

*“Exploración de las interacciones fisicoquímicas de los flavonoides-matriz
en un producto de lima (*Citrus limetta*) y/o naranja agria (*Citrus
aurantium*) y su efecto en las propiedades hipoglucemiantes e
hipocolesterolémicas en modelo animal”*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
EN LA ESPECIALIDAD DE
PROCESOS AGROINDUSTRIALES

PRESENTA

L.N. NANCY ABRIL ESTRADA SIERRA

GUADALAJARA, JAL. JUNIO 2015

1. Agradecimientos

A Dios y a mi familia por estar siempre a mi lado y ser mi apoyo, a mi esposo porque sin su empuje quizá me hubiera rendido antes de empezar, gracias a todos por entender mi estrés cuando tenía mucho trabajo, por su paciencia cuando perdía los estribos y por recordarme en esos momentos que este es mi sueño y lo que me apasiona hacer.

A la Doctora Socorro Villanueva por tener fe en mí y ser la mejor guía que he tenido, sin su paciencia, consejo y orientación no sería lo que soy hoy en día.

A CIATEJ y PICYT por el apoyo institucional brindado y a CONACYT por brindarme una beca que me permitió dedicar el 100% de mi tiempo a realizar este proyecto.

A grupo industrial VIDA por proponer el tema central de esta tesis.

Al doctor Eduardo Padilla por su ayuda en la parte experimental y por estar ahí siempre para atender mis dudas e inquietudes con la parte biológica.

A los doctores que me impartieron las materias durante el posgrado, en especial a Doctor Jesús Cervantes por tener la paciencia de enseñarme Matemáticas.

A mis compañeros Sergio y Toño que siempre tuvieron un consejo oportuno para mí y me brindaron todo su apoyo, Hilda y Alexis por enfrentar esta aventura conmigo y siempre estar dispuestas a ayudarme en lo que fuera, Sandra Bravo por su infinita ayuda con el manejo del HPLC y a Gonzalo que siempre tuvo una palabra de aliento y mucha paciencia para explicarme lo que no entendía sobre los nuevos conocimientos que estaba adquiriendo en especial de matemáticas.

“No hay nada como un reto para sacar lo mejor de un hombre” Sean Connery

2. Resumen

Debido al interés de las empresas por formular alimentos funcionales, es importante conocer el comportamiento de los compuestos bioactivos dentro de un alimento industrializado, ya que las interacciones químicas o fisicoquímicas que podrían presentarse entre las sustancias bioactivas y los componentes del alimento podrían afectar la disponibilidad de dichos compuestos y por tanto su efecto benéfico, es por ello que este estudio está orientado a evaluar las posibles interacciones entre algunos flavonoides presentes en el jugo de cítricos (*Citrus limetta* Riso y *Citrus aurantium*) y algunos aditivos comúnmente añadidos al jugo para impartirles ciertas propiedades sensoriales o estabilidad (pectina y β -ciclodextrina (β -CD)). Además se estudió el efecto del pH y de la temperatura sobre dichas interacciones. Se evaluaron cambios en capacidad antirradical DPPH (%I), flavonoides totales por AlCl_3 (mg EQ/L) y la concentración de flavonoides libres por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) suponiendo cambios en las variables de respuesta, serían el reflejo de la formación o desaparición de interacción. Resultados: Los jugos frescos presentaron el mayor %I del radical DPPH comparado con las soluciones modelo, no hubo diferencias significativas al variar el pH y la temperatura tanto en el jugo de lima como en las soluciones modelo, sin embargo, al pasteurizar (90°C 40s) el jugo de naranja agria hubo un aumento significativo en el %I, el cual disminuye al agregar los polisacáridos, en comparación con el jugo fresco. La eriocitrina y la naringina en las soluciones formaron mayor interacción con pectina que con β -CD, tanto las pruebas de DPPH como con HPLC concuerdan con esta afirmación. Una disminución en el %I y el contenido de flavonoides libres de las soluciones de Hesperidina y Neohesperidina en mezcla con la β -CD, parecen indicar una mayor interacción con β -CD. Las pruebas biológicas mostraron que, el sistema modelo conteniendo algunos de los flavonoides de lima, y en presencia de β -CD tuvo un efecto hipoglucemiante e hipocolesterolémico lo que sugiere que, en este caso, para obtener un efecto biológico es conveniente proteger a los flavonoides, sin embargo, la solución modelo neohesperidina/naringina con β -CD y sucralosa tuvieron un menor efecto hipoglucemiante e hipocolesterolémico que la solución que solo tiene β -CD. No hay diferencia significativa en el efecto hipoglucemiante e hipocolesterolémico entre los jugos de lima. El jugo de naranja agria adicionado con β -CD y sucralosa tiene un efecto hipocolesterolémico e hipoglucemiante significativamente mayor que el jugo fresco. La diferencia con los resultados del sistema modelo refleja la importancia de realizar pruebas para conocer el rol de cada ingrediente y su impacto sobre los factores que afectan la biodisponibilidad de los compuestos antes de afirmar que un alimento es funcional.

3. Índice de contenido

1. Agradecimientos	i
2. Resumen	ii
3. Índice de contenido	iii
4. Índice de figuras	vi
5. Índice de tablas	vii
6. Índice de gráficos	viii
7. Antecedentes	1
8. Definición del tema	3
9. Justificación	4
10. Hipótesis	6
11. Objetivos	7
11.1 Objetivo general	7
11.2 Objetivos específicos	7
12. Fundamento	8
12.1 Alimentos funcionales	8
12.2 Cítricos	9
12.2.1 Producción de cítricos	9
12.2.2 Taxonomía	10
12.3 Composición de la lima y la naranja agria	11
12.3.1 Anatomía y biología de los cítricos	11
12.3.2 Composición química	12
12.3.3 Pectinas	13
12.3.4 Flavonoides	15
12.3.4.1 Estructura y clasificación	15
12.3.4.2 Biosíntesis en plantas	18
12.3.4.3 Flavanonas.	19
12.3.4.4 Técnicas de identificación y cuantificación de flavonoides.	20
12.3.4.5 Bioaccesibilidad biodisponibilidad y metabolismo de las Flavanonas.	21
12.3.4.6 Efectos biológicos	23
12.3.4.6.1 Actividad hipoglucemiante e hipocolesterolémica	29
12.5 Ciclodextrina	34
12.5.1 Función	36
12.5.2 Formación de complejo	36

12.6	Sucralosa	38
12.7	Interacciones fisicoquímicas	39
12.7.1	Importancia de las interacciones fisicoquímicas en las propiedades físicas de un producto	42
12.7.2	Interacciones fisicoquímicas flavonoides/polisacáridos	44
12.7.2.1	Interacción con la pared celular	45
12.7.2.2	Interacción con pectina	46
12.7.2.3	Interacción con Ciclodextrina	49
13.	Procedimientos o métodos	53
13.1	Implementación de los métodos de medición de variables de respuesta y evaluación de los jugos frescos y de la fórmula seleccionada, obtención de parámetros a emplear en las soluciones modelo.	53
13.1.1	Diseño experimental	53
13.1.2	Pruebas fisicoquímicas	54
13.1.3	Determinación de pectina	55
13.1.4	Flavonoides totales	56
13.1.5	Capacidad anti-radical por DPPH	57
13.1.6	Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC)	57
13.1.7	Identificación y cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	58
13.1.7	Evaluación sensorial del nivel de dulzor en jugo de naranja agria	59
13.1.8	Formulación de jugos	60
13.2	Preparación del sistema modelo con flavonoides de lima o naranja agria y polisacáridos para probar las interacciones fisicoquímicas controladamente.	60
13.3.1	Preparación de soluciones probadas en el sistema modelo	60
13.3.1.1	Soluciones de Pectina-Flavonoide.	60
13.3.1.2	Soluciones de β -Ciclodextrina-Flavonoide.	61
13.3	Evaluación y comparación de los parámetros biológicos (capacidad hipoglucemiantes e hipocolesterolémico) de los sistemas modelo, el jugo fresco y el jugo a base de lima o la naranja agria modificado <i>in vivo</i> (modelo animal).	62
13.3.1	Efecto hipoglucemiante	62
13.3.2	Efecto hipocolesterolémico	63
14.	Resultados y discusión	65
14.1	Implementación de los métodos de medición de variables de respuesta y evaluación de los jugos frescos y la fórmula seleccionada, obtención de parámetros a emplear en las soluciones modelo.	65
14.1.1	Pruebas fisicoquímicas	65
14.1.2	Determinación de pectina total	65
14.1.3	Cromatografía de capa fina (TLC)	66
14.1.4	Flavonoides totales	69
14.1.5	Capacidad anti-radical por DPPH	71
14.1.6	Detección y cuantificación de flavonoides en los jugos por HPLC	72

14.2 Preparación y análisis de los sistemas modelos con flavonoides de lima o naranja agria y polisacáridos, para probar las interacciones fisicoquímicas controladamente.	76
14.2.1 Flavonoides totales	76
14.2.2 Capacidad anti-radical (DPPH) y concentración de flavonoides libres (HPLC)	80
14.3 Evaluación y comparación de los parámetros biológicos (capacidad hipoglucemiantes e hipocolesterolémico) de los sistemas modelo, el jugo fresco y el jugo a base de lima o la naranja agria modificado, <i>in vivo</i> (modelo animal).	86
14.3.1 Efecto hipoglucemiante	86
14.3.2 Efecto hipocolesterolémico	90
15. Conclusiones	95
16. Recomendaciones futuras	96
17. Bibliografía	97
18. Anexos	110
18.1 Anexo 1. Tabla de macro/micro-nutrientes de lima y naranja agria	110
18.2 Anexo 2. Curva de calibración de flavonoides totales	111
18.3 Anexo 3. Capacidad antirradical equivalente en trolox	111
18.4 Anexo 4. Curvas de calibración para cromatografía líquida (HPLC)	112
18.5 Anexo 5. Análisis estadístico de las soluciones modelo	114
18.6 Anexo 6. Análisis estadístico de las soluciones modelo	115

4. Índice de figuras

Figura 1. Anatomía del cítrico	12
Figura 2. Estructuras de los dos dominios péctico-polisacáridos más comunes que constituyen pectinas: homogalacturonano (HGA) y ramnogalacturonano (RG) I y II	14
Figura 3. Grupos sustituyentes de las pectinas, amarillo: carboxilo, azul: sustituyente éster, roja: sustituyente amida.....	15
Figura 4. Estructura base del flavonoide	16
Figura 5. Biosíntesis de flavonoides en plantas (Kamran y Dangles 2014)	18
Figura 6. Estructura química de los flavonoides característicos de la naranja agria, izquierda: naringina, derecha: neohesperidina.	19
Figura 7. Estructura química de los flavonoides característicos de la lima dulce, izquierda: hesperidina, derecha: eriocitrina	20
Figura 8. Presentación esquemática del metabolismo de las flavonas en el intestino delgado y grueso (Kamran y Dangles 2014)	23
Figura 9. Estructura base de flavonoides con los sitios a los que debe su capacidad de captación de radicales libres (Williams y Spencer 2012).....	25
Figura 10. Ejemplo del mecanismo antioxidante (Calgarotto et al. 2007).....	26
Figura 11. Unión de quercetina (estructura blanca) con hierro (estructura morada) (Ren et al. 2008)	27
Figura 12. Estructura química de α, β, γ ciclodextrinas (Astray et al. 2009).....	35
Figura 13. Los tres tipos de complejo de inclusión con relación estequiométrica (Song et al. 2009).....	37
Figura 14. Interacciones de encapsulación que acompañan al complejo de inclusión	37
Figura 15. Estructura química de la sucralosa (Molinary y Quinlan 2012)	38
Figura 16. Interacciones hidrofóbicas	41
Figura 17. Formación de puentes de hidrogeno en moléculas de agua	42
Figura 18. Complejo de inclusión β -CD y flavonoide	50
Figura 19. Resultados de distintas fases estacionarias, A: TLC silica gel 60W F25 S y B: DC Fertigfolien Alugram xtra silica gel G/UV254	67
Figura 20. HPTLC silica gel 60W F254S, fase móvil acetato de etilo: metanol: ácido fórmico: agua (20:1.5:1.5:2) donde 1: Erio (eriocitrina), 2: Naring (naringina), 3: Hesp (hesperidina), 4: Neohesp (neohesperidina), 3: Mezcla (mezcla de flavonoides), 4: NA (naranja agria), 5: Lima L (lima liofilizada).	68
Figura 21. Cromatogramas de jugos frescos, izquierda: lima y derecha: naranja agria	74
Figura 22. Diseño esquematizado de los parámetros tomados en cuenta en las soluciones modelo.....	75

5. Índice de tablas

Tabla 1. Valor nutrimental de los cítricos estudiados	13
Tabla 2. Clasificación de los flavonoides según su composición química.....	17
Tabla 3. Métodos más utilizados para determinar la capacidad antioxidante de muestras naturales	28
Tabla 4. Fases móviles utilizadas para HPTLC del jugo de lima y naranja agria	58
Tabla 5. Resultados fisicoquímicos.....	65
Tabla 6. Concentración de flavonoides en jugos frescos y pasteurizados, además de los jugos de naranja agria con sucralosa (3mg/100ml).....	73
Tabla 7. Concentración de flavonoides libres (ppm) por HPLC en Sistema modelo de lima pH 5.5 temperatura 90°C	81
Tabla 8. Concentración de flavonoides libres (ppm) por HPLC en el sistema modelo de naranja agria, a pH4, temperatura 90°C y sin sucralosa.....	83
Tabla 9. Concentración de flavonoides libres (ppm) por HPLC en el sistema modelo de naranja agria, pH4 temperatura 90°C con sucralosa	84

