cantidad de semillas. Caracterizado por presentar un sabor muy ácido.

1.2.6. *Citrus limón* (Limonero)

Su origen es desconocido, pero se puede localizar en el noroeste de la India, norte de Birmania y China (Burm, 2018). Árbol de gran tamaño caracterizado por la presencia de abundantes espinas pequeñas en las ramas. Presenta hojas grandes de tonalidad verde, que desprenden un aroma muy agradable a limón cuando son morteradas. Con respecto a sus flores, son flores grandes con pétalos de color púrpura que se pueden encontrar en distintas estaciones del año si las condiciones climatológicas son las adecuadas. Su fruto está caracterizado por presentar una corteza lisa y algo áspera de tonalidad amarilla al igual que la pulpa, caracterizada por ser jugosa y ser muy ácida (**Figura 6 (derecha)**).

En relación a los usos y aprovechamientos cabe destacar que los principales son la elaboración de zumo y aceites esenciales. El jugo de limón se caracteriza por ser diurético, astringente y febrífugo. La madera de este tipo de árbol es muy compacta y fácil de trabajar por lo que hay países como México en los que se talla para la elaboración de piezas de ajedrez, juguetes y cucharas de cocina.



Figura 6 (izquierda). Hoja y fruto *Citrus excelsa* Wester (Ancillo et al., 2014).

Figura 6 (derecha). Hoja y fruto *Citrus limon* (Ancillo et al., 2014).

1.2.7. *Citrus pyriformis* (Limón ponderosa)

Variedad originaria en 1887 en Hagerstown, cuya introducción comercial se llevó a cabo en 1900 (Hassk, 2015). Es un árbol pequeño, de crecimiento lento con presencia de escasas espinas cortas. Se pueden destacar sus hojas grandes e intensas de una tonalidad verde clarito. Además, sus flores son blancas con pétalos blancos y con anteras amarillas. Su fruto es grande, variando su tonalidad amarilla en función del grado de madurez, cuya pulpa es muy jugosa y amarilla caracterizada por la gran cantidad semillas y sabor ácido que presentan, por lo que se considera el fruto cítrico más ácido dentro de la variedad de los limones (**Figura 7**). Este fruto no se comercializa como tal, pero se usa como sustituto del limón tradicional debido a su sabor similar. Su uso principal es ser una planta doméstica.



Figura 7. Hoja y fruto *Citrus pyridormis* (Ancillo et al., 2014).

1.2.8. *Citrus paradisi* (Pomelo)

Es el cítrico más tardío en conocerse procedente de la Isla de los Barbados. Es un árbol grande con la peculiaridad de no presentar espinas, con la necesidad de ser sometido a altas temperaturas para proporcionar frutos de calidad, los cuales presentan una corteza lisa de tonalidad amarilla y rojiza, mientras que la pulpa es amarillenta caracterizada por presentar mucho zumo con un sabor característico debido a la presencia del flavonoide naringina y no presenta semillas (**Figura 8**). Contiene hojas grandes y elípticas de tonalidad verde oscuro, destacando también sus grandes flores con pétalos blancos y anteras amarillas.

El pomelo es considerado un fruto típico en el desayuno, tanto en zumo como en fresco debido a su alto contenido en vitamina C y en pectina, por lo que, en los años sesenta se consumía con el objetivo de perder peso. Sus flores se aprovechan para extraer esencias que ayudan a combatir el insomnio y para tratar dolores estomacales.



Figura 8. Fruto *Citrus paradisi* (Ancillo et al., 2014).

2.COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS CÍTRICOS

Los cítricos son alimentos con una gran aceptación a nivel mundial debido a su sabor y a la cantidad de nutrientes esenciales que presentan, además de la baja cantidad de calorías que aportan, por lo que su consumo diario es recomendado por la Organización Mundial de la Salud. En su composición, se encuentran diversas vitaminas, fibras y muchos compuestos obtenidos del metabolismo secundario (Figura 9).

Composición química de los cítricos

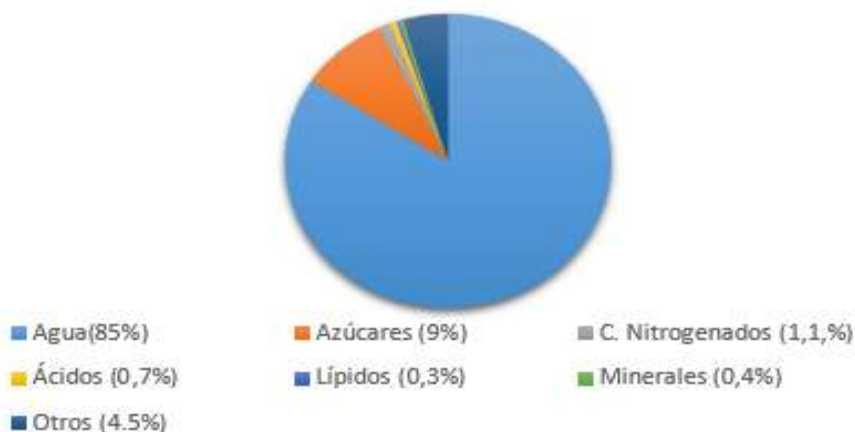


Figura 9. Gráfico resumen de la composición de los cítricos (Elaboración propia).

Los componentes de los cítricos, a su vez se clasifican en:

- **Componentes nutricionales.** Son esenciales para el ser humano. Se destacan: hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas, lípidos y minerales.

- **Componentes no nutricionales.** Son no esenciales, pero presentan beneficios para la salud. Pueden ser nutracéuticos o fitonutrientes.

2.1. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono contenidos en cítricos constituyen un 9 % del peso en seco y se pueden clasificar en:

- **Monosacáridos.** Constituyen las unidades monómeras de los hidratos de carbono. En los cítricos destacan las hexosas *D-Glucosa* y *D-Fructosa*, ya que son los azúcares reductores mayoritarios. En las naranjas se destacan la *manosa* mientras que en la lima y el pomelo se destaca la *arabinosa*.
- **Oligosacáridos.** Surgen de la unión de 2 a 9 monosacáridos cíclicos mediante enlaces covalentes, siendo la sacarosa el oligosacárido más abundante en los cítricos.

Tabla 1. Contenido en azúcares reductores y no reductores (g/100ml) (Chacón, 2014).

Especie	Azúcares reductores	Azúcares no reductores	Azúcares totales
Naranja	4,99	4,73	9,72
Pomelo	4,13	2,19	6,74
Limón	1,67	0,18	1,90

- **Polisacáridos.** Polímeros constituidos por la secuencia de monosacáridos unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos. En los cítricos destaca la presencia de la celulosa, hemicelulosa. En términos de fibra, cuyo contenido se encuentra entre el 1,1 y el 2,2%, destaca la pectina, cuya función es actuar como espesante natural cuando se lleva a cabo la unión de los ácidos de la fruta.

2.2. Ácidos orgánicos

Dentro de este grupo, el ácido más destacable es el ácido cítrico, responsable de más del 80% de la acidez total del fruto. Como característica principal se puede destacar que es un buen antioxidante natural. Otro ácido destacado es el ácido málico, que se emplea como aditivo alimentario. Ambos ácidos se encuentran tanto en la pulpa como en la corteza del fruto, encontrándose en la corteza en menor proporción.

2.3. Compuestos nitrogenados

Al igual que los hidratos de carbono, son de especial importancia tanto por su actuación como componentes estructurales como por su función en el metabolismo de los frutos. Constituyen el 1,1% del peso seco en los frutos cítricos. Este subgrupo se divide a su vez en:

2.3.1. Aminoácidos

Son los compuestos más abundantes de los compuestos nitrogenados. Hay que destacar que su concentración en zumo es mínima al igual que su valor biológico. Se caracterizan por su gran importancia en el crecimiento y desarrollo de los frutos.

2.3.2. Aminas

En los zumos cítricos se encuentran aminas como:

- **Octapamina.** Es una amina que ofrece propiedades para reducir la obesidad. Se encuentra en el limón ponderosa en una concentración de 4 mg/L.
- **Sineferina.** Amina estimulante del sistema nervioso central cuya función es la ruptura de las células de grasa. Se encuentra en la naranja navelina en una concentración entre 50 y 280 mg/L.
- **Tiramina.** Amina encargada de regular la presión arterial. Se encuentra en el limón ponderosa en una concentración de 25 mg/L.
- **Putrescina de ferulolilo.** Diamina causante del olor desagradable generado cuando se da la putrefacción de un alimento o fruto (Janne, 2016). Este compuesto se encuentra en los pomelos en una concentración de entre 15 y 41 mg/L.

2.3.3. Proteínas

Los frutos cítricos no son considerados una fuente importante de proteínas. A pesar de este hecho, el fruto cítrico que contiene mayor contenido de proteínas es la naranja de Valencia, cuya concentración en la pulpa es menor que en la corteza (60 mg/100g frente a 125mg/100g) y aun menor que el contenido de la semilla en la que se encuentra el 18% de proteínas sobre peso seco.

2.3.4. Vitaminas

Los cítricos contienen altas cantidades de vitaminas, siendo la más importante la vitamina C o ácido ascórbico, vitamina que presenta una gran capacidad antioxidante y una gran cantidad de beneficios que ayudan a mejorar la salud cardiovascular por lo que, la Organización Mundial de la Salud recomienda consumir diariamente entre 65-90 mg hasta una cantidad límite de 2000 mg. Se ha demostrado que un consumo en exceso no produce problemas de salud, pero si se consume de manera desorbitada puede generar diarrea. Otros tipos de vitaminas presentes en los frutos cítricos son las vitaminas del grupo B y la vitamina A o retinol, que se encarga del mantenimiento de los dientes además de tejidos blandos y óseos.

Tabla 2. Contenido de vitaminas más significantes en los frutos cítricos (mg o µg/100g de porción comestible (Chacón, 2014).

Vitaminas	Naranja de Valencia	Limón Ponderosa	Pomelo
Ácido Ascórbico (mg)	44	44	40
Ácido nicotínico (µg)	376	71	--
Ácido pantoténico (µg)	207	104	290
Piridoxina (µg)	57	51	--
Riboflavina (µg)	91	12	20-100
Tiamina (µg)	100	31	40-100

2.3.5. Minerales

Los minerales representan el 0,4% del contenido total en peso seco. Los minerales contenidos en los frutos cítricos proceden del terreno fértil en el que se desarrollan llegando así al organismo cuando se consumen.

Tabla 3. Contenido en minerales en los frutos cítricos de estudio -expresado en mg/100g o 100 ml de zumo- (Chacón, 2014).

Fruto	K	Ca	Mg	Fe	Cu	P	S	Cl	Na
Naranja (100ml)	179-320	5,4-15,6	7,3-15,3	0,2-0,4	0,05-0,06	17-21	4-4,6	2,1-5,6	0,2-2
Pomelo (100ml)	78-224	10-12,1	7,9-15	0,06-0,1	0,06-0,07	7-19	5,1-6	0,6-0,7	0,8-2,6
Limón (100g)	94-193	4,5-10,4	1-6,6	0,16-1	0,13	3-14	1-2	1-2,6	1-2,9

2.3.6. Lípidos

Los frutos cítricos están caracterizados por contener un bajo contenido en lípidos (0.3% en peso en seco) con un 50% de estos presentes en forma de fosfolípidos (Conesa, 2010). La mayor parte de la concentración se encuentra en las semillas en forma de ácidos grasos como el ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3).

2.4. Terpenos

2.4.1. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos de gran importancia que intervienen en la fotosíntesis de las plantas, ya que se encargan de protegerlas frente al daño foto-oxidativo ayudando a atrapar la luz (Goodwin,1980). Su importancia es debida a las insaturaciones que presentan, ya que atrapan radicales libres por lo que le confieren propiedades antioxidantes. Los carotenoides son esenciales en la dieta humana ya que son precursores de la vitamina A. Además, sirven para la prevención de enfermedades cancerígenas (Olson,1989). La cantidad de carotenoides que contienen los frutos cítricos dependen de la zona geográfica de la que provengan y de la variedad de cítrico de la que se trate (Goodlier et al, 2001).

2.4.2. Aceites esenciales

El aceite esencial está constituido por compuestos volátiles procedentes del metabolismo secundario de las plantas. Se localizan en las glándulas de aceite y se encargan del aroma característico de los frutos cítricos. El D-limoneno, monoterpeneo hidrocarbonado representa el 80-95% en peso del conjunto de aceites esenciales presentes en los frutos cítricos

2.4.3. Limonoides

Triterpenos constituidos por 26 átomos de carbono, responsables del amargor presente en los zumos y en las semillas. El limonoide más relevante en los cítricos es la *limonina*, la cual se encuentran en forma de ácido limonoico, seguido de la *nomilina* y la *obacumona*. El contenido de limonoides decrece conforme avanza la maduración del fruto.

3. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos constituyen los compuestos bioactivos más importantes presentes en la dieta humana ya que presentan actividad biológica dentro del organismo, desencadenando así múltiples beneficios: actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antioxidante, entre otras. (Creus, 2004) En los alimentos se suelen encontrar en forma de glucósidos (Muñoz, et al., 2007).

Los compuestos fenólicos surgen de la síntesis de metabolitos secundarios de los vegetales como consecuencia de su desarrollo normal y al estar sometidos a situaciones estresantes como contaminación y temperaturas extremas, entre otras. Están caracterizados por presentar en su estructura un anillo aromático con un grupo hidroxilo como radical (De la Rosa et al., 2018). El contenido de polifenoles disponible en vegetales depende de la variedad de la especie de la que se trate, la maduración del fruto y las condiciones de procesado del fruto. Un dato importante a destacar es que la distribución de los polifenoles en una especie vegetal no es uniforme ya que:

- Las capas externas contienen una concentración de polifenoles superior a la de las capas internas
- Los compuestos fenólicos insolubles se encuentran en las paredes celulares con la finalidad de aportarle resistencia mecánica. En relación a los compuestos fenólicos solubles, cabe destacar que se encuentran en las vacuolas.

Los compuestos fenólicos son responsables de la mayoría de características organolépticas de los productos alimentarios obtenidos de las plantas, proporcionándole así su color (presencia de pigmentos en tonalidades apreciables en escalas cromáticas amarillo-naranja y azul-rojo), su sabor, su olor y estabilidad ante la oxidación.

Distintos autores utilizan el término compuesto fenólico y polifenol de manera indistinguible, mientras que otros autores dictaminan que el término polifenol sólo debe usarse en casos en los que las moléculas estén constituidas por al menos dos anillos fenólicos (Cheynier, 2012), recalcando así que el uso indistinto de ambos términos surge como resultado de la gran mayoría de compuestos que son polifenoles (Creus, 2004).

Las pautas que se siguen para clasificar este tipo de compuestos no se encuentran definidas notoriamente. Teniendo en cuenta la complejidad química que presenta este grupo de compuestos se pueden clasificar en (Sánchez, Paniagua, 2009):

- Fenoles simples
- Ácidos fenólicos
- Acetofenonas y ácidos fenil acéticos
- Curaminas
- Benzofenonas y estilbenos
- Xantonas
- Flavonoides

Los compuestos fenólicos más relevantes en la dieta son los flavonoides que constituyen el 60% (Gómez, 2010), por lo que serán los compuestos objeto de estudio en esta memoria.

3.1. Principales familias de flavonoides en cítricos

Los flavonoides son compuestos naturales presentes en las distintas partes de una planta: hojas, semillas, cortezas, flores y fruto. Se encargan de proteger a la planta de la luz UV, parásitos y patógenos que le generen daños celulares oxidativos, siendo también responsables del color que presentan ciertas verduras, frutas y vinos (Cartaya y Reynaldo, 2018). Además, presentan actividad antioxidante, debido a la habilidad que los caracteriza para quelar metales con el objetivo de captar radicales libres, hecho que le confiere un papel protector de enfermedades como el cáncer, alteraciones del ADN, diabetes y envejecimiento, entre otras (Sánchez-Paniagua, 2008). Debido a todos los beneficios mencionados anteriormente, los flavonoides están siendo objeto de estudio por diversos científicos.

Los flavonoides están constituidos por un esqueleto carbonado de 15 átomos de carbono cuya estructura es $C_6-C_3-C_6$, donde C_6 son anillos aromáticos que se encuentran unidos por tres átomos de carbono para formar un tercer anillo pirano heterocíclico (Daglia, 2012). Las diferentes clases de flavonoides se distinguen en función del número y la posición de los grupos hidroxilo y en relación a los distintos grupos funcionales que puedan presentar. Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son los siguientes (Marín-Rangel, 2012).

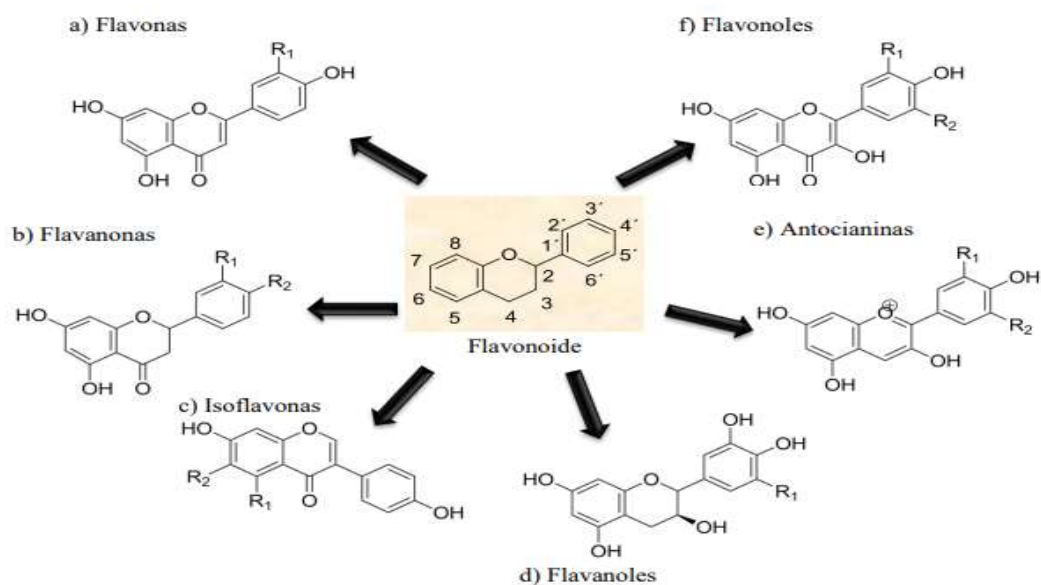


Figura 10. Estructura química de las diferentes clases de flavonoides (Marín-Rangel, 2012).

3.1.1. Flavonas

Caracterizadas por poseer un grupo ceto en el carbono 4 y una insaturación entre los carbonos 2 y 3. Son el tipo de flavonoides menos abundantes en los cítricos y se encuentran en los frutos cítricos en forma de compuestos de C-glucosilflavonas como pueden ser: diosmetina, diosmina y luteolina.

Tabla 4. Principales flavonas identificadas en cítricos (Ledesma Escobar et al., 2012).

Nombre del compuesto	Limón (Citrus limon)	Naranja dulce (Citrus sinensis)	Pomelo (Citrus paradisi)
Diosmetina		✓	✓
Diosmetina-Glu	✓		
Diosmetina-Glu-Rha	✓		
Diosmetina-Rha			✓
Diosmina	✓	✓	
Luteolina		✓	
Luteolina-Glu		✓	
Luteolina-Glu-Rha		✓	
Luteolina-Neo	✓		
Luteolina-Neo-Glu		✓	
Luteolina-Glu-Glu		✓	
Luteolina-Rut	✓		
Luteolina-Rha		✓	
Luteolina-sophoraside	✓		

3.1.2. Flavanonas

Surgen de la glucosilación que se lleva a cabo cuando se une un disacárido en el carbono siete de la estructura del flavonoide. Se encuentran en gran parte de los cítricos localizadas sobre todo en el albedo de la fruta (parte blanca), hecho que influye en la baja concentración de flavononas presente en los zumos de cítricos. Las flavononas presentes en los cítricos se encuentran en distintas formas:

- **Agliconas.** Constituidas por naringenina y hesperetina. Se encargan de aportarle al fruto poder terapéutico (Xu et al., 2007)
- **Glucósidos.** Constituidos por neohesperidósido (unión de naringeniruna y neohesperidina) y rutinósido (unión de narirutina y hesperidina) (Tripoli et. al. 2007). Se emplean como medicamentos que tratan las insuficiencias cardíacas.

Tabla 5. Principales flavanonas identificadas en cítricos (Ledesma Escobar et al., 2012).

Nombre del compuesto	Limón (Citrus limon)	Naranja dulce (Citrus sinensis)	Pomelo (Citrus paradisi)
Hesperitina	✓	✓	
Hesperitina-Rha	✓	✓	
Hesperitina-Rha-Glu	✓	✓	✓
Hesperidina	✓	✓	
Naringenina		✓	
Naringenina-Rha		✓	✓
Naringenina-Rha-Glu		✓	✓
Naringina	✓	✓	✓
Narirutina		✓	✓
Neohesperidina	✓	✓	✓

3.1.3. Isoflavonas

Las isoflavonas están constituidas por la posición en el carbono 3 de un anillo bencénico. Además, poseen grupos hidroxilos en los carbonos C7 y C´4. Las isoflavonas se presentan en forma de agliconas conjugadas con glucosa debido a que puede llevarse a cabo su hidrólisis cuando son sometidas a procesamiento industriales y durante su conservación. Se suelen encontrar en plantas como la soja en mayor cantidad, pero también se encuentran en cítricos como las naranjas. (Quiñones, 2012). Hay estudios que demuestran que las isoflavonas se encuentran

en los alimentos en cuatro formas: aglicona, 7-O-glucosido, 6''acetyl-7-Oglucosido y 6''-O-malonyl-7-O-glucosido (De la Rosa et al.,2018).