6. Índice de gráficos

Gráfico 1. Contenido de pectina de jugos frescos de lima y naranja agria	66
Gráfico 2. Flavonoides totales de los jugos de naranja agria de izquierda a derecha: jugo fresco, pasteurizado a 90°C por 30seg, con sucralosa sin pasteurizar, con sucralosa y pasteurizado a 90°C por 30s, con sucralosa y ciclodextrina pasteurizado a 90°C por 30s	69
Gráfico 3. Flavonoides totales de los jugos de lima	70
Gráfico 4. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de los jugos de naranja agria de izquierda a derecha: a) jugo fresco, b) pasteurizado (90°C por 30seg), c) con sucralosa sin pasteurizar, d) con sucralosa y pasteurizado, e) con sucralosa y β -CD pasteurizado y jugos de lima: f) fresco, g) pasteurizado, h) con β -CD pasteurizado (letras minúsculas indican diferencia significativa entre valores $p < 0.005$ en comparación con jugo fresco).....	71
Gráfico 5. Flavonoides Totales, comparación entre eriocitrina (Erio), hesperidina (Hesp) y mezcla de flavonoides (Erio/Hesp) solos (control) y las soluciones con β -CD a pH 5.5 y 5, temperaturas 25 y 90°C.	77
Gráfico 6. Flavonoides Totales, comparación entre naringina (Nar), neohesperidina (NH) y mezcla de flavonoides (Nar/NH) solos (control) y las soluciones con β -CD y β -CD con sucralosa a pH 2.7 y 4, temperaturas 25 y 90°C.....	78
Gráfico 7. Capacidad anti-radical de algunas soluciones representativas del sistema modelo de lima: hesperidina (863 μ moles/L), eriocitrina (28.5 μ moles /L), hesperidina-eriocitrina (Hesp-Erio) a pH 5 y 5.6 90°C	80
Gráfico 8. Capacidad antirradical del jugo fresco y algunas soluciones representativas del sistema modelo de naranja agria naringina (1145.5 μ moles/L), neohesperidina (822.1 μ moles/L), naringina- neohesperidina (Nar-NH) a pH 4 90°C.....	82
Gráfico 9. Incremento de la glucosa de grupos de ratones administrados con las soluciones de mayor disponibilidad de flavonoides (Hesp/Erio Pec y NH/N β -CD) así como las soluciones de menor disponibilidad de flavonoides (Hesp/Erio CD y NH/N CD sucralosa) de los sistemas modelo de lima y naranja agria.....	87
Gráfico 10. Incremento en la glucosa de grupos de ratones administrados con los jugos frescos y las formulas seleccionadas de lima (β -Ciclodextrina, pasteurizado a 90°C) y naranja agria (β -CD sucralosa, pasteurizado a 90°C).....	88
Gráfico 11. Incremento en el colesterol de grupos de ratones administrados con las soluciones de mayor disponibilidad de flavonoides (Hesp/Erio Pec y NH/N β -CD) así como las soluciones de menor disponibilidad de flavonoides (Hesp/Erio β -CD y NH/N β -CD sucralosa) de los sistemas modelo de lima y naranja agria	91
Gráfico 12. Cambio en los niveles de colesterol de los grupos de ratones administrados con los jugos frescos y las formulas seleccionadas de lima (β -CD, pasteurizado a 90°C) y naranja agria (β -CD y sucralosa, pasteurizado a 90°C).	93

7. Antecedentes

Los alimentos industrializados son matrices complejas en las que las interacciones moleculares entre sus ingredientes dictan las propiedades estructurales y sensoriales. Las interacciones entre los ingredientes, algunas veces son deseables y ayudan a mejorar la calidad de los productos, sin embargo, esto no siempre sucede y hay interacciones indeseables que pueden disminuir la calidad tanto nutrimental como sensorial. Es muy importante entender las interacciones entre los ingredientes de una matriz alimenticia para, por un lado, optimizar el rendimiento de los ingredientes y por tanto producir un alimento de buena calidad, y por otro lado, entender el comportamiento de los macro y micronutrientes presentes en cada producto con el fin de dar respuesta veraz y científica al creciente interés de la población hacia alimentos que, además de satisfacer las necesidades nutrimentales básicas, contengan compuestos (bioactivos) que proporcionen beneficios para la salud o reduzcan el riesgo de sufrir enfermedades, lo que, al mismo tiempo representa el desarrollo de la industria de alimento funcionales.

Cada matriz alimenticia tiene características diferentes, por tanto, sus interacciones deben ser estudiadas meticulosamente. La lima dulce tiene un sabor muy aceptado por los consumidores, el sabor es perfumado y no es ácido, sin embargo, no hay productos a base de lima en el mercado debido, en gran parte, a su sensibilidad a cualquier proceso clásico de conservación, en su mayoría basados en la reducción del pH y el calentamiento a temperaturas de pasteurización, en el caso de la lima, al ser sometido a estos parámetros pierde su olor y sabor característicos (Villanueva, 2008).

Esta situación parece limitar las alternativas de uso de dicho fruto y a su vez influye en la falta de interés de fruticultores por producir lima dulce (SAGARPA, 2013), sin embargo, el Grupo Industrial Vida propuso a CIATEJ en el 2008 un proyecto para la utilización integral de la lima, interesados en promover su utilización y relanzar la producción, basándose en la elaboración de productos industrializados que pudieran catalogarse como alimentos funcionales.

En 2009, ésta empresa propuso integrar al proyecto la naranja agria, ya que su producción es aún más incipiente, de manera que no se encuentran registros oficiales de su cultivo o producción. Sin embargo, es un fruto muy utilizado como alimento curativo y como condimento.

Para poder elaborar un producto, dentro del marco del proyecto, se llevó a cabo una exploración preliminar de los flavonoides presentes en estos dos frutos y se corroboró que en ambos cítricos están presentes (Villanueva, 2008), confirmándose además que, aplicando una estrategia particular (secreto industrial), estos flavonoides coadyuvan a prolongar la vida de anaquel del jugo de lima sin modificaciones significativas del sabor, este descubrimiento podría en efecto convertir el producto en un alimento funcional, de esta observación surgieron varias incógnitas como por ejemplo: ¿qué efecto biológico se le podría atribuir a los flavonoides en el jugo? y si ese efecto permanecería al agregar algunos aditivos para estabilizarlo o potenciar algunas características sensoriales y al aplicarle algún proceso térmico para su industrialización.

Los flavonoides específicos de la naranja agria y la lima dulce entre otros, al ser evaluados de manera independiente, han demostrado tener un efecto reductor de la concentración de glucosa y colesterol en sangre (Villanueva, 2008; Figueroa-Valverde et al., 2009; Sharma y Bhat, 2009; Kundusen et al., 2011). Debido a que los niveles elevados de glucosa y colesterol son signos de enfermedades crónico-degenerativas, y estas son las principales causas de mortalidad en México y en el mundo, un producto a base de naranja agria o lima, pudiera representar una opción de alimento funcional. Sin embargo, el efecto biológico de estos compuestos nunca se ha estudiado como parte de una matriz compleja como lo es una bebida formulada, la complejidad se ve evidenciada por la cantidad de interacciones que se pueden presentar entre los ingredientes de la matriz y no se sabe si estas interacciones beneficiarán o afectaran al posible efecto biológico del alimento, convirtiéndolo en solo un jugo o por el contrario en un alimento funcional con bases científicas.

8. Definición del tema

Dado lo anterior, podría pensarse que, si las propiedades biológicas demostradas de manera independiente para los flavonoides aislados de lima y naranja agria, se mantienen en un alimento elaborado con estas materias primas, podrían convertirse en ingredientes nutraceuticos para la elaboración de alimentos funcionales.

Por lo tanto, el desafío de éste estudio, es explorar algunas las interacciones de naturaleza química o fisicoquímica, presentes en este alimento, de manera que puedan entenderse los factores que favorecen o perjudican la estabilidad para garantizar el efecto biológico lo cual puede implicar su biodisponibilidad.

9. Justificación

El consumo de cítricos a nivel mundial inclina la balanza al consumo de productos procesados (jugos o aceites esenciales) en especial a base de naranja 65%, seguido de la mandarina, el limón y la toronja. El consumo de la lima dulce y la naranja agria no está reportado, esto se debe a la poca demanda de la población por estos cítricos, lo cual provoca el desinterés productor de cítricos por estos cultivo (Licona, 2009).

No existen estudios que hablen de alternativas de uso elevado o sostenido de la naranja agria y la lima por la población mexicana. Se sabe por la opinión pública que, la lima se consume como fruta fresca y en agua; de la naranja agria lo que más se conoce es su utilización como condimento y a ambas se les atribuyen propiedades curativas (Paul y Paul, 1995).

La empresa solicitante del proyecto, desea contar con argumentos técnicos que le permitan, por un lado y en colaboración con otras instancias, reactivar el cultivo de la lima, y en el caso de la naranja agria, promover su cultivo sistematizado, y por otro lado, convertirlo en un alimento que se consuma por la población y que, de esta manera se tenga una demanda de fruto al agricultor. De lo anterior, nace el interés por la realización de un estudio que proponga posibles alternativas para el aprovechamiento de las propiedades de estos frutos de manera que, en un futuro medio se logre una industrialización diversificada, que además, genere productos de calidad que aporten beneficios a la salud y beneficios económicos a las zonas productoras.

Una opción es desarrollarlo como un alimento funcional, sin embargo, en la mayoría de los trabajos consultados, que reportan efectos hipocolesterolémicos e hipoglucemiantes de flavonoides de cítricos, los estudios han sido realizados con extractos o fracciones de cítricos y no con productos complejos como lo es un alimento. Por lo anterior, es importante explorar si, después de formular un alimento con un ingrediente a base de lima dulce y/o naranja agria, el efecto hipocolesterolémico o hipoglucemiante se mantiene.

Por tanto, surge la pregunta ¿Habrán interacciones entre las sustancias bioactivas y los polisacáridos presentes o añadidos en un jugo de naranja agria y/o lima que afecten o beneficien la biodisponibilidad y estabilidad de los flavonoides y su efecto hipoglucemiante e hipocolesterolémico?

Para tratar de entender lo antes planteado, es de suma importancia comprender qué pasa dentro de este alimento debido a la interacción de los ingredientes y al proceso de transformación/conservación, así como analizar el tipo de interacciones fisicoquímicas o químicas que interfieren o coadyuvan sobre el efecto biológico. Una estrategia metodológica para comprender y estimar o medir las posibles interacciones fisicoquímicas de los flavonoides entre sí y/o con el resto de las sustancias que forman la matriz, puede ser el uso de un sistema modelo a base de los flavonoides aislados presentes en los cítricos de interés y los aditivos susceptibles de ser adicionados a un jugo (pectina y β -ciclodextrina).

Nuestra hipótesis es que, de esta manera, se puede determinar si existen interacciones entre moléculas y si estas interacciones impactarán sobre la disponibilidad y estabilidad de los flavonoides y así, generar conocimiento que sustente la obtención de un producto físico-químicamente estable, que además de todo, mantenga sus propiedades biológicas lo mejor posible al momento en que sea consumido, con lo cual se podría aprovechar de manera integral estos dos cítricos.

10.Hipótesis

Siguiendo las interacciones fisicoquímicas en un sistema modelo a base de algunos de los flavonoides de lima y naranja agria y polisacáridos (pectina, β -ciclodextrina), se obtendrá información sobre las interacciones fisicoquímicas en un sistema controlado, lo que ayudará a comprender las interacciones de un sistema más complejo como un producto a base de estos dos cítricos. De igual manera, se podrá explicar el efecto de estas interacciones, sobre la disponibilidad y estabilidad de los flavonoides y su posible efecto hipoglucemiante e hipocolesterolémico en un modelo animal.

11.Objetivos

11.1 Objetivo general

Explorar la existencia de interacciones fisicoquímicas entre algunos flavonoides de lima (*Citrus limetta*) o naranja agria (*Citrus aurantium*) y la matriz de β -ciclodextrina y pectina en un sistema modelo y en un producto a base de estos dos cítricos, y evaluar el efecto sobre su actividad hipocolesterolémica e hipoglucemiante en un modelo animal.

11.2 Objetivos específicos

- 1.- Implementar los métodos de medición de la capacidad antioxidante (DPPH), y de la identificación y concentración de flavonoides (flavonoides totales por $AlCl_3$ y HPLC).
- 2.- Evaluar los jugos frescos y la fórmula seleccionada mediante pruebas fisicoquímicas, capacidad antioxidante, e identificación y concentración de flavonoides.
- 3.- Medir las interacciones fisicoquímicas controladamente utilizando un sistema modelo con flavonoides de lima o naranja agria y polisacáridos (pectina y β -Ciclodextrina) estimando las interacciones por medio de las variables de respuesta capacidad antioxidante (DPPH), además del perfil y concentración de flavonoides.
- 4.- Evaluar *in vivo* la capacidad hipoglucemiantes e hipocolesterolémica de los sistemas modelo, del jugo fresco y del jugo modificado de lima o de naranja agria.

12.Fundamento

12.1 Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son aquellos que, al consumirse de manera regular, además de satisfacer las necesidades nutrimentales básicas, proporcionan beneficios para la salud o reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Estos regularmente contienen distintas cantidades o tipos de compuestos bioactivos. Los compuestos bioactivos son metabolitos secundarios de las plantas y su producción depende del estado fisiológico y el desarrollo de éstas, además dichos compuestos han demostrado tener un efecto benéfico en la salud de las personas que los consumen. (Fernandes et al. 2014; Juárez et al 2005).

Para llamarlo alimento funcional se enfatizan 3 aspectos importantes (Gil-Chávez et al. 2013):

1. El efecto funcional debe ser diferente a aquel proporcionado por la nutrición normal
2. Este efecto debe demostrarse satisfactoriamente y
3. El beneficio puede consistir en la mejora de una función fisiológica o en la reducción del riesgo de desarrollar un proceso patológico.

Este tipo de alimentos están irrumpiendo con fuerza en los mercados internacionales y la nueva concepción de “alimento funcional” requiere nuevas metodologías e instrumentos para investigar y evaluar los efectos funcionales. Se cree que los alimentos como frutas y verduras son la forma más simple de alimentos funcionales debido a su gran contenido de compuestos bioactivos, sin embargo, al usar frutas y verduras como ingredientes o componentes de un alimento y afirmar que tienen un efecto, se requiere confirmar dicho efecto y una de las primeras acciones que permiten confirmarlo, es identificar los cambios de disponibilidad que pudieran darse debido al acondicionamiento, proceso y almacenamiento, así como a las interacciones fisicoquímicas entre los compuestos bioactivos y los otros componentes del alimento. También es necesario evaluar su impacto en las funciones del organismo y obtener evidencia sobre los mecanismos implicados en las interacciones. Para llevar a cabo esto, es necesario realizar estudios *in vivo* o *ex vivo* en

líneas celulares o tejidos en cultivo, modelos animales y estudios de observación o intervención en personas (Guarner y Azpiroz 2005; Gil-Chávez et al., 2013).

Además se deben identificar y validar los marcadores biológicos relevantes para evaluar las funciones de los compuestos bioactivos en el organismo e investigar la modulación de los marcadores en los alimentos. Se reconocen distintos tipos de marcadores, los de exposición, que son aquellos que demuestran una exposición a un alimento o componente funcional, por ejemplo: niveles de colesterol, glucosa en plasma, presencia de probióticos en heces etc., también pueden ser aquellos útiles para medir la respuesta a una intervención y son los que reflejan directamente una función biológica o psicológica (presión arterial, cuestionarios de calidad de vida o bienestar) o son factores intermedios en un proceso fisiológico o fisiopatológico (índice de masa corporal, niveles de hemoglobina glucosilada como factores que predicen desarrollo de diabetes tipo 2) (Guarner y Azpiroz 2005).

Sin embargo, en la actualidad no todas las investigaciones ni las industrias toman en cuenta estos puntos de vital importancia en el desarrollo y autenticidad de un alimento funcional, considerando como alimento funcional aquel que contenga componentes biológicamente activos que ofrezcan un beneficio a la salud. Por tanto, es importante conocer, en primera instancia los ingredientes que constituyen el alimento, conociendo a fondo su procedencia y los posibles compuestos bioactivos presentes en ellos (Juárez et al., 2005).

Buscando dar un valor agregado a los cítricos y promover su consumo se les considera alimentos funcionales pero en realidad ¿los productos hechos a base de cítricos son alimentos funcionales?

12.2 Cítricos

12.2.1 Producción de cítricos

La producción de frutos incluidos los cítricos en México para el 2012 fue de 17,751,396 toneladas. Los datos estadísticos, muestran a México como el quinto productor de cítricos a nivel mundial con (4.6%), por detrás de China (21%), Brasil (18%), Estados Unidos de Norte América (8%) e India (6%). La citricultura en México es una actividad, que se realiza en poco más de medio millón de hectáreas en regiones de clima tropical y subtropical en 23

entidades federativas. De esta superficie aproximadamente el 80% se destina a los denominados cítricos dulces cuya producción es del orden de 4.9 millones de toneladas por cosecha principalmente naranja, toronja, mandarina y tangerina (SAGARPA 2012).

En el 2013 México produjo 18,125 t de lima dulce, de estas a su vez 12, 557 fueron producidas en Jalisco. En el estado, entre 2007 y 2012, esta producción ha fluctuado entre poco menos de 9,000 y 11,000 t, sin embargo, hace 10 años se producían cerca de 5,000 t más (SAGARPA 2013). Debido a la inestabilidad y disminución de la producción se buscan alternativas al consumo en fresco y al consumo local así como fomentar el cultivo. Una opción puede ser la industrialización que conserve las características sensoriales deseables de este cítrico para abrir opciones de comercialización.

En el caso de la naranja agria, debido a su extremada acidez, el consumo es muy limitado, siendo quizá la causa de que no haya un cultivo sistematizado, sin embargo, en la zona metropolitana de Guadalajara, los arboles productores de estos cítricos son utilizados como ornamento en las calles, pero sus frutos no son consumidos, produciendo contaminación por parásitos, mosquitos y basura. Si existieran alternativas de uso podrían aprovecharse esos frutos, y promoverse su cultivo contribuyendo así a mantener la diversidad de especies.

12.2.2 Taxonomía

La palabra cítrico deriva del latín *citrus*. En cuanto a su origen botánico, es muy probable que los cítricos que se conocen actualmente provengan de tres taxones principales: cidros, mandarinos y pomelos o zamboas. Estos taxones favorecidos por distintas circunstancias dieron lugar a las diferentes especies que se encuentran en el mundo, estos frutos parecen ser originarios del sur de China y nordeste de la India. Actualmente se cultivan en más de un centenar de países de clima tropical y subtropical, en una superficie de unos 7.4 millones de hectáreas (Kimball, 1999).

Los cítricos pertenecen al orden de *Geraniales*, suborden *Geranineas* y familia *Rutáceas*, subfamilia *Aurantioideas* y tribu *Citrea*, que comprende 3 subtribus. Una de ellas, la

Citrina, abarca 13 géneros entre los que se encuentra los 3 principales que han dado origen a la citricultura comercial: *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella*.

La naranja agria o *Citrus aurantium* pertenece a la familia de las Rutaceas, el árbol llega a medir entre 3 y 5 metros, sus hojas son verde oscuro brillante, elípticas y olorosas, florecen a principios de la primavera, sus flores son blancas y aromáticas, el fruto es redondo de aproximadamente 7-8 cm de diámetro con superficie rugosa con un color naranja intenso al estar maduro. Este fruto se cultiva en huertos familiares o como ornamento, en Guadalajara está presente como ornamento en las calles de la ciudad (Lopez-Núñez, 2014).

La lima dulce (*Citrus limetta*) también pertenece a la familia de las rutaceas, es originaria de Asia, habita en climas cálidos y templados, el fruto puede llegar a medir hasta 6 cm de longitud y su color es verde-amarillento cuando son maduros con una protuberancia característica en la punta, son el más tropical de los cítricos, se utiliza principalmente como jugo, como ingrediente en bebidas alcohólicas y para la producción de aceite esencial para perfumería o elaboración de saborizantes (Kimball, 1999).

12.3 Composición de la lima y la naranja agria

12.3.1 Anatomía y biología de los cítricos

Los cítricos se componen de un exocarpio exterior llamado flavedo, que contiene las sustancias responsables del color, un mesocarpio blanco esponjoso llamado albedo y bajo este se encuentran los gajos de fruta, separados por un tejido membranoso llamado septo (figura 1). Cada gajo contiene numerosas vesículas de forma alargada que están unidas al centro de la fruta, estas contienen muchas células del jugo formadas en su mayor parte por vacuolas extendidas. Se ha comprobado que el jugo de la vacuola es transparente y no contiene materia opaca o turbia, sin embargo, durante la maduración se acumulan carbohidratos y agua procedentes de la savia del árbol, además la acidez también evoluciona durante la maduración, que en general alcanza elevadas concentraciones en las frutas tempranas y va disminuyendo como consecuencia del efecto de dilución que se produce por el crecimiento de la fruta (Kimball, 1999).



Figura 1 Anatomía del cítrico

La microestructura natural de las frutas consiste en células hidratadas rodeadas por la pared celular (vacuola), con núcleo, citoplasma y membrana plasmática, dentro de estas se encuentra la mayor cantidad de compuestos bioactivos disponibles para llevar a cabo su función biológica (Jakobek, 2015)

12.3.2 Composición química

Debido a lo anteriormente expuesto los cítricos tienen una composición química compleja. Los carbohidratos representan la mayoría de los sólidos solubles (80%), incluyendo azúcares reductores y no reductores, los cuales están presentes tanto como azúcares simples, como en forma de polisacáridos. Entre los monosacáridos, los de mayor cantidad son la glucosa y la fructuosa debido a la descomposición enzimática de la sacarosa que es el azúcar más abundante en estos frutos. Los polisacáridos se encuentran como pectina (galacturononas) y se clasifican en: protopectina, ácido pectínico, pectina y ácidos pécticos. La mayor cantidad de pectina total se encuentra en la piel del cítrico y disminuyen conforme la fruta madura (Kimball, 1999). Además se considera una fuente importante de fibra y de vitaminas como las C, A, E y el complejo B, de igual manera, tiene un gran contenido de ácido cítrico y minerales como calcio, hierro magnesio, fosfato, que varían en cantidad durante la maduración del fruto.

En la tabla 1 se muestran la composición de la lima y la naranja agria de acuerdo a las tablas de valor nutritivo de los alimentos, estos valores se tomaron en 100 g del fruto (Muñoz de Chavez et al. 2002).

Tabla 1. Valor nutricional de los cítricos estudiados

Nutrimiento	Unidades	Lima	Naranja agria
Porción comestible	%	63	63
Energía	kcal	47	65
Humedad	%	88.3	82.4
Fibra dietética	g	0.50	1.3
Carbohidratos	g	10.50	13.40
Proteínas	g	0.70	1.5
Lípidos totales	g	0.20	0.6

Para consultar los valores de los micronutrientes (vitaminas y minerales) ver anexo 1 (Muñoz de Chavez et al. 2002)

La fibra dietética es uno de los compuestos que interactúa en mayor proporción con los compuestos bioactivos, cambiando sus propiedades fisiológicas y protegiéndolos para que se localicen en los lugares apropiados para su absorción y digestión. La fibra dietética se puede definir como el remanente de los frutos que permanece después de la hidrólisis de las enzimas del sistema digestivo, incluyendo material de la pared celular y polisacáridos intracelulares. Se puede dividir en insoluble (compuestos como la lignina y la celulosa) y soluble (pectina, β -glucanos, etc.) y su principal función es proveer de sustrato para la fermentación de las bacterias del intestino grueso (Saura-Calixto, 2011).

Al procesar los cítricos en un jugo, se resalta que solo quedan azúcares reductores, la cantidad de pectina total se ve influenciada por la cantidad de pulpa presente en el jugo. En cuanto a los ácidos hay una reducción en los jugos pasteurizados. Las proteínas y los lípidos no presentan cambios significativos al someterse a pasteurización (Kimball, 1999).

12.3.3 Pectinas

Las pectinas son una familia de polisacáridos complejos que forman parte de los componentes de la pared celular de las plantas superiores, son ácidos pectínicos con diferentes grados de esterificación y neutralización que pueden contener entre 200 a 1000 unidades de ácido galacturónico. Las protopectinas son moléculas altamente esterificadas con metanol y muy solubles en agua (Pérez-Martínez et al. 2013), estos compuestos se encuentran mayormente en los frutos inmaduros y son responsables de la textura rígida, se

encuentran presentes en todos los alimentos de origen vegetal pero en mayor cantidad en los cítricos como naranja, limón, toronja y lima o en frutos como la manzana y pera. A nivel industrial se pueden utilizar como espesantes, agentes gelificantes o bien como estabilizadores, ayudando en el mantenimiento de una dispersión fina de dos (o más) fases inmiscibles (Li et al. 2008; Fry 2011).

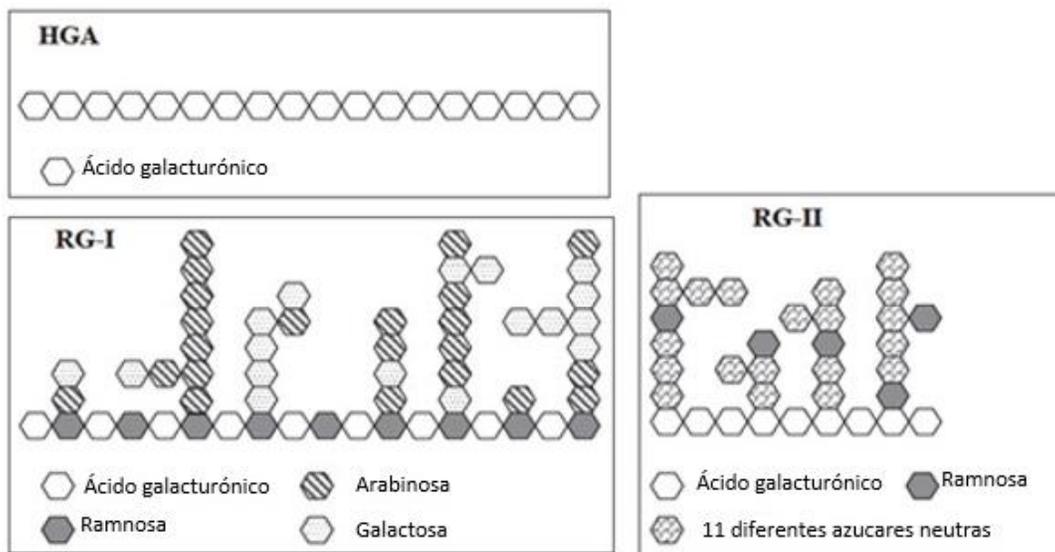


Figura 2 Estructuras de los dos dominios pectico-polisacáridos más comunes que constituyen pectinas: homogalacturonano (HGA) y ramnogalacturonano (RG) I y II

Su estructura se compone de diferentes regiones, las regiones homogalacturonano (HGA), generalmente llamadas "regiones lisas", consisten en una repetición de Ramnogalacturonano ligada al ácido D-galacturónico por enlaces (-1,4). El grado de polimerización es habitualmente entre 75 y 100 (Panouillé, Thibault y Bonnin 2006). Los residuos de ácido galacturónico pueden estar parcialmente metilados (no esterificado) y/o tener grupos acetilo (esterificado), las regiones de ramnogalacturonano I (GR-I), también llamadas "regiones peludas", están constituidas por una secuencia alterna de ramnosa, ácido D-galacturónico, arabinosa y galactosa. Otro tipo de ramnogalacturonano (RG-II) es un componente menor de las pectinas; su estructura es muy compleja y se compone de al menos 12 monómeros diferentes. Las estructuras de las regiones HG y RG son bastante conocidas, pero su modo de combinación sigue siendo poco clara (figura 2).