3.1.4. Flavonoles

Se caracterizan por presentar en el carbono 4 un grupo ceto y una instauración entre los carbonos 2 y 3, en el cual se percibe la presencia de un grupo hidroxilo. Los flavonoles son el grupo más destacable dentro de los polifenoles. Los flavonoles surgen por biosíntesis en el proceso de fotosíntesis, hecho que determina su localización sobre todo en el tejido exterior y el resto de la planta. Un hecho muy importante a destacar es que la concentración de flavonoles de la planta dependerá del grado de exposición que tenga ésta al sol (Quiñones, 2012). Dentro de la familia de los cítricos, los flavonoles con mayor presencia son la rutina y la miricitina, ambas presentes en el jugo de limón, mientras que la quercetina y kaempferol se encuentran a su vez en el jugo y en las cáscaras (González-Molina et al., 2010).

Tabla 6. Principales flavonoles identificados en cítricos (Ledesma Escobar et al., 2012).

Nombre del compuesto	Limón (<i>Citrus limon</i>)	Naranja dulce (<i>Citrus sinensis</i>)	Pomelo (<i>Citrus paradisi</i>)
Kaempferol		✓	
Kaempferol-Glu		✓	
Kaempferol-Rha		✓	✓
Kaempferol-Rut	✓		
Kaempferol-Rut-Glu		✓	
Quercetina		✓	
Quercetina-Rha		✓	✓
Quercetina-Rha-Glu		✓	
Quercetina-Glu-Rha-Glu	✓		
Quercetina-Neo	✓		

3.1.5. Antocianinas

Están constituidas por una molécula de antocianidina, especialmente una aglicona que se encuentra unida con un azúcar mediante un enlace glucosídico. La estructura básica de la aglicona es un ion flavilio, constituido por un benzopirilio y un anillo fenólico. Son compuestos hidrosolubles que constituyen un grupo muy importante de pigmentos vegetales (Collado, 2011). Las antocianidinas se pueden encontrar en

cereales, vino y sobre todo en vegetales, apareciendo en su mayoría en frutas cítricas (De la Rosa., 2010).

3.1.6. Flavanoles

Se caracterizan por contener un anillo saturado y un grupo hidroxilo en la posición del carbono 3. Se pueden encontrar como monómeros o como polímeros dependiendo del grado de polimerización. Los flavanoles más característicos en los alimentos son de tipo flavan-3-ol (Daglia, 2012), clasificándose en monómeros (catequinas) y en forma de oligómeros (procianidinas). En literatura se destaca que la catequina y la epicatequina son los compuestos mayoritarios en las frutas.

Tabla 7. Efectos que aportan en la salud los compuestos flavonoides (Manchón, 2015).

Compuesto fenólico	Efectos en la salud
Flavanoles	• Presentan efecto antioxidante y cardioprotector • Evitan padecer enfermedades cognitivas
Flavonas	• Proporcionan menores índices de masa corporal • Efectos antiobesidad • Beneficios sobre enfermedades cardiovasculares debido a la mejora de la función endotelial
Flavonoles	• Presentan propiedades antihistamínicas y antioxidantes. • Intervienen en la mejora de la salud cardiovascular y neurológica.
Isoflavonas	• Efecto protector de cáncer de mama • Efecto protector de enfermedades neurodegenerativas • Alivio ante los síntomas de la menopausia
Antocianinas	• Refuerzan el sistema cardiovascular • Potente efecto antioxidante • Ayudan a combatir resfriados, infecciones y alergias • Presentan propiedades anticancerígenas
Flavanoles	• Efectos antioxidante y cardioprotector

3.2. Nomenclatura y estructura de los flavonoides

Como se ha mencionado anteriormente, dependiendo de la ciclación y grado de insaturación del segmento de 3 átomos de carbono, se puede llevar a cabo una clasificación de los flavonoides en distintas familias. En las plantas, los flavonoides se pueden encontrar en una diversidad de formas modificadas debido a procesos de hidroxilación, metilación y glucosilación adicional, siendo este último la modificación más importante (Wiley et al, 2004).

Comúnmente, los flavonoides se presentan como flavonoides O-glucósidos, caracterizados por la unión de uno o varios grupos hidroxilo de la aglicona a un azúcar mediante un enlace O-C glucosídico. Este hecho aumenta la solubilidad del flavonoide y reduce su reactividad, por lo que se considera un mecanismo de protección de las plantas contra daños citoplasmáticos ya que se almacenan de forma segura en la vacuola celular (Harborne et al.,1982). Por lo general, cualquiera del grupo hidroxilo presente se puede encontrar glucosilado, favoreciéndose posiciones como el grupo 7-hidroxilo en las flavonas, flavanonas e isoflavonas; los 3 y 7-hidroxilos en flavonoles, entre otros. Los glucósidos no suelen ser frecuentes en compuestos con grupos carbonilo en la posición 4, ya que el grupo 5-hidroxilo participa en el enlace de hidrógeno con el grupo 4-carbonilo adyacente (Wiley et al, 2004). El azúcar más común para el proceso de glucosilación es la glucosa, siendo muy poco frecuentes otros azúcares como la galactosa y la xilosa (Markham,1982).

Aparte de los flavonoides O-glucosídicos, podemos encontrar flavonoides C-glucosídicos en donde la glucosilación también se lleva a cabo mediante la unión directa del azúcar al núcleo básico del flavonoide debido a la formación de un enlace C-C.

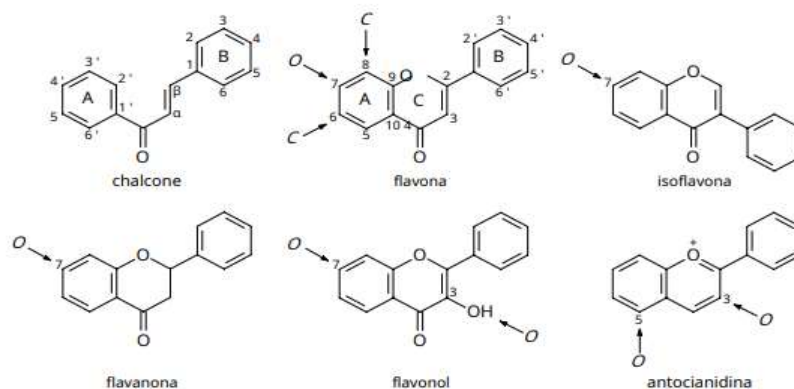


Figura 11. Estructuras básicas de las principales clases de flavonoides, con indicaciones de las posiciones glucosídicas mediante flechas (Cuykens y Clays, 2004).

Los iones procedentes como producto de los glicoconjugados se interpretan mediante la nomenclatura de Dormon y Costello (Dormon y Costello, 1988). En esta nomenclatura, los iones que contienen la aglicona se encuentran etiquetados como k_l , X_j , Y_j y Z_j , siendo j el número de enlaces interglucosídico roto contando desde la aglicona, mientras que los superíndices k y l la zona de corte dentro de los anillos carbohidratados. El enlace glucosídico que une el glucano con la aglicona se numera con el número 0. Cuando la carga se sitúa en el residuo de carbohidrato, los

fragmentos obtenidos son nombrados como $k,l A_l, B_l$ y C_l , donde l ($l > 1$) representa el número de enlaces glucosídicos rotos, contando desde el extremo no reductor.

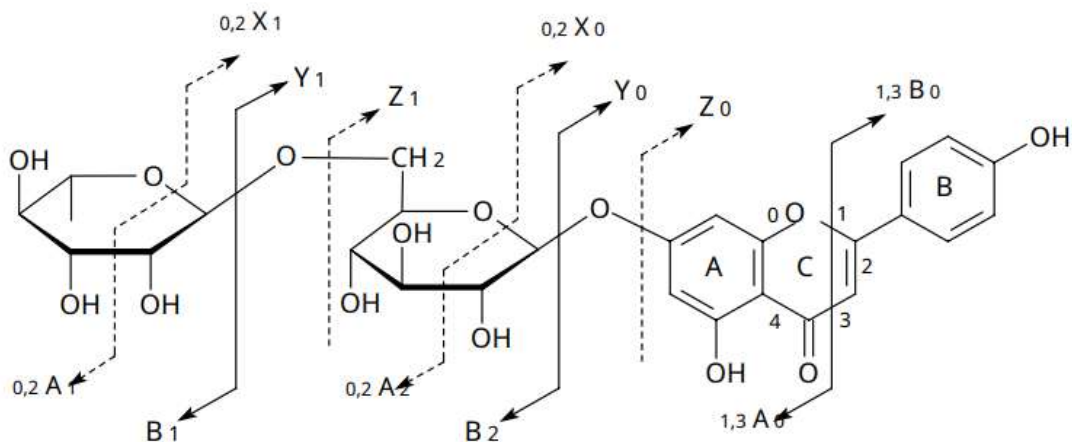


Figura 16. Nomenclatura de iones utilizada para los derivados glucosidos flavonoides. Ilustración de la apigenina 7-O rutinósido (Cuykens y Clays, 2004).

4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE COMPUESTOS FLAVONOIDES

Con la determinación del contenido total de compuestos flavonoides no se puede llevar a cabo directamente la medida de la capacidad antioxidante, pero si se puede en el caso en el que el método se combine con métodos para determinar la actividad antioxidante (Aldana Pérez, 2014). Se puede considerar que la espectrofotometría UV-VIS es la técnica idónea para llevar a cabo la medida de los fenoles totales debido a su bajo coste y a su simplicidad (Ignat el al., 2011).

Un aspecto a tener en cuenta es que la actividad antioxidante no se puede determinar con el empleo de un único método, por lo que se necesita la estandarización del método analítico evaluador de la capacidad antioxidante con mucha meticulosidad (Alam et al., 2013). Los requisitos que necesita cumplir un método estandarizado cuya finalidad es evaluar la capacidad antioxidante son los siguientes (Prior et al., 2015):

- Ser un método sencillo
- Presentar una asequible reproducibilidad
- Aceptar distintas fuentes radicales
- Flexible en los ensayos de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos

- Poseer instrumentación con facilidad de disponibilidad
- Método bien definido con la presencia de punto final
- Factible para la realización de análisis rutinarios a gran escala

Seguidamente, se describen algunos de los métodos más utilizados para la determinación total del contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante.

4.1. Determinación del contenido total de compuestos flavonoides y ensayos de capacidad antioxidante

4.1.1. Mecanismos de reacción

Los antioxidantes ofrecen la inactividad de los radicales a través de dos vías principales en las cuales el resultado es similar, a excepción de las reacciones colaterales y la cinética que presenta cada uno de ellos (Huang et al.,2005)

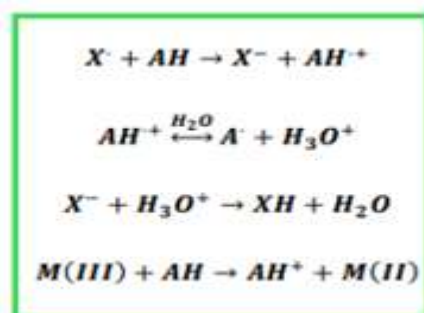
- Reacciones de transferencia de átomo de hidrógeno: Hydrogen Atom Trans HAT.
En las reacciones de transferencia de hidrógeno (reacciones HAT), la inactividad del radical se lleva a cabo mediante la donación de un átomo de hidrógeno procedente del antioxidante



Esquema 1. Reacción de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT)

Como resultado, el radical formado presenta una estabilidad superior a la del radical inicial. Este tipo de reacciones están condicionadas por la entalpía de disociación del grupo donador de hidrógeno en la molécula antioxidante. Un dato relevante sobre las reacciones HAT es que dependen del pH y del disolvente en el que ocurra la reacción, siendo reacciones muy rápidas (Huang et al.,2005).

- Reacciones de transferencia de un electrón: Single Electron Transfer, SET
En las reacciones de transferencia de electrón (reacciones SET), el antioxidante transfiere uno de sus electrones para reducir cualquier compuesto, incluidos metales, carbonilos y radicales.



Esquema 2. Reacciones de transferencia de un electrón (SET)

La reactividad en la reacción SET surge principalmente de la desprotonación y del potencial de ionización del grupo funcional que reacciona, por lo que dependen del pH, apreciándose un incremento de éste cuando aumenta la capacidad donadora de los electrones cuando se desprotonan.

En las situaciones en las que $AH^{\cdot+}$ presenta un tiempo de vida alto, las reacciones secundarias dan lugar a interferencias que afectan a la sensibilidad del ensayo en presencia de trazas de contaminantes y metales dando como resultado una alta variabilidad, poca reproducibilidad y poca consistencia de los resultados (Prior et al., 2005)

4.1.2. Determinación del contenido total de compuestos flavonoides (Ensayo de Folin- Ciocalteu)

Este método fue desarrollado por Folin en el año 1927 con la finalidad de determinar el contenido total de compuestos flavonoides, sufriendo una posterior modificación por Singleton y Rossi. Es el más empleado para determinar el contenido total de compuestos flavonoides en alimentos y plantas. Su objetivo principal es evaluar la capacidad antioxidante de extractos de hierbas, plantas, cereales, entre otras. En sus inicios, fue diseñado para llevar a cabo la determinación total de forma indirecta mediante la medida del contenido de tirosina y triptófano.

La naturaleza química del reactivo de Folin-Ciocalteu no se puede definir con exactitud, pero está compuesto por una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico que se reducen y adquieren una tonalidad azul, con una absorción máxima a 765 nm (Shahidi, Zhong, 2015).

El ensayo de Folin-Ciocalteu está basado en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por compuestos flavonoides en medio alcalino para dar a lugar a un

cromóforo de color azul cuyo máximo de absorción se encuentra a 765 nm (Shahidi y Zhong, 2015). La intensidad de la tonalidad azul obtenida es directamente proporcional a la concentración de grupos hidroxilo presentes en la muestra objeto de estudio (Avella, 2008). Como estándar de referencia se emplea el ácido gálico por lo que los resultados del contenido total de fenoles se expresan como equivalentes de ácido gálico (Shahidi y Zhong, 2017). Dependiendo el tipo de muestra, el resultado se puede referir al compuesto más abundante de la fracción de compuestos flavonoides. El método de Folin-Ciocalteu está basado en una reacción oxidación-reducción cuyo mecanismo es el siguiente:

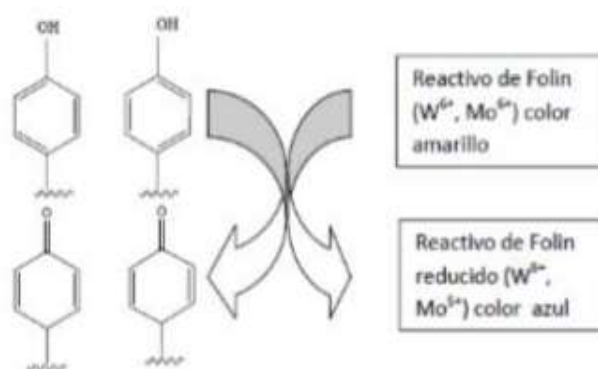


Figura 12. Mecanismo de reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Para que ocurra la reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con los compuestos flavonoides tiene que darse a pH 10, lográndose gracias a la adición de carbonato sódico. Este método presenta como inconveniente la presencia de otros compuestos reductores que puedan reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu dando a lugar a interferencias que afectan a la determinación exacta del contenido de compuestos flavonoides (Sánchez et al., 2013). Como ventajas, hay que destacar que se trata de un método sensible, preciso y con alta reproducibilidad (García Martínez, 2015).

4.1.3. Determinación del contenido total de flavonoides

Este ensayo fue desarrollado por Woisky y Salatino basado en la medida de la capacidad quelante que presentan los flavonoides. Para ello, estos autores usaron $AlCl_3$ que, al reaccionar con los flavonoides dan como producto, complejos de tonalidad amarillo intenso medidos a partir de métodos espectrofotométricos. La medida de la absorbancia se realiza a 420 nm, utilizándose la quercetina como estándar de referencia. Este método fue modificado por Chang en 2002, con la adición de acetato

de potasio después del AlCl_3 , y medida de la absorbancia a 415 nm, manteniéndose la quercetina como estándar de referencia. El método descrito anteriormente es útil para la determinación de flavonas y flavonoles.

Posteriormente, Mammen y col. (Mammen, D et al.,2012) llevaron a cabo una evaluación de los dos métodos anteriores determinado que no son métodos fiables para la determinación del contenido total de flavonoides ya que, al encontrarse las flavonas y los flavonoles en forma de glucósidos en las plantas, los restos de azúcar presentes en ellas pueden actuar obstaculizando la quelación con AlCl_3 .

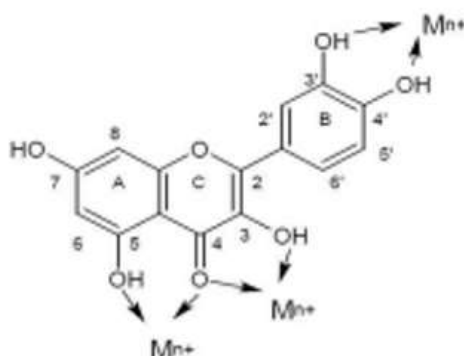


Figura 13. Posibles vacantes quelantes de la quercetina.

4.1.4. Ensayo DPPH

Desarrollado por Brand-Willians en 1994 tiene por objetivo la medida de la actividad antirradicalaria de diferentes flavonoides. Sus siglas son una simplificación del radical libre empleado en el ensayo, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. Este radical presenta una banda de absorción a 515 nm, que desaparece después de la reducción por un compuesto antirradicalario (antioxidante). Este radical está caracterizado por presentar una tonalidad violeta y es fácil de adquirir comercialmente (Londoño, 2012).

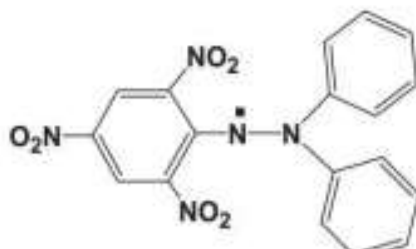


Figura 14. Radical DPPH.

Se trata de un ensayo de pseudo primer orden, cuya cinética es medible conforme va disminuyendo la absorbancia con el tiempo (Guija et al.,2015).

Los resultados obtenidos en el ensayo suelen expresarse como E_{50} , que indica la cantidad de antioxidante necesaria para llevar a cabo la estabilización del 50% del radical.

La ventaja principal de este ensayo es su sencillez y el bajo requerimiento instrumental. Como contrapartida, los problemas con el impedimento que existe a la hora de interpretar resultados procedentes de sustancias en las que su espectro de absorción solapa con el espectro del radical (Londoño, 2012).

4.1.5. Ensayo ABTS

Desarrollado por Miller y colaboradores con la finalidad de determinar la capacidad de antioxidantes necesarios para estabilizar el radical coloreado $ABTS^{•+}$, compuesto verde azulado que absorbe a una longitud de onda de 734 nm. El grado de decoloración se cuantifica como un decrecimiento de la absorbancia a la longitud de onda citada dependiendo de la duración de la reacción, del tipo de flavonoides presentes en la muestra y de la concentración en la que se encuentran en la muestra. (Shahidini, Zhong, 2015)

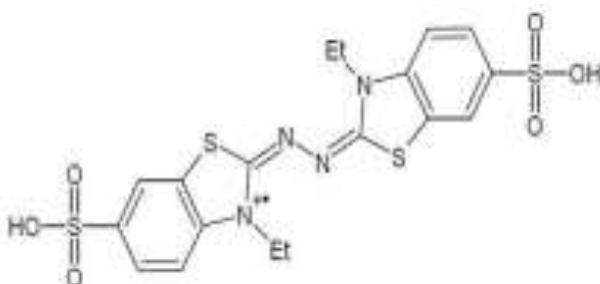


Figura 15. Radical catiónico ABTS.

Este radical surge de la oxidación del ABTS y el radical ferrimioglobina en presencia de metamioglobina y peróxido de hidrógeno, expresándose sus resultados como equivalentes de Trolox.

Este ensayo presenta inconvenientes como la dificultad que poseen los radicales de distinguir el radical $ABTS^{•+}$ del radical ferrimioglobina, afectando a la interpretación de los resultados. Por este motivo, se realizó una mejora de este método obteniendo el radical $ABTS^{•+}$ a partir de persulfato potásico y su posterior adición a la muestra (Litescu et al., 2014). Además, es un método que necesita mucho tiempo para llevar a cabo la medida. En relación a las ventajas que presenta se destacan su sencillez ya que puede implementarse en análisis de rutina sin necesidad de

instrumentación sofisticada y además se puede utilizar para determinar tanto antioxidantes hidrosolubles como liposolubles, siendo soluble tanto en medio acuoso como orgánico (Londoño, 2012).