Las pectinas con un grado de esterificación de 50% o más son conocidas como pectinas de alto metoxilo, éster de alto grado de esterificación y aquellas con una esterificación de menos de 50% (figura 3) son las pectinas de bajo metoxilo, éster de bajo grado de esterificación (Mazumder et al. 2004).

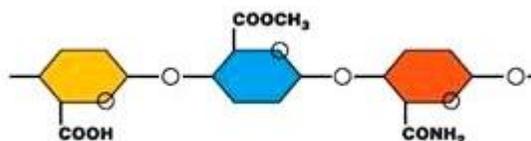


Figura 3. Grupos sustituyentes de las pectinas, amarillo: carboxilo, azul: sustituyente éster, roja: sustituyente amida

Además de los nutrimentos mencionados anteriormente los cítricos cuenta con pequeñas cantidades de compuestos no nutricionales entre los que se encuentran los terpenoides como el citral y el limoneno, que se sintetizan en el flavedo y es a estos compuestos a los que los cítricos deben su aroma. También se encuentran los polifenoles que dan las notas amargas al cítrico y han demostrado poseer capacidad antioxidante y tener efectos benéficos para la salud de los consumidores (Mahmoud et al. 2012).

Los frutos y sus jugos son la principal fuente de estos compuestos, sin embargo rara vez se encuentran libres, regularmente se encuentran interactuando con los compuestos de la matriz alimentaria en especial con la fibra dietética (Saura-Calixto et al., 2007; Saura-Calixto et al., 2011).

12.3.4 Flavonoides

12.3.4.1 Estructura y clasificación

Los flavonoides son el derivado más abundante de los compuestos fenólicos y son caracterizados por tener una estructura base 2-fenil-benzo- γ -pirano, la cual consiste en 2 anillos de benceno unidos por un anillo de pirano heterocíclico (Figura 4). Mostrando entonces un esqueleto de difenilpiranos (C6-C3-C6) (Kamran y Dangles 2014). Son pigmentos no nitrogenados solubles en agua, metanol y etanol que pueden tener estructuras simples o muy complejas debido a la polimerización. Son sintetizados en las plantas

encontrándose abundantemente en uvas, manzanas, cebollas, cerezas, repollo entre otros vegetales (Heim et al., 2002; Chi-Tang et al., 2008).

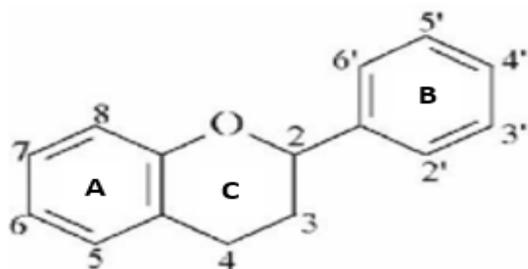


Figura 4. Estructura base del flavonoide

Dependiendo de los grados de oxidación e insaturaciones del anillo heterocíclico (pirano) se pueden diferenciar varias clases de flavonoides, estos compuestos a menudo se encuentran hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5'. La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina la subdivisión en dos clases principales: los 3-hidroxi flavonoides (flavanonas, flavonoles, antocianidinas (flavan-3-ol, flavan-4-ol y flavan-3,4-diol) y dihidroflavonoides) y los flavonoides sin sustitución en el C3 (flavanones y flavones), los esqueletos base se podrán apreciar en la tabla 2 (Marais et al. 2006; Tripoli et al. 2007; Jakobek 2015).

Los flavonoides pueden unirse a polímeros biológicos; tales como: enzimas, transportadores de hormonas y ADN, también tienen la capacidad de quelar iones metálicos transitorios como: Al, Cu y Fe entre otros, son capaces de catalizar el transporte de electrones y atrapar radicales libres (Hădărugă et al. 2012)

Tabla 2. Clasificación de los flavonoides según su composición química

Subgrupo	Estructura	Ejemplo	Fuentes
Antocianidinas		Antocianinas Cianidinas Delfinidinas	Moras Grosellas Uvas Cerezas
Flavanoles		Catequinas Epicatequinas	Manzanas Té Uvas rojas
Flavonas		Diosmetina Tangeretina Luteolina	Perejil Apio Pimiento
Flavonoles		Quercetina Rutina Kaemferol	Cebolla Brócoli Manzana Té
Flavanonas		Hesperidina Naringina Eriocitrina Neeriocitrina Neohesperidina	Frutas cítricas
Isoflavonas		Genisteina Gliciteina	Soya y leguminosas

12.3.4.2 Biosíntesis en plantas

Estos compuestos se sintetizan por medio de 2 precursores: manoil-CoA y p-cumaroil-CoA, que se originan en el metabolismo de carbohidratos y por la vía de fenilpropanoide, respectivamente. Después de la condensación de 3 moléculas de manoil-CoA y una de cumaroil-CoA se forma el compuesto 2', 4,4',6' tetrahidroxichalcona, este paso se cataliza por la enzima chalcona sintasa (CHS), debido a su inestabilidad se cicla formando 4',5,7 trihidroxiflavanona con acción de la enzima chalcona isómeras(CHI), esta estructura es el precursor para la formación de todos los tipos de flavonoide (Figura 5). En los cítricos, enzimas como UDP-glocosa-flavanona-7-O-glucosiltransferasa (UFGT) y la UDP-ramnosa-flavanona glucosido ramnosiltransferasa (UFGRT) convierten flavanonas sin residuo glucosídico (agliconas) en sus correspondientes glucósidos o ramnoglucosidos (Kamran y Dangles 2014).

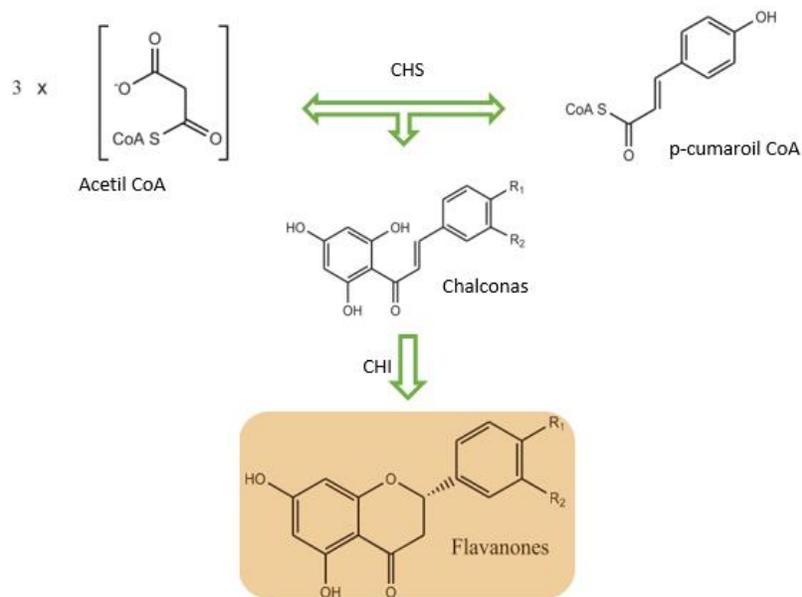


Figura 5. Biosíntesis de flavonoides en plantas (Kamran y Dangles 2014)

12.3.4.3 Flavanonas.

En cuanto a los flavonoides presentes en los cítricos, la mayoría pertenecen al grupo de las flavanonas y se han identificado cinco muy frecuentes: hesperentina, naringenina, taxifolina, isosakuranetina y eridictiol (Gattuso et al. 2007). Específicamente en la lima (*Citrus limetta*), los que se encuentran en mayor concentración son la eriocitrina y la hesperidina (Saeidi et al. 2011; Barreca et al. 2011b). En cuanto a la naranja agria (*Citrus aurantium*) los flavonoides más abundantes son la naringina y neohesperidina (Barreca et al. 2011a).

La naringina y la neohesperidina son los flavonoides principales de la naranja agria debido a su alta concentración en todas las partes del cítrico, estos compuestos se encargan de dar a este fruto un sabor amargo, se caracterizan por tener un residuo glucosídico unido al anillo A del flavonoide, este azúcar es una neohesperidosa (figura 6) y le proporciona el amargor característico a estos compuestos. La naringina proviene de la aglicona naringenina y la neohesperidina de la hesperetina. (Peterson, Dwyer, et al. 2006; Tripoli et al. 2007),

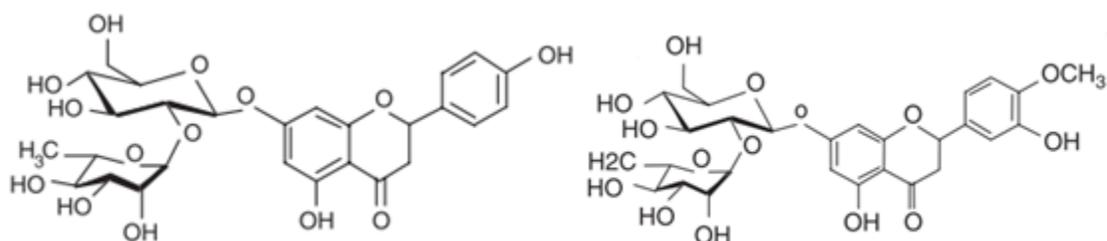


Figura 6. Estructura química de los flavonoides característicos de la naranja agria, izquierda: naringina, derecha: neohesperidina.

La hesperidina y la eriocitrina por su parte, son moléculas que están unidas a residuos disacáridos de rutinosa (figura 7), debido a esto no tienen sabor, se encuentran presentes en mayor medida en limones, naranjas dulces, mandarinas y son los flavonoides representativos de la lima gracias a su alta concentración en ella (Barreca et al. 2011b). La eriocitrina proviene de la aglicona eridictiol mientras que la hesperidina al igual que la

neohesperidina proviene de la hesperetina.(Tripoli et al. 2007; Peterson, Beecher, et al. 2006).

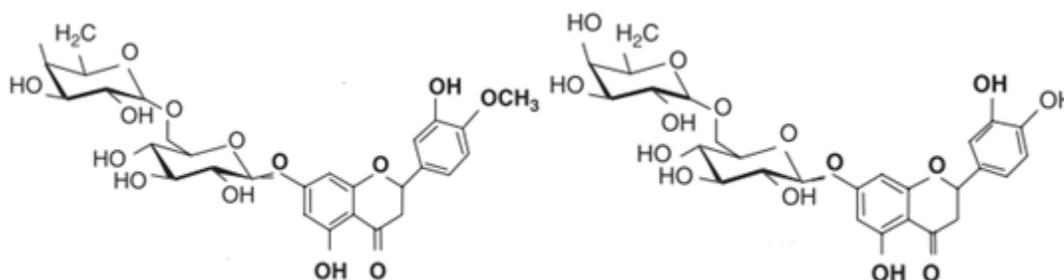


Figura 7 Estructura química de los flavonoides característicos de la lima dulce, izquierda: hesperidina, derecha: eriocitrina

12.3.4.4 Técnicas de identificación y cuantificación de flavonoides.

Hay numerosas técnicas que nos permiten cuantificar e identificar el contenido de flavonoides dentro de una muestra, entre ellos la cromatografía. Esta técnica se basan en la separación de los distintos compuestos de una mezcla en función de la afinidad de cada compuesto por dos fases inmiscibles, una de las fases se considera la fase móvil, esta fase está en constante movimiento y la otra se considera la fase estacionaria, si los compuestos son más afines a la fase móvil avanzan con mayor rapidez mientras que aquellos que son afines a la fase estacionaria avanzan más lentamente, la fase móvil puede ser un gas un líquido o un fluido supercrítico, mientras que la fase estacionaria puede ser sólida o líquida (Reich y Schibli 2006).