4.1.6. Ensayo FRAP

Este ensayo tiene la finalidad de medir la capacidad antioxidante necesaria para reducir hierro férrico. Consiste en la reducción de un complejo de hierro férrico y cloruro de 2,3,5-trifenil-1,3,4-triazo-2-azoniociclopenta-1,4-dieno (TPTZ) a la forma ferrosa a pH bajo. El control de esta reacción se lleva a cabo midiendo el cambio de absorbancia a 593 nm mediante un espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis (Alam et al., 2013). Los valores de este ensayo se obtienen evaluando la diferencia de absorbancia de una mezcla problema con los valores de concentración obtenidos de los iones férrico y ferroso, expresando el resultado como mM equivalentes de ion ferroso por kg o por L de muestra (Alam et al., 2013)

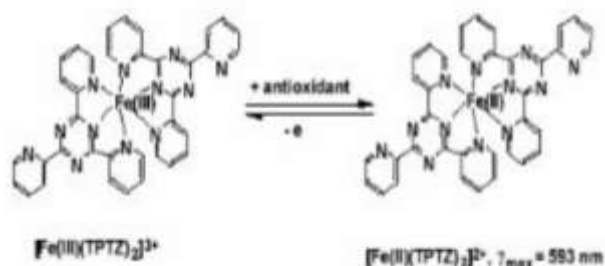


Figura 16. Reacción del complejo férrico con el antioxidante para obtener ion ferroso (Pérez Jiménez, 2007)

5. SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

5.1. Técnicas cromatográficas utilizadas en separación, análisis cualitativo y cuantitativo de flavonoides

5.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Este método se considera el más adecuado para llevar a cabo la separación y cuantificación de flavonoides en frutas. Las condiciones generales en las que se tiene que dar este proceso es el uso de una columna C-18 de fase inversa, un detector de matriz de diodos UV-VIS y un sistema disolvente binario que contiene agua acidificada

(disolvente A) y un disolvente orgánico relativamente polar como metanol o acetonitrilo (disolvente B) (Sakakibara Honda, 2003; Naczk y Shahidi, 2006).

Debido a las desventajas con respecto al límite de detección y la sensibilidad que posee el detector UV-Vis, se dan una serie de limitaciones en matrices más complejas tales como extractos de plantas crudas y muestras ambientales. Para solventar esta situación, es necesario llevar a cabo una preconcentración y purificación inicial de los polifenoles de la matriz antes de iniciar la parte instrumental, con la finalidad de reducir los cromatogramas obtenidos facilitando así su interpretación y cuantificación de polifenoles (Naczk y Shahidi, 2006). El proceso de purificación es muy crítico ya que elimina los componentes interferentes presentes en la matriz vegetal a analizar. En la mayor parte de la bibliografía revisada se concluye que para realizar la determinación de flavonoides en cítricos, es necesario que etapa de purificación se lleva a cabo mediante la extracción en fase sólida (SPE) (Wang, 2008).

Los flavonoides con masa molecular más baja se determinan mediante HPLC en columna tanto de fase normal como de fase reversa, con el inconveniente de consumir más tiempo y presentar una mala resolución conforme aumenta la longitud de la cadena y su diversidad estructural. En el caso de flavonoides de masa molecular más elevada, la cromatografía de líquidos/espectrometría de masas es la más eficiente para poder estudiar su estructura (Bureau et al., 2009). En la siguiente tabla, se describen algunos de los principales procedimientos empleados para llevar a cabo la separación de distintos tipos de flavonoides.

Tabla 8. Procedimientos de HPLC en la separación de diferentes clases de compuestos flavonoides. **Abreviaturas:** ACN: Acetonitrilo; TFA: Ácido trifluoroacético.

Compuestos	Fase estacionaria	Fase móvil		T (°C)	Flujo (ml/min)	λ (nm)	Referencias
		Disolvente A	Disolvente B				
Antocianidinas	C18 SS Wakosil 4.6mm*150mm*5mm	15% ACN Ácido acético al 2% TFA al 0.1% de ACN	80% ACN Ácido acético al 2% TFA al 0.1% en ACN	35	1	278	Chen y col. (2008)
Antocianinas, flavona	C18 Diamonsil 4.6mm*150mm*5mm	0.1% de ácido fórmico en agua	80% de ACN en agua	---	0.5-1	360	Fang y col., 2009
Ácidos fenólicos, flavoniodes	C18 4.6mm*150mm*5mm	4% de ácido acético	Metanol	--	1	210-400	Fang y col., 2009 Wang y col., 2009)
Antocianinas, flavonoles	C18 Aqua, Phenomenex 4.6mm*150mm*5mm	Agua: ácido fórmico: ACN 87:10:3	Agua: ácido fórmico:ACN 40:10:50	20	1	520	Corrales et al., 2009)
Flavan-3-oles, flavonoles y antocianinas	Phenomenes*Luna 250mm*4.6 mm	6% de ácido acético en acetato s	Acetonitrilo	--	1	250,320,360,520	Tsao y Yang (2003)
Quercetina	C18 Simetría de aguas 4.6mm*150mm*5mm	Metanol ácido (1% ácido acético)	Agua ácida (1% de ácido acético)	--	1	253	Alonso García y col., 2004
Hidroxitirosol	LiChorspher 250 mm*4.6mm*5mm	Ácido acético/ agua (2.5:97.5)	Acetonitrilo	30	1	--	Altiook y col., 2021

5.1.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica que permite la medida de la masa de los distintos analitos presentes en una muestra a través de la formación de iones en fase gaseosa. La ruptura de enlaces durante el proceso de medida (fragmentación) permite aportar información estructural muy valiosa para la identificación y caracterización de los analitos presentes en todo tipo de muestras. Las principales ventajas que presenta la espectrometría de masas son su elevada sensibilidad, la cual permite el análisis de los compuestos presentes en la muestra y su alta especificidad, ya que es capaz de separar moléculas que poseen la misma masa molecular pero diferente composición elemental, incluso diferenciar isómeros a partir de experimentos de fragmentación. La espectrometría de masas suele utilizarse combinada con otras técnicas de separación tales como la cromatografía de líquidos o la cromatografía de gases. Dentro de un experimento de espectrometría de masas se puede diferenciar tres etapas principales:

- **Etapas de ionización.** Se lleva a cabo la ionización de la muestra de forma directa o después su paso por un sistema de introducción de muestra previo como un cromatógrafo, obteniendo como resultado una corriente o flujo de iones en fase gaseosa. En la mayoría de los casos los iones tienen carga $z = 1$.
- **Etapas de separación.** En esta etapa se lleva la separación de los iones de las diferentes especies que anteriormente han sido ionizados en función de su relación masa/carga (m/z).
- **Etapas de detección.** Depende de la abundancia de cada ion medido. Todos los iones que lleguen al detector darán lugar a una señal que es amplificada mediante diferentes dispositivos, quedando registradas dichas señales. Finalmente, se obtiene un espectro de masas en el que se representan las abundancias relativas de los iones frente a sus relaciones m/z . Cabe destacar que todos los procesos se tienen que llevar a cabo a vacío con la excepción de la ionización.

Los componentes principales en un espectrómetro de masas son los siguientes: sistema de introducción de muestras, fuente de ionización, analizador(es) de masas, sistema de detección y procesador de datos. En la figura siguiente, se muestra un esquema de los componentes principales de un espectrómetro de masas.

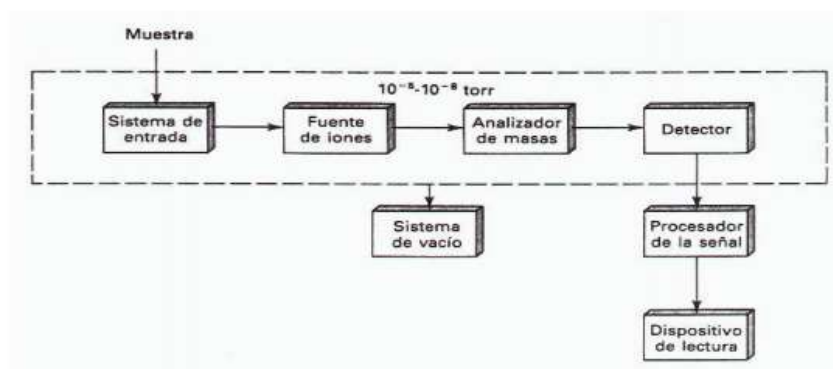


Figura 17. Constituyentes del espectrómetro de masas (Skoog et al., 2008).

Para llevar a cabo la determinación de flavonoides presentes en cítricos, lo más usual es llevar a cabo un análisis mediante HPLC-MS. La HPLC-MS es una técnica caracterizada por presentar la capacidad de separación del HPLC, además de la selectividad y precisión que caracteriza a la espectrometría de masas a la hora de llevar a cabo determinaciones de masas moleculares. La muestra es separada en sus constituyentes al pasar por el HPLC y seguidamente pasan al espectrómetro de masas a partir de un interfaz en el que se lleva a cabo la ionización. El método de separación más empleado es el de fase reversa, siendo la fase estacionaria no polar y la fase móvil relativamente polar, entre las que destaca la combinación de metanol o acetonitrilo junto con agua como fase móvil.

La técnica de ionización más empleada para la determinación de flavonoides es la Ionización por *Electrospray* (ESI) (de Hoffmann y Stroobant, 2010). Es una técnica en la que los iones se generan a partir de la aplicación de un campo eléctrico de gran intensidad a presión atmosférica a la muestra que fluye a lo largo de un capilar de un material conductor. El campo eléctrico se encarga de inducir una acumulación de carga en la superficie del líquido objeto de estudio al final de la aguja, por lo que éste se dividirá formando un aerosol de pequeñas gotas cargadas. Estas gotas pasarán por una corriente de N₂ inerte a alta temperatura que elimina la mayor parte de las moléculas presentes en el disolvente, facilitando de este modo la desolvatación. El proceso finaliza en el interior de un capilar cuya función es guiar a los iones procedentes del analito hacia el analizador (Robles Molina et al., 2008). Es necesario llevar a cabo la ionización de los distintos analitos para lograr un buen análisis y detección por parte del espectrómetro de masas (Robles Molina et al., 2014).

La ionización se puede llevar a cabo de dos modos en función de que se generen iones cargados positiva o negativamente (Robles Molina et al., 2014):

- **Modo positivo.** Se pueden observar iones múltiples protonados $[M+H]^+$.

Modo negativo. En este modo se suele observar la desprotonación de las moléculas, existiendo la posibilidad de formación de iones múltiples desprotonados $[M-H]^-$.

El análisis de masas es el siguiente paso. Permite separar los iones previamente originados en función de su relación masa/carga (m/z). Este proceso ocurre en el analizador de masas. Existen varios tipos de analizadores, siendo los más sencillos los de cuadrupolo (Q), trampa de iones (IT), tiempo de vuelo (TOF) (Robles Molina et al., 2014). También pueden emplearse los analizadores masas/masas o masas en tándem ((MS/MS) (más de un analizador sencillo) y los analizadores en tándem híbridos, donde se usan dos analizadores de diferente tipo (ej. Q-TOF). Las técnicas más usuales son aquellas en las que el espectrómetro de masas se encuentra en tándem MS/MS con triple cuadrupolo (QqQ). En ellas, los iones que se encuentran en fase gaseosa se deben de separar en función de su masa ya que la propiedad que miden los analizadores son la relación masa/carga. El primer cuadrupolo (Q_1) es un filtro encargado de separar y seleccionar las moléculas con carga del resto de moléculas eluyentes presentes en el cromatógrafo. En el segundo cuadrupolo (Q_2) se lleva a cabo la disociación, por las colisiones entre un gas inerte y los iones de analito dando lugar a un proceso de fragmentación controlado y reproducible. En el caso del tercer cuadrupolo (Q_3), al igual que el primer cuadrupolo, actúa como filtro de los fragmentos obtenidos por disociación del segundo cuadrupolo, pasando únicamente al detector aquellas masas del fragmento seleccionado.