Debido a la estructura química de los flavonoides estos pueden identificarse y cuantificarse por cromatografía de capa fina (TLC) en este caso la fase estacionaria se encuentra en una placa plana y la fase móvil corre por capilaridad o por gravedad, o por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión. (Mattila, Astola y Kumpulainen 2000; de Rijke et al. 2006; Roowi y Crozier 2011; Saeidi et al. 2011), además se pueden cuantificar por técnicas de espectrofotometría que se basan en un cambio de coloración, la técnica más utilizada es aquella que requiere tricloruro de aluminio en la cual se forma un complejo de

inclusión de los flavonoides con el tricloruro. (Rijke et al. 2006; Tagliazucchi et al. 2010; Mammen y Daniel 2012;)

12.3.4.5 Bioaccesibilidad biodisponibilidad y metabolismo de las Flavanonas.

La bioaccesibilidad se define como la cantidad de un constituyente alimentario que está presente en el intestino, como consecuencia de la liberación de este constituyente de la matriz alimentaria pudiendo ser capaz de pasar a través de la barrera intestinal. La capacidad de los flavonoides de ejercer un efecto biológico está relacionada con la bioaccesibilidad de estos compuestos en el intestino (Jakobek, 2015).

Calixto et al. (2007) realizaron un estudio para demostrar la bioaccesibilidad y el contenido total de polifenoles en la dieta y demostraron que en el caso de las frutas, el mayor contenido de flavonoides es liberado en el intestino grueso (Saura-Calixto et. al., 2007).

La biodisponibilidad es la cantidad y velocidad con la que las sustancias bioactivas se absorben y se convierten en disponibles en el sitio de acción. La biodisponibilidad se ve influenciada por distintos aspectos: el estado químico de los nutrientes, su liberación de la matriz alimentaria, las posibles interacciones con otros componentes del alimento entre otros aspectos (Jakobek 2015; Parada y Aguilera 2007).

Los flavonoides, son compuestos sensibles a la degradación mediante la digestión, su sitio de absorción es el intestino delgado, si estos compuestos logran llegar intactos a la barrera intestinal, su biodisponibilidad se ve influenciada por el carácter liposoluble de los compuestos, lo cual les dará una mayor o menor afinidad por las membranas biológicas y la probabilidad de atravesarlas por difusión pasiva o activas (Palafox-Carlos et. al., 2011).

Después del consumo oral, las flavanonas glucosadas son hidrolizadas en el intestino delgado y colon, liberando sus agliconas, las cuales se convertirán en sus respectivos glucurónidos, sulfatos y sulfoglucurónidos, finalmente estos residuos son distribuidos por el plasma a varios sitios celulares y una parte es secretado por la orina (Matsumoto et al.

2004). La absorción intestinal y el sitio de metabolización varían dependiendo de la concentración de glucósido y la estructura de la flavanona (Palafox-Carlos et. al.,2011). Las flavanonas con residuo rutinoso se hidrolizan más rápido que aquellas con residuo neohesperidoso, además la permeabilidad de las células epiteliales influye en la absorción intestinal, las agliconas son absorbidas con mayor eficiencia por la monocapa celular que las flavanonas glucosiladas (Kamran y Dangles 2014).

La naringina, hesperidina, neohesperidina y eriocitrina se deglucosilan en el intestino delgado y se absorben en la parte distal del intestino (ciego), las agliconas son convertidas en ácidos glucurónidos o sulfatos durante la transferencia de la luz intestinal a la vena porta por la acción de las enzimas UDP-glucuronosiltransferasa y sulfotransferasa. En el ciego, la flora microbiana también degrada las agliconas en ácidos fenólicos como p-hidroxifenilpropionico, p-cumarico p-hidroxibenzioco. Por ejemplo, la eriocitrina es metabolizada por la flora microbiana intestinal (*Bacterioides distasomis* o *Bacterioides uniformis*) para convertirla en eriodictol que es después convertido en ácido 3-4 dihidroxicinamico por *Clostridium butiricum*. Una presentación esquemática del metabolismo se puede apreciar en la figura 8 (Kamran y Dangles 2014; Palafox-Carlos et al. 2011).

Las propiedades biológicas de los flavonoides dependen de su bioaccesibilidad y su biodisponibilidad. Una parte de los polifenoles se libera en la parte alta del tracto gastrointestinal por la solubilización directa en los fluidos intestinales o por la acción de enzimas digestivas, y otros se liberan en el intestino grueso, por lo tanto, se puede dividir a los compuestos fenólicos en: accesibles en el intestino delgado, que serán aquellos como las vitaminas, polifenoles de bajo peso molecular o carotenoides y aquellos accesibles en el intestino grueso, que son los polifenoles con alto grado de polimerización, los flavonoides glucosilados y aquellos asociados a la matriz alimentaria (Saura-Calixto, 2011).

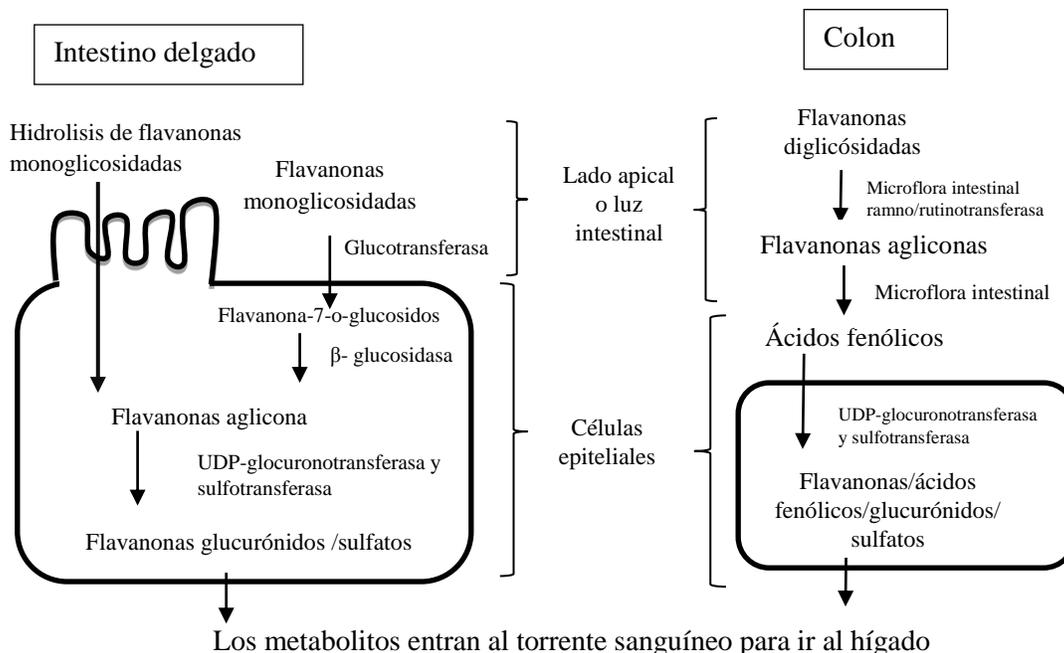


Figura 8. Presentación esquemática del metabolismo de las flavonas en el intestino delgado y grueso
(Kamran y Dangles 2014)

12.3.4.6 Efectos biológicos

La principal función de los flavonoides, es la de antioxidantes, que son moléculas que tienen la capacidad de aceptar o donar un átomo o electrón para formar componentes relativamente estables y puede actuar a través de distintos caminos como:

- La donación de electrones del grupo OH para evitar la superoxidación: $\text{OH} \rightarrow \text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^-$. El oxígeno es una de las moléculas más oxidantes y la principal molécula formadora de radicales superóxido.
- La quelación de metales (Spencer et. al., 2009).

La superoxidación es una reacción en cadena que por medio de la captación de un radical libre (moléculas con un par de electrones desapareados) forma especies reactivas de oxígeno (ERO), estas moléculas se puede generar de manera exógena o endógena y el exceso de ERO en un sistema biológico puede causar daño celular. Las principales biomoléculas que se ven afectadas por las especies reactivas de oxígeno son las proteínas, los lípidos y el ADN (Konigsberg, 2012).

Dentro del organismo, los radicales libres atacan a los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de una membrana, causando alteraciones importantes como cambios en la fluidez y permeabilidad. Cuando se pierde fluidez, se altera la estructura de las proteínas transmembranales, debido a que en la membrana se encuentran receptores de hormonas y factores de crecimiento que al modificarse pierden la afinidad por sus ligandos y ya no pueden activar los mecanismos de segundos mensajeros (Iacobini et. al. 2009).

Otro daño muy importante se produce al oxidar las proteínas. La oxidación proteica, dentro de los productos cárnicos, por ejemplo, está ligada a la pérdida de aminoácidos esenciales resultando en cambios en la textura, color y contenido de agua además de alteración en la funcionalidad de la proteína (Estévez et al. 2011). Después de la oxidación proteica, la carne al ser cocinada, perderá características sensoriales deseables como su jugosidad, suavidad y color además de las características nutrimentales deseables (Lund et al. 2011).

Hay algunos aminoácidos más susceptibles al ataque de las ERO como la histidina, prolina, cisteína, el triptófano, la tirosina y en menor grado la arginina, lisina y metionina. Dependiendo del aminoácido que reaccione puede haber cambios en la estructura primaria de una proteína, ya que un residuo puede modificarse y transformarse en otro diferente. Se ha demostrado que las modificaciones en las proteínas debidas a la oxidación está relacionado con el desarrollo de enfermedades como la diabetes, aterosclerosis, diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiacas además de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad como el Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y Parkinson (Utrera 2014; Yoshida 2007).

El metabolismo normal de todas las células animales y otros organismos aerobios implica la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales en el funcionamiento correcto del organismo, son neutralizadas mediante dos sistemas de defensa: el endógeno, que incluye moléculas orgánicas y enzimas producidas por el organismo y el sistema exógeno que incluye una serie de compuestos orgánicos adquirido por la dieta, capaces de neutralizar las especies reactivas. Dentro de este tipo de compuestos tenemos las vitaminas antioxidantes, los carotenoides y compuestos polifenólicos, entre otros.

Los flavonoides al ser agentes reductores que actúan directamente sobre las especies reactivas de oxígeno, detienen las reacciones en cadena que generan las EROS dando estabilidad a los radicales libres y evitando daños tanto al alimento como al propio cuerpo humano, sin embargo, su eficiencia depende de su estructura química (Landete 2012). Esta afirmación está relacionada con la presencia de estructuras O-dihidroxi en el anillo B, lo cual confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; una doble ligadura en el C2 y C3 del anillo C además de grupos OH en carbono 3- y 5- con función 4-oxo en los anillos A y C son necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante (Figura 9) (Fraga et al. 2010). Además, influyen aspectos físicos como la presencia o ausencia de glucósidos, si el flavonoide esta glucosado parece disminuir su capacidad antioxidante debido a la falta de participación del grupo OH que está formando el enlace glucosídico. De igual manera parece haber una influencia del tipo de glúcido unido a la estructura base observando que al unirse con una neohesperidosa parece afectar la capacidad antioxidante, mientras que la unión con una ramnosa no afecta su capacidad (Calgarotto et al. 2007; Tripoli et al. 2007; Williams, Spencer, y Rice-Evans 2004).

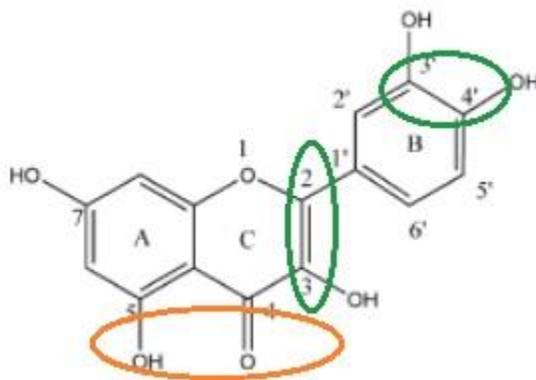


Figura 9. Estructura base de flavonoides con los sitios a los que debe su capacidad de captación de radicales libres (Williams y Spencer 2012)

Su capacidad antioxidante también se afecta por el medio en que reaccionan, si estos se encuentran en un medio hidrófilo presentan mayor capacidad antioxidante que cuando se encuentra en un medio lipofílico (Kamran y Dangles 2014).

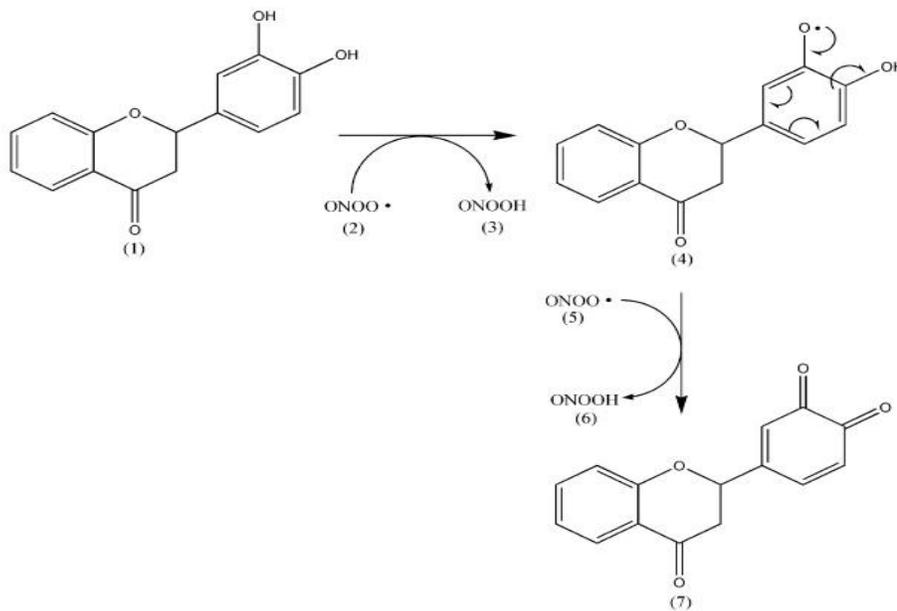


Figura 10. Ejemplo del mecanismo antioxidante (Calgarotto et al. 2007)

Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (RL). Otros autores se refieren además a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa, la ciclo-oxigenasa, la mielo-peroxidasa, la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO); evitando la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos (Williams y Spencer 2012).