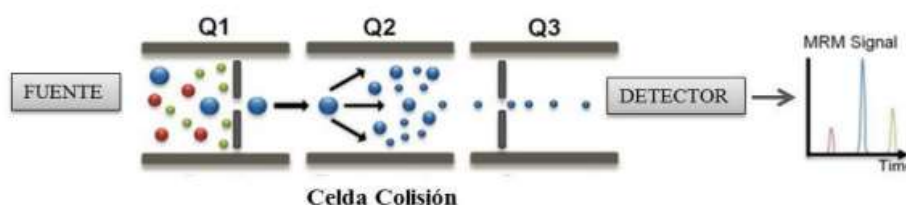


Figura 18. Esquema de un sistema QqQ-MS (Herrera et al., 2015).

El acoplamiento HPLC-MS presenta ciertas ventajas que lo caracterizan como el método más empleado para llevar a cabo la determinación cuantitativa de flavonoides debido a su naturaleza poco volátil y a su elevada solubilidad en disolventes polares. Esta técnica es destacable por su gran sensibilidad además de poder analizar mezclas complejas de las que obtiene información estructural de manera rápida, facilitando así su identificación.

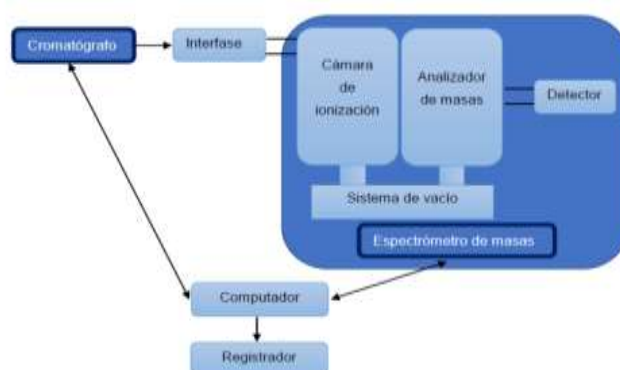


Figura 20. Esquema de acoplamiento HPLC-MS.

En estudios de frutas cítricas, se ha determinado que, mediante el uso de HPLC-MS se ha podido llevar a cabo la identificación de 32 flavonoides presentes en el limón (*Citrus limón*) (Ledesma Escobar, 2015) y 23 flavonoides en la naranja dulce (*citrus sisensis*). (Molina et al., 2015), además de su destacada importancia relacionada en ámbitos de medicina, nutrición y botánica (Marczylo et al., 2009).

Hay estudios que demuestran que llevar a cabo una determinación cualitativa de flavonoides en una determinada matriz es una tarea bastante elaborada, ya que estos compuestos no se encuentran libres en la matriz, si no que se encuentran como derivados diversos, siendo este el caso de las agliconas flavonoides combinadas con glicosilación en distintas variedades de sacáridos con posterior acilación dando a lugar a más de 5000 compuestos químicos distinguibles (Lin y Harnly, 2006).

Autores como Marquet y col. han dado una especial relevancia a la velocidad de detección de los distintos fragmentos en función de su relación m/z ya que, a mayor tiempo de adquisición y mayor número de valores de m/z monitorizados en equipos de cuadrupolo, mayor es la probabilidad de perder información de los analitos cuando se va a llevar a cabo el método de perfilado. Como herramienta se puede emplear instrumentos de MS sencillos que operen en modo de adquisición full-scan sin pérdida de sensibilidad. Esto ocurre en equipos con analizador de tiempo de vuelo (TOF) y

Orbitrap. En estos casos, los iones generados en la fuente serán transportados a una región a presión inferior a la atmosférica, en la que los iones son acelerados y dan a lugar a colisiones con moléculas neutras dando lugar a fragmentaciones parecidas a las que se dan en equipos MS/MS (Marquet et al., 2010). Esta técnica adquiere el nombre de fragmentación inducida por colisiones en la fuente (*in-souce Collision Induced Dissociation*, CID), generándose patrones de colisión similares a los obtenidos en experimentos MS/MS con aislamiento de ion precursor seguido de fragmentación en celdas de colisión al aplicar gas de colisión auxiliar.

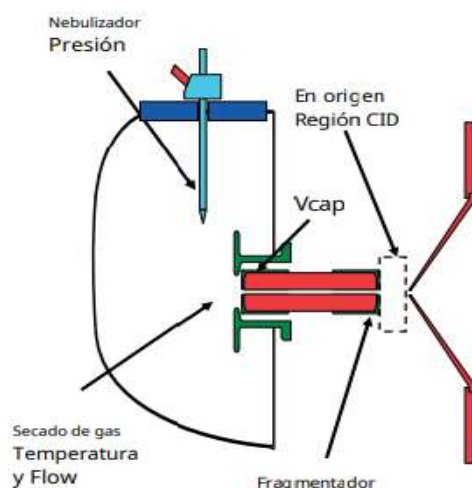


Figura 21. Esquema fuente ionización de masas en la que se aprecian los parámetros que afectan a la ionización de colisión en la fuente (Abranko et al., 2011).

En este esquema, la parte fundamental del instrumento es el voltaje del fragmentador cuya función es transmitir los iones desde el capilar a la sección óptica de iones, usando valores de voltaje de 50 a 400V, siendo voltajes superiores como 350V aquellos que se emplean para compuestos de alto peso molecular (Abrankó et al., 2011).

Esta adaptación de la técnica le proporciona la ventaja de que la información se obtiene simultáneamente de un número ilimitado de compuestos sin tener en cuenta la velocidad de análisis. (García Reyes et al., 2007). Otro dato a tener en cuenta es que los iones precursores no se pueden ni seleccionar ni aislar, por lo que indudablemente se podría conocer su origen. En el caso de utilizar un analizador de masas rápido para detectar los fragmentos generados se puede obtener información relacionada sobre el tipo de enlace existente entre la aglicona y los restos de glicanos (O-glicósidos), el tipo de unidad de azúcar involucrada (pentosa, hexosa, ribosa), la distribución de los restos de carbohidratos (Vukics y Guttman, 2009) o el enlace interglusídico (Cuykens y Claeys, 2004).

La espectrometría de masas en tándem, cuya abreviatura es MS/MS es cualquier método que involucre como mínimo dos etapas de análisis de masas en conjunto con un proceso de disociación con el objetivo de provocar un cambio en la relación m/z de un ion. Resumiendo, un analizador de masas se emplea para aislar un ion precursor que posteriormente se fragmenta para producir fragmentos neutros, cuya detección se dará en el segundo analizador. Por lo tanto, la espectrometría de masas en tándem permite realizar el análisis de mezclas complejas en un corto período de tiempo. Hay ocasiones en las que se puede emplear tres analizadores, pero como solo una pequeña fracción de iones detectados en el primer analizador llega a los sucesivos, el hecho de llegar iones al tercer analizador se considera de orden más alcanzado.

La modificación de la relación m/z se lleva a cabo mediante varias técnicas siendo la más común la disociación inducida por colisión (CID) en la que los iones precursores son activados por la colisión con átomos o moléculas neutros tales como gases inertes en la fase gaseosa, siendo un ejemplo de fragmentación posterior a la fuente.

El tipo de información que se puede extraer de esta técnica decae en los distintos modos de escaneo que presenta. Se pueden destacar los siguientes modos de escaneo:

- **Escaneo de iones de producto o SRA₂ espectros.** Analiza todos los iones procedentes de los fragmentos resultantes de un único ion precursor seleccionado.
- **Exploración de iones precursores.** Identifica todos los precursores de un determinado producto iónico.
- **Escaneo de pérdida neutra o neutral loss.** Se lleva a cabo a partir de un fragmento neutro seleccionado en el que se identifica las distintas fragmentaciones que generan la pérdida de ese fragmento. Este modo de escaneo se suele emplear en la identificación de metabolitos de conjugación de fase II, tales como los glucurónicos, identificándose mediante pérdidas neutrales. Además, se ha empleado en la búsqueda de pérdidas neutrales de 162 y 132 Da con el objetivo de separar los flavonoides que contienen residuos de hexosa de aquellos con residuos de pentosa.
- **Monitorización de la reacción seleccionada (SRM).** Analiza si un ion producto específico procede de la fragmentación de un ion precursor específico.

La identificación de distintas clases de flavonoides se logra en la mayoría de los casos con el uso de una espectrometría de masas en tándem en la que se emplean dos analizadores. Grosso modo, cada clase de flavonoide es caracterizada por presentar un patrón de fragmentación específico, siendo de especial interés en derivados flavonoides y en menor medida en flavonoides derivados de isoflavonas.

Las fragmentaciones más útiles en flavonoides desde el punto de vista de elucidación estructural, son aquellas que implican la rotura de los enlaces del anillo de C, denominadas retro Diels-Alder (RDA). De estas fragmentaciones (**Tabla 9**), se obtienen los iones productos de los distintos anillos aromáticos que constituyen los flavonoides, permitiendo establecer iones de productos de diagnóstico para los distintos tipos de flavonoides. Se tiene que tener en cuenta que las energías de fragmentación altas conllevan al aumento de la fragmentación y, por lo tanto, un aumento de la concentración de iones de bajas masas, de los cuales se desviarán los iones de diagnóstico y las vías de fragmentación.

Tabla 9: Grupos acilo característicos encontrados en flavonoides acilados y sus correspondientes fragmentaciones. Adaptado de Cuykens y Claeys, 2004.

Grupo acilo	Fragmentos característicos (Relación m/z)
Acetilo	$[M+H\text{-acetilhexosa}]^+$ (204)
Manoil	$[M \pm H \cdot CO_2]$ (44)
	$[M + H\text{-malonil}]^+$ (86)
	$[M + H\text{-malonilhexosa}]^+$ (248)
Benzoilo	$[M + H\text{-benzoilhexosa}]^+$ (266)
	$[benzoilo]^+$ (105)
	$[benzoilhexosa]^+$ (267)
Galloil	$[M \pm H\text{-galloil}]$ (152)
	$[\text{Ácido gálico} - H]^+$ (169)
Cumaroyl	$[M + H\text{-coumaroyl}]^+$ (146)
	$[M + H\text{-cumaroilhexosa}]^+$ (308)
Feruloilo	$[M \pm H\text{-feruloilo}]$ (176)
	$[feruloilhexosa]^+$ (339)

En la reacción RDA, la cual puede ocurrir en seis estructuras cíclicas de miembros que contienen doble enlace, se implica la reubicación de tres pares de electrones en el anillo. Los iones obtenidos de la escisión del anillo C se utilizan para determinar el número y naturaleza de los sustituyentes presentes en los anillos A y B.