Un estudio realizado por Calgarotto et al. (2007) propone un mecanismo teórico en el que el peroxinitrito remueve dos hidrógenos de un compuesto fenólico y se reduce a si mismo formando 2 moléculas de ácido peroxinitroso además de un flavonoide oxidado (figura 10) (Calgarotto et al. 2007).

En los sistemas biológicos, los metales activos (hierro y cobre) catalizan la reacción de producción de radicales libres; el secuestrar los iones para evitar que catalicen la reacción es otra estrategia antioxidante (Fraga et al. 2010).

La unión flavonoide-metal se lleva a cabo preferentemente en el grupo 3-hidroxil-4-carbonil, seguido del grupo 4-carbonil-5-hidroxil y el grupo 3'-4'-hidroxilo si está presente; el metal se puede unir hasta con 3 flavonoides y dar distintas conformaciones como se muestra en la figura 11, en donde los inciso a, b y c representan las uniones mencionadas anteriormente, d y e hacen referencia a unión con 2 flavonoides mientras que f y g con 3 flavonoides todo lo anterior en el caso del hierro (Ren et al. 2008).

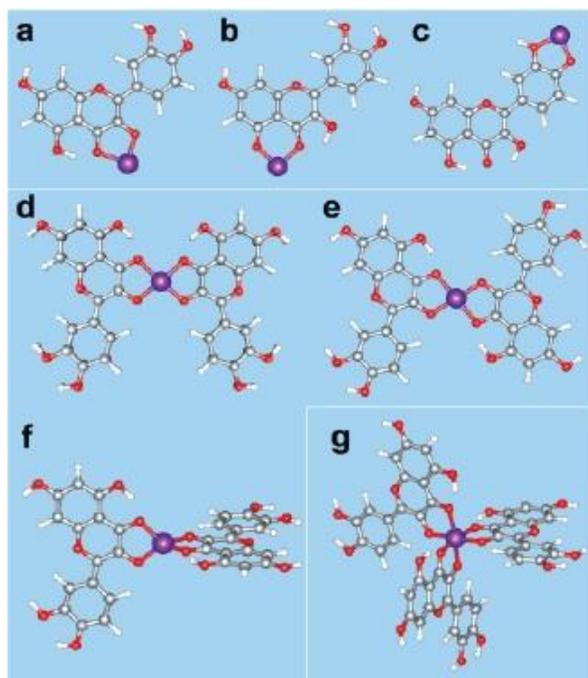


Figura 11. Unión de quercetina (estructura blanca) con hierro (estructura morada) (Ren et al. 2008)

En los últimos años se han desarrollado diversos métodos para determinar la capacidad antioxidante de productos naturales que exhiben esta propiedad. Las características esenciales de cualquier prueba de capacidad antioxidante son: un sustrato adecuado en el cual pueda ser monitoreada la inhibición de la oxidación (flavonoides), un radical libre que nos ayude a iniciar la oxidación y la medición adecuada del punto final de la oxidación (Robles-Sánchez et al. 2007). Hay métodos de medición *in vitro* e *in vivo* que se basan en la capacidad de secuestrar radicales libres o que miden el estrés oxidativo (Rodríguez-Roque et al. 2012).

Los compuestos antioxidantes pueden desactivar los radicales libres mayoritariamente mediante dos mecanismos:

- La donación de átomos de hidrogeno, HAT por sus siglas en inglés,
- La transferencia de un solo electrón SET (Prior, Wu y Schaich 2005)

Los métodos *in vitro* más utilizados en el análisis de frutas y verduras se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos más utilizados para determinar la capacidad antioxidante de muestras naturales

Método	Tipo de mecanismo	Radical utilizado
ORAC (oxygen radical absorbance capacity)	HAT	ROO
TRAP (Total radical trapping antioxidant parameter)	HAT	AAPH, ABAPH
Inhibición de oxidación de LDL	HAT	LDL aislado de muestras de sangre
TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)	SET y HAT	ABTS
FRAP (Ferring ion reducing antioxidant parameter)	SET	TPTZ
DPPH (Diphenil-1-picrylhydrazyl)	SET y HAT	DPPH

(Prior, Wu y Schaich 2005; Robles-Sánchez et al. 2007)

Pero la capacidad antioxidante de los flavonoides no es el único efecto biológico que se ha logrado demostrar, también compuestos como la hesperidina y la naringina han demostrado la capacidad de inhibir enzimas responsables de la señalización, transducción y activación celular durante la respuesta inflamatoria, además afectan algunas células involucradas en la respuesta inmune incluyendo linfocitos T y B (Kamran y Dangles 2014; Tripoli et al. 2007).

Los flavonoides tienen efecto anticancerígeno debido a que pueden proteger el ADN del daño por su capacidad de absorber luz ultravioleta y neutralizar los radicales libres que promueven la mutación, la naringina juega un papel importante al incrementar la actividad de enzimas como la superóxido-dismutasa, catalasa en dieta alta en colesterol para ratones (Jeon et al. 2001), además inhiben el desarrollo tumoral y la proliferación de las células tumorales inhibiendo la movilidad celular.

12.3.4.6.1 Actividad hipoglucemiante e hipocolesterolémica

La hiperglucemia crónica y la intolerancia a la insulina pueden ser los factores más importantes para el desarrollo de enfermedades crónicas como diabetes mellitus, las personas con hiperglicemia no tratada o con diabetes mellitus tienen mayor riesgo a desarrollar complicaciones macro y micro vasculares, incluyendo retinopatía, neuropatía, nefropatía y aterosclerosis (Hussain, Sulaiman y Aljamaly 2013).

Un nivel elevado de glucosa podría ser en parte responsable de la disminución en la función de las células β -pancreáticas. El efecto de la hiperglucemia incluye la reducción de la respuesta al estímulo de secreción de insulina y un agotamiento de las reservas de insulina, una hiperglicemia postprandial aumenta el estrés oxidativo en las células beta además de una inadecuada producción de insulina durante la hiperglicemia crónica (Rendell y Jovanovic 2006).

Se sabe que la naringina, hesperidina y neohesperidina, entre otros flavonoides, ayudan a prevenir complicaciones diabéticas como hiperglucemia y daño oxidativo, disminuyendo los niveles de glucosa en sangre de ratones con diabetes mellitus inducida (Mahmoud et al. 2012; Jung et al. 2006; Jia et al. 2015; Zhang et al. 2012; Hussain, Sulaiman y Aljamaly 2013). Priscilla et al. (2014) realizaron un estudio para medir el efecto de la naringenina, que es la aglicona de la naringina, en los niveles de glucosa de ratones con hiperglicemia inducida por maltosa, demostrando una disminución de los niveles de glucosa de un 50% comparados con el grupo control al que solo se le administró maltosa (Priscilla et al. 2014).

Además se ha demostrado que la estructura química de los flavonoides influye en el efecto hipoglucemiante. Zhang et al. (2012) demostraron que la presencia o ausencia de grupos hidroxilo en ciertas posiciones de la hesperidina y sus dobles enlaces tendrá un efecto en la inhibición de enzimas como la α -glucosidasa y esto se verá reflejado en su actividad hipoglucemiante (Zhang et al. 2012).

Los extractos ricos en flavonoides también han demostrado tener un efecto hipoglucémico que puede ser preventivo para desordenes metabólicos como la diabetes (Shirosaki, Koyama y Yazawa 2008). Extractos de diversas plantas medicinales entre ellas la *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia jambolana*, *Antidesma madagascariense*, *Cnidioscolus chayamansa*, *Ruta graveolens* y *Citrus aurantium* han probado tener efecto hipoglucemiante en modelos animales bajo distintos métodos (B. Sharma et al. 2008; Figueroa-Valverde et al. 2009; Lin et al. 2011; Mahomoodally et al. 2012; Padilla Camberos et al. 2013)

En el caso de la naranja agria, Sharma et al. (2008) demostraron que los extractos alcohólicos de cascara de *C. aurantium* disminuye los niveles de glucosa en sangre tanto de ratas sanas como de ratas con diabetes inducida por alloxan, mientras que Figueroa et al. (2009), determinaron que el extracto etanólico de hojas de naranjo agrio disminuye los niveles de glucosa en sangre de ratones diabéticos a los que se les administra la muestra por 30 días, tomando mediciones diarias. En la bibliografía consultada respecto a la lima (*C. limetta*) solo hay evidencia de la inhibición de las enzimas encargadas de la hidrólisis de los carbohidratos en el tracto gastrointestinal, teniendo un efecto significativo en la inhibición de las mismas (M. Sharma et al. 2008; Figueroa-Valverde et al. 2009; Padilla-Camberos et al. 2014).

Se han llevado a cabo algunos estudios con ratones sanos a los cuales solo se les administra una dosis elevada de algún disacárido para observar el comportamiento que tienen los extractos naturales sobre la hiperglucemia de modelos animales sanos, encontrando en todos los casos que hay una disminución significativa de los valores en un periodo de tiempo corto de 30 a 60 min, manteniendo un nivel de glucemia controlado a pesar de consumir los disacáridos que podrían hacer que el ratón presentara un pico de glucosa elevado (Hien-Trung et al. 2007; Shirosaki et al. 2008; Mahomoodally et al. 2012), esto sin duda es de vital importancia para personas con resistencia a la insulina que requieren evitar estos picos de glucosa incluso cuando consumen alimentos ricos en glucosa.

El mecanismo por el cual los flavonoides ejercen su acción hipoglucemiante todavía no se ha determinado concretamente pero existen diversas teorías que muestran rutas diferentes. Algunos autores han demostrado que existe una inhibición de las enzimas encargadas de la hidrólisis de los carbohidratos, tales como la α -glucosidasa y la α -amilasa que retardan la absorción de los carbohidratos ingeridos (Figueroa-Valverde et al. 2009; Gao et al. 2004; Padilla-Camberos et al. 2014; Zhang et al. 2012)

Algunos autores que utilizaron modelos animales enfermos de diabetes mellitus tipo 2, encontraron que administrar flavonoides disminuye la hiperglicemia debido a la restauración de las células β -pancreáticas lo cual ayuda a mantener la secreción normal de insulina (B. Sharma et al. 2008; Sharma and Bhat 2009; Mahmoud et al. 2012; Li et al. 2013; Unnikrishnan et al. 2014). También se ha demostrado que se lleva a cabo la estimulación de enzimas como la proteincinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) y los receptores activados por la proliferación de peroxisomas (PPAR) que ayudan a mantener un equilibrio entre la glucosa y los lípidos, que además inhiben las de síntesis de glucosa y colesterol (van Dam, Naidoo y Landberg 2013; Jia et al. 2015). Además se ha observado una estimulación en los transportadores de glucosa como la proteína transportadora de glucosa 4 (GLUT 4) que ayuda a normalizar los niveles, estimulando la absorción de glucosa por el músculo esquelético y las células adipocitas, además de la disminución de la gluconeogénesis debido a la disminución en la actividad de enzimas como la glucosa-6 fosfatasa o la fructosa-6-fosfatasa (Akiyama et al. 2009; Jung et al. 2006).

En numerosos estudios en los que se trata la hiperglicemia utilizan la acarbosa como control positivo (Gholamhoseinian, Fallah y Sharifi far 2009; Shirosaki, Koyama y Yazawa 2008; Fang y Bhandari 2010; Priscilla et al. 2014). La acarbosa es un medicamento que inhibe las enzimas alfa glucosidasas presentes en el borde epitelial del intestino delgado disminuyendo la absorción de glucosa debido a la disminución en el rompimiento de los enlaces glucosídico de carbohidratos complejos, disminuyendo también la liberación de hormona y el vaciado gástrico, debido a sus características es ampliamente utilizado en el

tratamiento de hiperglucemia (Derosa y Maffioli 2012; Gao et al. 2004; Shiba 2012; Unnikrishnan et al. 2014).

Por otro lado, también se ha demostrado que los flavonoides disminuyen los niveles de colesterol (Zhang et al. 2012). Este efecto se ha probado con diversos extractos de plantas utilizados por la población como curativas, como el estudio de Harnafi et al. (2008), que demostró que los extractos de albahaca tienen un efecto hipocolesterolémico en ratones con hiperlipidemia inducida por tiloxapol (triton WR-1339), el tiloxapol es un detergente no iónico que inhibe la enzima lipoproteína-lipasa causando una hiperlipidemia aguda (Ramchoun et al. 2012). El efecto hipocolesterolémico fue mayor para aquellos extractos que demostraron contener flavonoides en comparación con aquellos que no los contenían. En otro estudio, Sharma et al. (2008), encontraron un comportamiento similar para ratones con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) y alimentados con extractos ricos en flavonoides de *Eugenia jambolana*. En los dos casos esta actividad podría ser debida a la mejora en el catabolismo del colesterol LDL a través de los receptores hepáticos que se eliminan por medio de ácidos biliares; de igual manera, se debe al aumento de la actividad lipolítica de la enzima plasmática lipoprotein-lipasa por acción de los flavonoides (Harnafi et al. 2008; Sharma et al. 2008).

Majithiya et al. (2004) estudiaron el efecto hipocolesterolémico de la curcumina, un condimento utilizado en la cocina hindú que contiene flavonoides, en ratones con hiperlipidemia inducida por tiloxapol, encontrando una disminución significativa en los niveles de colesterol y triglicéridos además de encontrar un aumento en los niveles de colesterol HDL. Se cree que el mecanismo de acción fue mediante la movilización del colesterol del tejido extra hepático donde se degradó debido a la activación de la enzima 7- α hidroxilasa estimulando la conversión de colesterol en ácidos biliares (Majithiya, Parmar y Balaraman 2004). De la misma manera Ramchoun et al. (2012), encontraron que extractos de tomillo marroquí con flavonoides disminuyen los niveles de colesterol debido a la disminución en la fracción LDL por el mismo mecanismo supuesto por Majithiya y col, además encontró que aquellos extractos que contenían Hesperidina aumentaban significativamente los niveles de LDL.

Por su parte, Hien-Trung et al. (2007) encontraron que el ginseng rojo, que contiene compuestos antioxidantes, disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos en ratones a los que se les administró tiloxapol y observaron también que esta disminución es inducida gracias a sus saponinas y su fracción polisacárida, aunque más débilmente. Se cree que este efecto es debido a la inhibición de enzimas implicadas en la biosíntesis de colesterol y triglicéridos como 3-hidroxil-5metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) o la colesterolacil-transferasa (ACAT). En el 2013, Gayathri y col observaron el mismo comportamiento con extractos polifenólicos de flor de adelfa utilizada tradicionalmente en la medicina china. Esto concuerda con lo observado por Raasmaja en 2013 al administrar extractos de pomelo a ratones obesos que fueron alimentados con una dieta alta en grasas y colesterol (Hien-Trung et al. 2007; Gayathri, Ananthi y Vasanthi 2013; Raasmaja et al. 2013).

Otros autores han demostrado que la hesperidina y la naringina disminuyen los niveles de colesterol utilizando ratones diabéticos o alimentados con dietas altas en grasas y que ejerce su efecto hipocolesterolémico mediante la reducción en la actividad de las mismas enzimas, además al inhibir la ACAT se reduce la producción hepática de apolipoproteína B (apo B) contenido en las lipoproteínas (Miyake et al. 1998; Jeon et al. 2001; Jeong et al. 2003; Kim et al. 2003; Wilcox, Borradaile y Huff 2006).

Yao Nan y col. en 2014 encontraron que no hay una disminución significativa de los niveles de colesterol de ratones con hiperlipidemia inducida por tiloxapol que fueron administrados con extractos polifenólicos de manzana aunque se observa una tendencia a disminuirlos, mientras que los niveles de triglicéridos disminuyen significativamente, se cree que se debe a la regulación de los receptores PPAR (proliferación de peroxisomas). Por su parte Akiyama et al. (2009), encontraron una disminución significativa en los niveles de colesterol y triglicéridos de ratones con diabetes inducido, al administrarles hesperidina y su aglicona en interacción con ciclodextrina, ellos suponen que es debido a que los flavonoides ayudan a controlar la expresión de genes codificantes para receptores PPAR, que regulan la expresión de proteínas responsables de la acumulación de triglicéridos. Jung et al. (2006) encontraron que la naringina y la hesperidina también

regulan la expresión de estos receptores (Jung et al. 2006; Akiyama et al. 2009; Yao et al. 2014).

El único estudio encontrado en la bibliografía consultada que evalúa el efecto de los cítricos elegidos para esta tesis, sobre los niveles de lípidos, es el realizado por Sharma et al. (2008) en el que estudian el efecto de la administración de extractos alcohólicos de *C. aurantium* a ratas, encontrando que hay una disminución de los niveles de colesterol total, triglicéridos, LDL y HDL. Se cree que el efecto es debido al aumento en la secreción de insulina de las células β -pancreáticas que estimulan la biosíntesis y la incorporación de ácidos grasos en el hígado y en el tejido graso (Sharma et al. 2008).

Como ya se ha mencionado estos estudios se han realizado en modelo animal y en pacientes sanos o con alguna complicación menor, ambas vertientes se caracterizan por suministrar extractos de frutos o los compuestos aislados, estos estudios están enfocados a nutraceuticos, que son aquellos compuestos aislados que se venden en forma de píldora, extracto o comprimido, su principal característica es que proporcionan compuestos bioactivos en cantidades que exceden las que se pueden encontrar en los alimentos, sin embargo, no se analiza el comportamiento de estos bioactivos dentro de una matriz compleja como lo es un alimento y solo por estar presentes dentro del alimento se considera que tendrán el mismo efecto que un nutraceuticos, y se llama a este “alimento funcional” pero se dejan de lado los demás factores que intervienen en la disponibilidad y en el funcionamiento de estos compuestos.

12.5 Ciclodextrina

Los aditivos alimenticios, son sustancias que se agregan a un alimento industrializado para conferirles estabilidad fisicoquímica, microbiológica y características sensoriales deseables. Estos compuestos también tendrán un efecto significativo en las interacciones fisicoquímicas, un ejemplo de estos son las ciclodextrinas (CDS), que son oligosacáridos derivados de la degradación del almidón por ciertas bacterias como *Bacillus macerans*, que están constituidas por moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -(1,4)

organizadas en forma de ciclo (Del Toro-Sánchez et al. 2010), son inocuas, no son absorbidas en el tracto gastrointestinal alto y son completamente metabolizadas por la flora microbiana del colon, lo cual le confiere posibilidades de utilización como aditivo o protector de moléculas (Abramovič et al. 2008).

Las CDS usadas más ampliamente son α , β y γ (figura 12) que consisten en seis, siete y ocho residuos de D-glucopiranososa, respectivamente, en forma de anillo cuyo exterior es hidrofílico y la cavidad interior es hidrofóbica formando un anillo de diferente tamaño, su cavidad central es hidrofóbica, mientras que la parte exterior es hidrofílica (Nguyen et al. 2013; Astray et al. 2009).

El anillo que constituye las CDS, en realidad es un cilindro cónico y la cavidad está revestida por los átomos de hidrógeno y los enlaces glucosídicos. Los pares de electrones no enlazables del oxígeno están rígidos hacia el interior produciendo una alta densidad de electrones esta parte tiene la capacidad de encapsular moléculas hidrofóbicas (Hădărugă et al. 2012; Del Valle 2004)

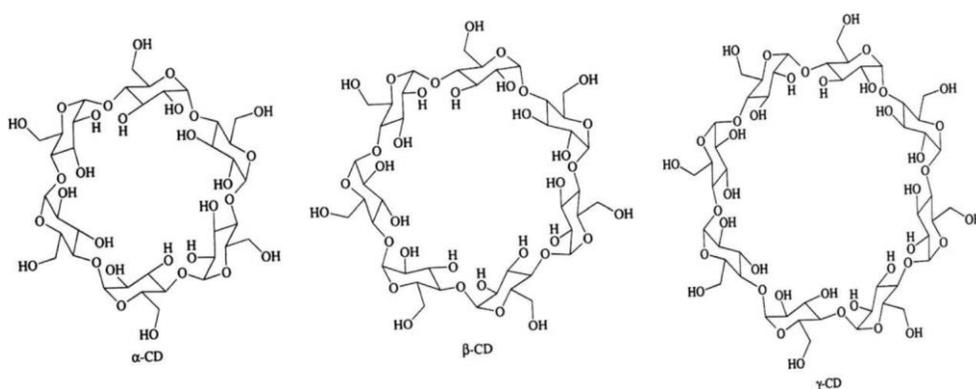


Figura 12. Estructura química de α , β , γ ciclodextrinas (Astray et al. 2009)

La solubilidad de la β -ciclodextrina es por lo menos 9 veces menos soluble (1.85 g/100 mL a temperatura ambiente) en comparación con otras CDS (14.5 g/100 mL y 23.2 g/100 mL para α y γ CDS) (Astray et al. 2009; Abramovič et al. 2008).

12.5.1 Función

La unión de la ciclodextrina con un compuesto produce cambios físicos y químicos para el huésped, proporcionando al mismo: estabilidad contra oxidación, luz y calor; una modificación de su reactividad química, una fijación de moléculas muy volátiles, un aumento de la solubilidad, y una protección contra la degradación por microorganismos, entre otras cualidades (Rezende et al. 2009; Del Valle 2004).

En la formulación de alimentos se utiliza como protector de sabor debido a que algunas moléculas características del sabor son generalmente oleosas o líquidas y forman complejo con la ciclodextrina fácilmente; también se utiliza para la eliminación de compuestos, por ejemplo, el colesterol del huevo y de la leche, además se ha demostrado que ayuda a mejorar la textura de productos cárnicos y reduce acidez de algunos compuestos (Hedges 1998).

La formación del complejo también se ha aplicado a flavonoides con baja solubilidad (Dias, Nikolaou y De Giovani 2008), para evitar su posible degradación en el intestino delgado y que la biodisponibilidad del flavonoide se mantenga en el intestino grueso que es donde ejerce su mayor efecto biológico (Rezende et al. 2009). Para poder entender como la ciclodextrina favorece al flavonoide se necesita comprender el mecanismo de inclusión.

12.5.2 Formación de complejo

La habilidad de la CD de formar un complejo de inclusión está en función de factores estéricos y termodinámicos (figura 13). Las fuerzas impulsoras de la formación del complejo se atribuyen a la eliminación de moléculas de agua de la cavidad hidrofóbica, y a la formación de interacciones de van der Waals, hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno (Xu et al. 2007).

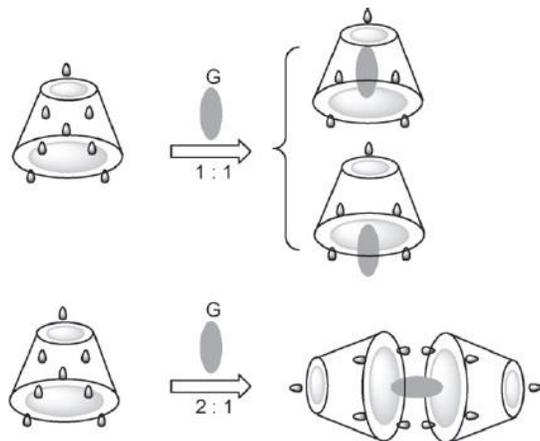


Figura 13. Los tres tipos de complejo de inclusión con relación estequiométrica (Song et al. 2009)

Existen tres modos comunes de complejos de inclusión como se muestra en la figura 13, que corresponden a la relación estequiométrica 1:1, 1:1 y 2:1 ciclodextrina:huésped. La presentación de una estructura de sándwich, se debe a puentes de hidrógeno intermoleculares entre dos CD obteniendo un encapsulamiento del huésped (figura 14). El complejo de inclusión y las interacciones de encapsulación conviven a la par (Song et al. 2009).

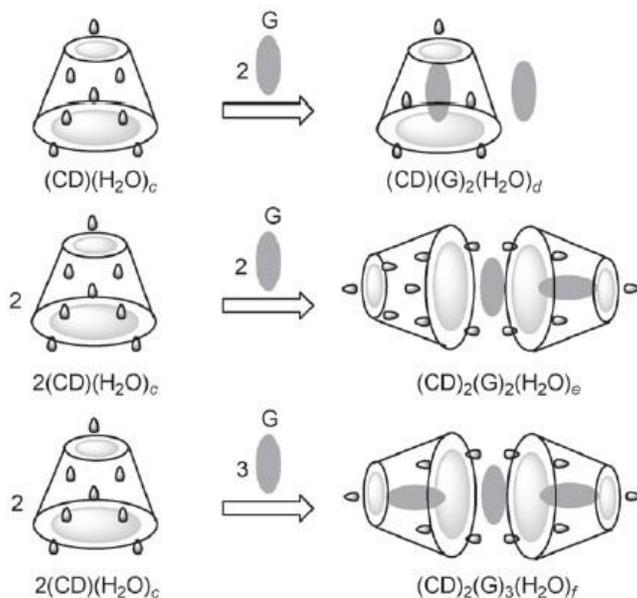


Figura 14. Interacciones de encapsulación que acompañan al complejo de inclusión

12.6 Sucralosa

La población se ve en la necesidad de dejar de consumir la gran cantidad de calorías que aporta la sacarosa y sustituirla con un nivel de dulzor similar pero con una menor cantidad de calorías, para lo cual se necesitan los edulcorantes no calóricos. Es por esto que las empresas encargadas de la formulación de nuevos productos alimenticios requieren adicionar a los alimentos, además de compuestos como la ciclodextrina que ayudan a dar estabilidad, compuestos como la sucralosa, que ayudan a disminuir la carga calórica (Ng, Slining y Popkin 2012).

La sucralosa se elabora por la sustitución selectiva de tres grupos hidroxilo de la sacarosa (azúcar común) por tres átomos de cloro (figura 15). Es aproximadamente 600 veces más dulce que la sacarosa, tienen gran estabilidad a la degradación ácida, a las altas temperaturas (no más de 200°C) así como también a la hidrólisis enzimática (Molinary y Quinlan 2012). Su estabilidad química la hace muy versátil y se puede utilizar en distintos procesos de producción de alimentos, además sus características fisicoquímicas le confieren resistencia a la digestión y por tanto no se considera como fuente de energía.

En el cuerpo humano, no es acumulable y no es tóxica si se consume 15mg/kg de peso, lo cual tomando en cuenta que es 600 veces más dulce que la sacarosa es poco probable que un humano lo consuma en cantidades tóxicas (Tollefsen, Nizzetto y Huggett 2012).