La escisión de RDA genera fragmentos de 1,3 A+ y 1,3 B+, siendo muy importantes en las rutas de fragmentación de flavanonas, flavonas y flavonoles, además de los derivados de isoflavonas.

Comúnmente, los flavonoides se presentan como flavonoides O-glucosídicos, siendo los grupos 3 y 7 hidroxilos los sitios típicos de glucosilación. Cabe destacar que la glucosa es la fracción de azúcar más abundante presente. Los flavonoides diglucosídicos también se encuentran con bastante frecuencia en la naturaleza de los que se pueden destacar la peridosa (ramnosil 1→2-glucosa).

Los flavonoides C-glucosídicos son aquellos en los que el azúcar se encuentra directamente unido a la aglicona mediante un enlace C-C, comprendiendo los flavonoides mono- y di-C-glucosídicos.

Los iones de fragmentos procedentes de glicoconjugados se denotan con la formulación de Domon y Costello, explicada en este trabajo con anterioridad.

La espectrometría MS/MS en flavonoides di-glucosídicos sirven para llevar a cabo la distinción entre:

- Los tipos de enlaces de glucosa 1→2 y 1→6 de diglucósidos.
- Flavonoides glucosídicos (6-C y 8-C)
- O-glucosídicos (3-O y 7-O)

En un estudio realizado por Cuykens y colaboradores (Cuykens et al., 2001), se determinan los tipos de enlaces interglucosídicos y los enlaces O-glucosídicos presente en ocho flavonoles mediante espectrometría de masas en tándem con electrospray. Se presenta el siguiente espectro MS/MS a partir del cual se estudian los distintos fragmentos:

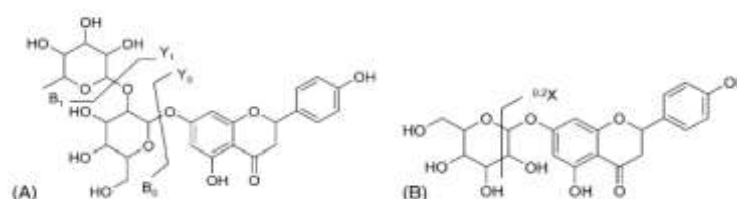


Figura 22: Nomenclatura de iones carbohidratados para (A) naringenina-7-O-neohesperidosa (naringenina-7-O-rhamnosil-(1→4) glucosa) y (B) naringenina 7-O- glucósido. (Domon y Costello,1989)

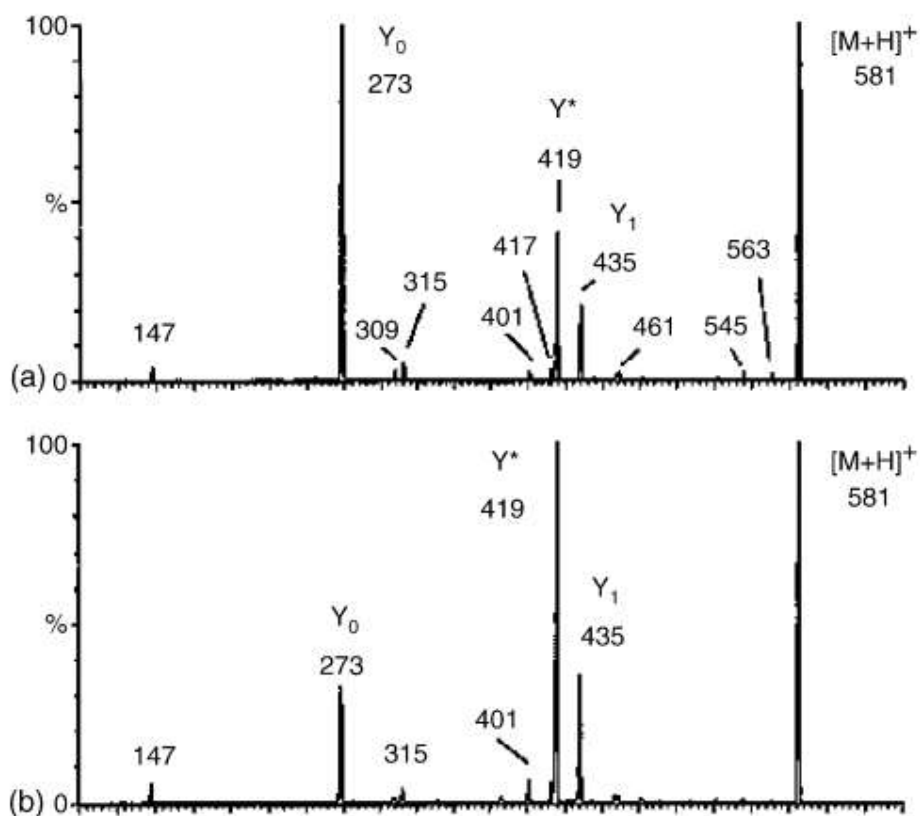


Figura 23. Espectros de MS/MS obtenidos para iones $[M+H]^+$ de (a) naringenina-7- O-neohesperidosido y (b) naringenina-7-O-rutinósido. (Cuykens et al., 2001)

En ambos espectros se puede observar que el ion Y_1 se forma después de la pérdida de la unidad de ramnosa (146Da) y el ion Y_0 se forma después de la adición de una unidad de glucosa en 162Da. Además, el enlace interglucosídico se puede determinar conociendo la relación Y_0/Y_1 , teniendo en cuenta que cuando $[M+H-146]^+ (Y-0) > [M + H - (146 + 162)] + (Y-1)$, se da un enlace $1 \rightarrow 2$.

El tipo de enlace O-glucosídico se puede determinar en función de la presencia del ion Y^* correspondiente a la pérdida de residuo interno de la glucosa del ion producto $[M+H-162]$. Este tipo de iones se observa en los flavonoides-7-rutinósidos y en los 7-neohesperidósidos, no correspondiéndose a ligandos tipo 3-O.

Otro tipo de espectrometría de masas importante de mencionar es la espectrometría de masas en tándem de alta resolución (LC-HR-MS/MS). Dentro de la temática de este trabajo, esta técnica se emplea para llevar a cabo el perfilado de flavonoides debido a que este método presenta la capacidad de realizar un escaneo completo a una velocidad moderada (García Reyes et al., 2011).

La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) se basa en la medida de la masa exacta de una especie con el cometido de obtener su composición

elemental en el caso de que su masa sea relativamente baja y la precisión de la medida del ion suficientemente elevada (< 5 ppm de error de masas relativo). Para ello, uno de los analizadores empleados es un analizador de tiempo de vuelo (TOF) (Figura 24).

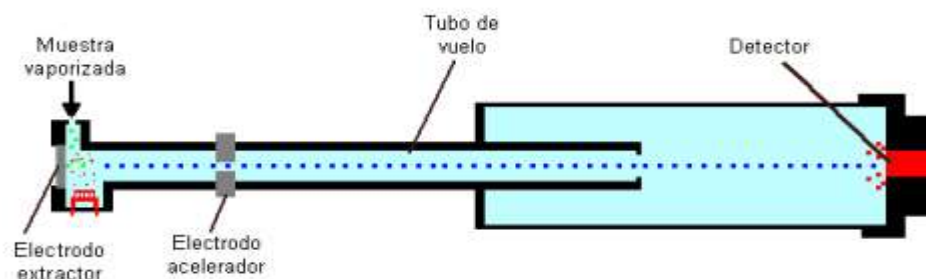


Figura 24: Analizador de tiempo de vuelo.

5.1.3. Otras técnicas cromatográficas

Existen otros tipos de técnicas cromatográficas que se han desarrollado para purificar y separar compuestos flavonoides de los alimentos. Se pueden destacar la cromatografía en papel (PC) y la cromatografía en capa fina (TLC) cuya finalidad es purificar y aislar antocianinas y flavonoles empleando diferentes sistemas solventes (Naczki y Shahidi, 2006). Previamente a estos métodos, surge la cromatografía de partición con el objetivo de ser un método preparativo, permitiendo el avance en la elución de flavonoides de distintos tipos de frutas si se aplicaban métodos de cromatografía en papel (Howard y Pelc, 1951). Estudios posteriores realizados por Jackman y colaboradores en 1987 (Jackman et al., 1987) emplearon la cromatografía en papel para separar antocianinas usando como fases móviles butanol/ ácido acético/ agua, agua/cloroformo/ácido acético o butanol/ácido fórmico/agua.

La cromatografía en capa fina ha sido y es una técnica de gran aplicabilidad en campos de análisis vegetal y pruebas para comprobar la estabilidad de extractos y productos finales de reacción. Se ha determinado que las placas de gel de sílice son las más adecuadas para llevar a cabo la separación e identificación rápida de flavonoides presentes en zumos de cítricos. Para llevar a cabo el análisis cuantitativo se lleva a cabo el escaneo de las placas de gel de sílice con luz ultravioleta aplicando longitudes de onda en torno 350-365nm o 250-260 nm. (Rastija, Medic-Saric, 2009).

La cromatografía de gases es otra de las técnicas que se han empleado para llevar a cabo la separación e identificación de diferentes flavonoides. Estos métodos requieren la derivatización de los compuestos volátiles mediante metilación, triclorofluoración y cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas. La cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas no se emplea en el análisis de flavonoides debido a la alta volatilidad que presentan los derivados glucósidos. (Naczk y Shahidi,2006)

5.2. Otros métodos de separación y cuantificación de flavonoides

5.2.1. Electroforesis capilar (CE)

La electroforesis capilar (CE) es una técnica empleada como alternativa al HPLC ya que es muy útil para la separación y cuantificación de compuestos polares cargados con bajo peso molecular, (Caridi et al., 2007) dándose separaciones más rápidas y eficientes en comparación con HPLC (Frazier y Papadoupoulou, 2003). Cada vez se usa más como una técnica rutinaria empleada para la determinación de una amplia variedad de compuestos flavonoides debido a su facilidad de separación, alta resolución, corto tiempo de análisis y bajo consumo de muestra y de reactivos. En comparación con otras técnicas como GC y HPLC, se aprecian limitaciones como la baja sensibilidad que presenta en términos de concentración de solutos, (Molina-Mayo et al.,2007) su escasa reproducibilidad debida a la corta longitud del camino óptico del capilar y el pequeño volumen que se puede introducir en el capilar siendo la mayoría de las veces, del orden de nanolitros. (Liu et al.,2008). Se pueden destacar distintos estudios como los realizados por Caridi y colaboradores en 2007, Chen, Zhang y Ye en 2000, entre otros, en los que se llevaron a cabo la electroforesis capilar para determinar los niveles de flavonoles naturales presente en el material vegetal. También se destaca que el uso de la electroforesis capilar para llevar a cabo la separación de antocianinas es una técnica caracterizada por su escaso desarrollo, pero con una gran importancia debido a la hidrosolubilidad que éstas presentan. (Vaheer y Koel,2003)

6. CONCLUSIONES

En el presente Trabajo Fin de Grado se puede apreciar información relacionada con la caracterización de compuestos flavonoides presentes en frutas cítricas tales como naranja, limón y pomelo. En relación a información encontrada se puede concluir que:

- El consumo de frutas cítricas que contienen flavonoides reducen el riesgo de sufrir algún tipo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y daños neuronales debido al estrés oxidativo y a la presencia de radicales libres.
- Son responsables de la mayoría de las características organolépticas de los vegetales, siendo así los compuestos más relevantes de la dieta mediterránea.
- El método más relevante para llevar a cabo la separación, elucidación estructural y cuantificación de los flavonoides sencillos y conjugados es la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).
- En función del voltaje empleado en el fragmentador acoplado en el espectrómetro de masas se pueden obtener distintos fragmentos de la molécula objeto de estudio en función de su relación m/z .

7. REFERENCIAS

- Abeysinghe, D., Li, X., Sun, C., Zhang, W., Zhou, C., Chen, K. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food. Chem.*, 2007,104, 1338–1344.
- Abrankó, L., García Reyes, J.F., Molina Díaz, A. Systematic bottom-up approach for flavonoid derivative screening in plant material using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 403, 995-1006.
- Abrankó, L., García-Reyes, J.F., Molina Díaz, A. In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry *J. Mass Spectrom.*, 2011, 46, 478-488
- Alam, M.N., Bristi, N. J., Rafiquzzaman, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, 21(2), 143-152.
- Ancillo, G., Medina, A. Monografías botánicas; Los cítricos: Jardín Botánico de la Universitat de València (2ª. Edición), Universidad de Valencia, 2014.
- Aroui, S., Najlaoui, F., Chtourou, Y., Meunier, A.C., Laajimi, A., Kenani, A., Fetoui, H. Naringin inhibits the invasion and migration of human glioblastoma cell via downregulation of MMP-2 and MMP-9 expression and inactivation of p38 signaling pathway. *Tumor Biol*. 2016, 37(3), 3831–3839.
- Arranz, S.M. Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2010.
- Abad-García, B., Berrueta, L.A., Garmon-Lobato, S., Gallo, B., Vicente, F. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 2009, 1216, 5398-5415.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology.*, 1994, 28, 25-30.

- Brewer, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2011, 10, 221-247.
- Britton, G., & Goodwin, T. W. (1971). Biosynthesis of Carotenoids. *Methods in Enzymology*, 18, 654–701. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(71\)18046-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(71)18046-9).
- Caridi, D., Trenerry, V. C., Rochfort, S., Duong, S., Laughner, D., & Jones, R. (2007). Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 105(2), 691–699. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.063>
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Reseña bibliográfica FLAVONOIDES : CARACTERISTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.
- Cirmi, S., Ferlazzo, N., Lombardo, G.E., Ventura-Spagnolo, E., Gangemi, S., Calapai, G., Navarra, M. Neurodegenerative diseases: might citrus flavonoids play a protective role, *Molecules*, 2016, 21(10), 1–25.
- Cheynier, V. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry reviews.*, 2012, 11(2-3), 153-177.
- Creus, E.G. Compuestos fenólicos: un análisis de sus beneficios para la salud, *Offarm*, 2004, 23(6), 81-84.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 2009, 26 (8), 1001–1043.
- Cuyckens, F., Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* 2004, 39, 1-15.
- De Hoffmann, E. & Stroobant, V. Principles and Applications (3rd edition) Wiley, *Mass Spectrometry* ,2010.ISBN 978-0-470-03311-1, Great Britain.
- De la Rosa L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2018). Phenolic compounds. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
- De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1112, 31-63.

- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
- De Villiers, A., Venter, P., Pasch, H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids. *J. Chromatogr. A.*, 2016, 1460, 16-78.
- Domon B, Costello CE. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj. J.*, 1988, 5, 397-409.
- Frazier, R. A., & Papadopoulou, A. (2003). Recent advances in the application of capillary. electrophoresis for food analysis. *Electrophoresis*, 24(22–23), 4095–4105. <https://doi.org/10.1002/elps.200305633>
- Frydoonfar, H.R, McGrath, D.R., Spigelman, A.D. The variable effect on proliferation of a colon cancer cell line by the citrus fruit flavonoid naringenin. *Colorectal Dis.*, 2003, 5(2), 149–152.
- García-Reyes, J. F., & Molina-Díaz, A. (2011). In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 46(5), 478–488. <https://doi.org/10.1002/jms.1914>
- Gómez Romero, M. Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 2010.
- González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 327–345. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.07.027>
- Goodlier, K. L., Rouseff, R. L., & Hofsommer, H. J. (2001). Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1146–1150. <https://doi.org/10.1021/jf000866o>
- Harborne, J.B., Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000, 55(6), 481–504.
- Herrera López, S. Aplicación de técnicas avanzadas de espectrometría de masas acoplada a cromatografía y de gases bidimensional para la evaluación

de los contaminantes emergentes en productos de degradación del medio ambiente, Universidad de Almería, Tesis Doctoral, 2015.

- Howard, A., & Pelc, S. R. (1951). *April 14, 1951*. 167(1950), 195
- Hwang, S.L., Shih, P.H., Yen, G.C. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J. Agric. Food. Chem.*, 2012, 60(4), 877–885.
- Ignat, I., Volf, I., Valentin, Popa, I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.*, 2011, 126, 1821-1835.
- Jeon, S.M., Bok, S.H., Jang, M.K., Kim, Y.H., Nam, K.T., Jeong, T.S., Park, Y.B., Choi, M.S. Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits. *Clin. Chim. Acta*, 2002, 317, 181–90.
- Kim, M.E., Ha, T.K., Yoon, J.H., Lee, J.S. Myricetin induces cell death of human colon cancer cells via BAX/BCL2-dependent pathway. *Anticancer Res* 2014, 34(2), 701–706
- Ladaniya, M.S. Introduction. In: *Citrus fruit*. Cambridge, MA: Elsevier; 2008. p. 1–11
- Ledesma Escobar, C.A., Priego-Capote, F., Luque-de-Castro, MD. Characterization of lemon (*Citrus limon*) polar extracts by liquid chromatography tandem mass spectrometry in high resolution mode. *J. Mass Spectrom.*, 2015, 50(11), 1196–205.
- Ledesma-Escobar, C.A., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. Relevance and Analysis of Citrus Flavonoids, in: *Polyphenols in Plants (Second Edition): Isolation, Purification and Extract Preparation*, 2019, 133-150.
- Lin, L.Z., Harnly, J.M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 1084-1096.
- Li, Q. M., & Claeys, M. (1994). Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, 23(7), 406–416. <https://doi.org/10.1002/bms.1200230705>
- Liu J-L, Yuan J-F, Zhang Z-Q. Microwave-assisted extraction optimised with response surface methodology and antioxidant activity of polyphenols from

hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.) fruit. *Int J Food Sci Technol* 2010;45(11):2400–6

- Londoño, J. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Desarrollo y transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia (pp. 130-162). Corporación Universitaria Lasallista. ISBN: 978-958-8406-14-5, 2012
- Ma, Y.L., Li, Q.M., Van den Heuvel, H., Claeys, M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1997; 11: 1357-1378.
- Mammen, D.; Daniel, M. (2012). A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chem.* 135 (3), 1365–1368.
- Marín-Rangel, V. M., Cortés-Martínez, R., Cuevas Villanueva, R. A., Garnica-Romo, M. G., & Martínez-Flores, H. E. (2012). As (V) biosorption in an aqueous solution using chemically treated lemon (*Citrus aurantifolia* Swingle) residues. *Journal of Food Science*, 77(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02466.x>.
- Marquet, P., Venisse, N., Lacassie, E., & Lachâtre, G. (2000). In-source CID mass spectral libraries for the “general unknown” screening of drugs and toxicants. *Analisis*, 28(10), 925–934. <https://doi.org/10.1051/analisis:2000280925>
- Medić-Šarić, M., Rastija, V., Bojić, M., & Maleš, Ž. (2009). From functional food to medicinal product: Systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutrition Journal*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2891-8-33>
- Molina-Calle, M., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. Ultrasound-assisted emulsification–extraction of orange peel metabolites prior to tentative identification by LC–QTOF MS/MS. *Talanta*, 2015, 141, 150-157.7
- Muñoz M., Ramos-Escudero, D. F., Alvarado-Ortiz, C., Ureta, 1, & Castañeda, B. C. (2007). Evaluación De La Capacidad Antioxidante Y Contenido De De Compuestos Fenólicos En Recursos Vegetales Promisorios. *Quím Perú*, 73(3), 142–149. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v73n3/a03v73n3.pdf>

- Naczek M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, 41: 1523–1542
- Olson, J. A. 1989. Provitamin-A function of carotenoids: the conversion of β -carotene into vitamin-A. *Journal Nutritional*, 119: 105-108.
- Pinheiro. P.F, Justino G. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, May 2014. <https://doi.org/10.5772/29152>
- Prior, R. L., Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4290–4302.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Rajadurai M, Stanely Mainzen Prince P. Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: biochemical and histopathological evidences. *Toxicology*, 2006, 228(2–3), 259–268.
- Ribeiro, D., Freitas, M., Tome, S.M., Silva, A.M.S, Laufer, S., Lima, J.L.F.C., Fernandes, E. Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine/chemokine production in human whole blood. *Inflammation*, 2015, 38, 858-870.
- Robles-Molina, J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Molina-Díaz, A. Gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry method for monitoring multiclass organic pollutants in Spanish sewage treatment plants effluents. *Talanta*, 2013, 111, 196–205.
- Robles-Molina, J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A. Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaén, South East Spain. *Science of the Total Environment*, 2014, 479–480, 247–257.
- Rodríguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., Bandala, E. R. Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chem. Eng. Journal*, 2017, 323, 361–380.

- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V, Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M.L., Vanella, A. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol.*, 2000,16(2), 91–98
- Sánchez Paniagua, M. Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2009.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *J. Functional foods.*, 2015, 18, 757-781.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J. Functional Foods*, 2015, 18, 820–897.
- Thangavel, P., Muthu, R., Vaiyapuri, M. Antioxidant potential of naringin – a dietary flavonoid – in N-nitrosodiethylamine induced rat liver carcinogenesis. *Biomed Prev Nutr.*, 2012, 2(3),193–202.
- Tripoli, E., La Guardia, M., Di Majo, D., Giammanco, M. (2007) “Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.*, 2007, 104, 466-479.
- Vaher, M., & Koel, M. (2003). Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 990(1–2) 225–230. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)02013-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)02013-7)
- Vukics, V.; Guttman, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 2009, 29, 1.
- Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., Zhou, Z. Antioxidant activity of citrus fruits. *Food Chem.*, 2016,196, 885–896.
- Zheng, W., Wang, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5165–5170.