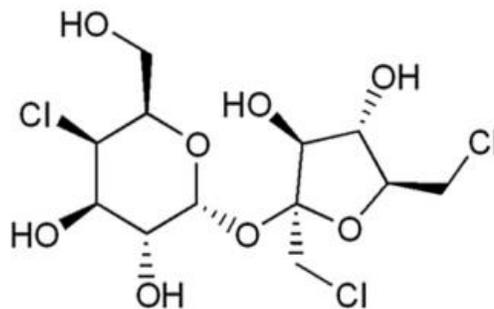


Figura 15. Estructura química de la sucralosa (Molinary y Quinlan 2012)

Las características fisicoquímicas de la sucralosa son muy importantes, es un polvo cristalino blanco, prácticamente inodoro que es fácilmente soluble en agua y tiene una alta

temperatura de fusión (125°C). El compuesto tiene baja presión de vapor (20°C: < 1mmHg), y el coeficiente de partición aire-agua (-16.8) que mejoran la estabilidad y presencia del compuesto en agua (solubilidad en agua: 282g/l). La sucralosa se hidroliza lentamente a los dos monosacáridos 1,6-dicholorofructose (1,6-DCF) y 4-clorogalactosa (4-CG) en condiciones ácidas graves y la formación es por lo tanto poco probable que ocurra en los escenarios de exposición normales (Tollefsen, Nizzetto y Huggett 2012).

Debido a las características estructurales y fisicoquímicas de los compuestos mencionados hasta hoy la interacción entre estos ingredientes dentro de una matriz compleja es muy probable.

12.7 Interacciones fisicoquímicas

Los alimentos son sistemas termodinámicamente inestables, compuestos por ingredientes incompatibles en un medio de suspensión, con interacciones inter-partículas diversas y cuya naturaleza cambia a través del tiempo. Dependiendo del alimento, los ingredientes pueden interactuar física y/o químicamente con ellos mismo, con otros ingredientes y con el medio de suspensión. Estas interacciones dictan las propiedades de textura, estructura y sensoriales del alimento (Chakrabarti 2006).

Al obtener un jugo de cítricos, el primer fenómeno que ocurre es la disrupción de la pared celular, liberando de las vacuolas los ingredientes acuosos, dejando un jugo opaco en el que se pueden suponer interacciones de los componentes de la pared celular con el jugo contenido dentro de las vacuolas. Estas interacciones le dan al producto un sabor, textura, olor y apariencia distinta al que se podía percibir cuando el fruto estaba entero, y están influenciadas por factores físicos y químicos (Le Bourvellec y Renard 2012).

Estas interacciones pueden incluir fenómenos físicos, tales como un cambio en el estado de la materia pero sin cambio molecular interno, que pueden llevarse a cabo durante o después de la manufactura del producto, siendo éstos la adsorción, absorción, evaporación, secado y reducción del tamaño de partícula, además de fenómenos de transporte (Kilara 2006).

Además pueden llevarse a cabo interacciones químicas mediante la formación de enlaces químicos (covalentes) entre distintas clases de constituyentes moleculares de los alimentos

como las proteínas, lípidos, carbohidratos, minerales y vitaminas o entre el alimento y el material de empaque en el que está contenido.

De igual manera existen interacciones fisicoquímicas, estas tienen un origen intermolecular y afectan las características físicas del producto, esto puede ser la formación o desestabilización de espumas, emulsiones, geles, etc (Kilara 2006). Hay distintos tipos de interacciones intermoleculares como la ion-ion que son aquellas que se dan entre iones de igual o distinta carga, se les conoce como puentes salinos y son frecuentes entre enzimas y su sustrato, otro ejemplo es las interacciones ion-dipolo que son las que se llevan a cabo entre un ion y una molécula polar como la dilución de NaCl en agua.

Las interacciones más abundantes y con un impacto significativo en las características fisicoquímicas, sensoriales y nutricionales del alimento son:

- Interacciones hidrofóbicas
- Fuerzas de van de Waals
 - Puentes de hidrogeno

Las interacciones hidrofóbicas, se dan cuando las regiones hidrofóbicas de las moléculas tienden a interactuar con las hidrofílicas por medio de la atracción entre cargas opuestas, por ejemplo: en la formación de un coloide, la fase dispersa, ya sea hidrofóbica o hidrofílica, se rodea en su superficie interna de una capa de carga opuesta a la de la fase dispersante (figura 16). La fase dispersa tiende a incrementar el orden de las moléculas de la fase dispersante disminuyendo así la entropía de la fase dispersante y por consiguiente generando estabilidad a la solución (Fennema 2008).

Las fuerzas de Van der Waals engloban colectivamente las fuerzas de atracción entre moléculas (Contreras 1994), y son las interacciones dipolo inducido-dipolo inducido, dipolo-dipolo inducido y dipolo-dipolo. Cuando se unen dos átomos no polares se forma una nube de electrones alrededor de estos compuestos aparentemente homogénea, sin embargo, estos electrones permanecen en movimiento y en un instante dado pueden perder la simetría generando un dipolo temporal inducido, este átomo inducirá un dipolo temporal en la molécula vecina generando una interacción **dipolo inducido-dipolo inducido**. Las moléculas polares tienen por naturaleza una distribución asimétrica de electrones debido a

que están formadas por átomos de distinta electronegatividad por tanto se dice que tienen un momento dipolar permanente, la interacción electrostática entre estos momentos dipolares se conoce como **dipolo-dipolo**, cuando el dipolo permanente de una molécula interactúa con su más inmediata vecina induciendo en esta un momento dipolar adicional en las moléculas del entorno (además del suyo propio), origina la interacción **dipolo-dipolo inducido** (Casabó i Gispert, 2007).

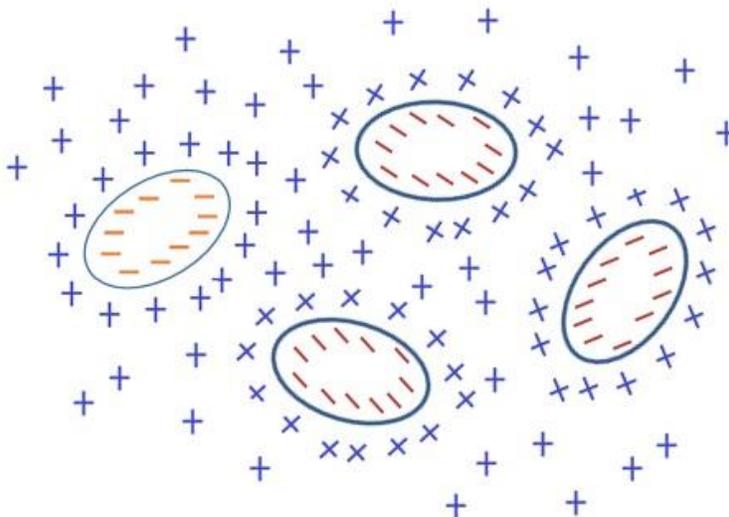


Figura 16. Interacciones hidrofóbicas

Una de las interacciones de fuerzas de van de Waals más importante es la formación de puentes de hidrógeno, esta es una interacción de tipo dipolo-dipolo y se produce cuando el átomo de hidrógeno está unido covalentemente a otro átomo que sea muy electronegativo y con más electrones para compartir, que los necesarios para interactuar con el hidrógeno (doblete electrónico), el enlace que se forma es muy polar y el hidrógeno es un centro de cargas positivas que será atraído hacia los pares de electrones sin compartir de los átomos electronegativos de otras moléculas. Un ejemplo muy común es el agua, el oxígeno tiene 4 pares de electrones de valencia distribuidos en los cuatro orbitales híbridos sp^3 , dos de ellos enlazan con los átomos de hidrógeno y los otros dos son no enlazantes, los puentes de hidrógeno se forman entre uno de los pares de electrones del oxígeno y el átomo de hidrógeno de una molécula de agua vecina pudiendo así formarse dos puentes de hidrógeno por molécula de agua, por tanto, el oxígeno estará rodeado por cuatro moléculas de

hidrógeno distribuidos tetraédricamente a su alrededor (figura 17). Estas interacciones son fuertemente direccionales y su fuerza radica en la abundancia de las mismas (Casabó i Gispert 2007). Todas estas interacciones impactaran en la matriz alimentaria dando distintas características al producto.

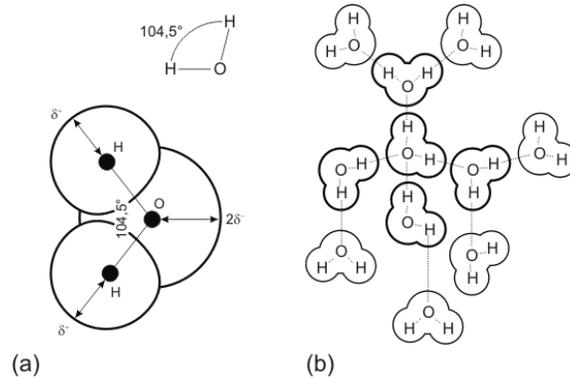


Figura 17. Formación de puentes de hidrogeno en moléculas de agua

12.7.1 Importancia de las interacciones fisicoquímicas en las propiedades físicas de un producto

Algunas interacciones son deseables y ayudan a aumentar la calidad, mientras que otras son indeseables y pueden afectar la calidad del alimento, saber si son o no deseables para el alimento dependerá del sustrato y del uso previsto del producto final (Kilara, 2006).

Factores físicos como el pH, la temperatura y la humedad afectan la intensidad de las interacciones. Un claro ejemplo del efecto de estos factores es la interacción de las proteínas con los distintos componentes de un alimento, su solubilidad afecta las interacciones con otras moléculas, esta solubilidad depende casi por completo del pH, y para casi todas las proteínas el punto de menor solubilidad es el punto isoeléctrico (Kilara, 2006).

Las propiedades sensoriales deseables de alimentos como sopas, salsas y bebidas son derivadas de la viscosidad, esta es altamente dependiente del tipo de soluto y la concentración. Las proteínas y los polisacáridos aumentan la viscosidad, a bajas concentraciones, dependiendo del tamaño, forma, flexibilidad e hidratación de la proteína

en cuestión. Factores ambientales como el pH, fuerza iónica y temperatura también afectan la viscosidad (Kilara 2006).

La reacción más estudiada es la de Maillard, la reactividad entre el grupo amino de aspargina y el grupo reductor de los azúcares, están implicados en la formación de acrilamida en los alimentos con almidón sujetos a altas temperaturas. La reacción de Maillard ocurre durante el proceso de almacenamientos de los alimentos. Este efecto puede ser deseable en la producción de sabores y color, o puede ser indeseable en ciertos casos cuando las propiedades nutrimentales son afectadas.

En los productos de panificación como pastas y cereales, las características de sabor y textura se deben a la interacción proteína-almidón. Las interacciones en los hidrocoloides o polisacáridos de alto peso molecular se aprovechan para estabilizar diversas formulaciones de alimentos. Los hidrocoloides y los polisacáridos interactúan con las proteínas formando soluciones solubles o insolubles. La formación de complejo interpolimérico ocurre a valores de pH por debajo del punto isoeléctrico de la proteína y a baja fuerza iónica. Polisacáridos que contienen grupos carboxilo en un rango de pH de ácido a neutro tienen una carga negativa, estos factores son los que propician la interacción proteína polisacárido por medio de atracciones electrostáticas (Kilara, 2006).

Los fenoles están presentes en gran variedad de alimentos como café, cerveza, frutas y tienen impacto en la astringencia de distintos tipos de productos como el vino tinto, que cuando estos interactúan con las pectinas disminuye su astringencia (Renard et al. 2001).

La interacción de los edulcorantes con otros ingredientes también es importante para la formulación de alimentos. Los edulcorantes interactúan con los alimentos de numerosas formas, estos pueden ser utilizados para productos con mejor sabor y menor aporte calórico, además sirven para enmascarar notas indeseables de los alimentos, pueden interactuar con las proteínas para formar distintos sabores, aromas y gusto en los alimentos, también influyen en el punto de gelatinización del almidón, que impacta en la producción y procesamiento de productos de panificación y en algunos productos de confitería (Helstad, 2006)

Las pectinas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria como espesantes, para la formación de geles termorreversibles, especialmente en preparados de frutas, mermeladas y yogurts. Las interacciones entre pectinas y compuestos de sabor son causados por el incremento en la viscosidad que limita el fenómeno de difusión del compuesto volátil llegando incluso a suprimir la intensidad del sabor (Rega et al.,2002). Una solución acuosa con solo 1% de pectina reduce significativamente la liberación de sustancias relativamente polares, altamente volátiles y de bajo peso molecular como los compuestos aromáticos de las frutas. La pectina es una molécula iónica por sus grupos carboxilo y debido a esto su función como espesante depende fuertemente del grado de esterificación, la disociación de sus grupos carboxilo libres, pH, así como la presencia de iones de metal bivalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} . El incremento en la viscosidad se debe a la formación de puentes entre moléculas de pectina promovidos por la adición de iones Ca^{2+} , en ausencia de estos iones la interacción se lleva a cabo por la formación de puentes de hidrógeno (Preininger, 2006).

Debido a los puntos antes mencionados, las interacciones fisicoquímicas entre los ingredientes de un producto alimenticio tendrán un alto impacto en las características físicas del producto final, dando a éste, características que influirán en sus propiedades nutricionales, su estabilidad fisicoquímica y en la aceptación o rechazo por el consumidor.

12.7.2 Interacciones fisicoquímicas flavonoides/polisacáridos

Como ya se ha mencionado, las características de la matriz alimentaria influyen en la absorción de los flavonoides, como consecuencia de las interacciones covalentes y no covalentes entre polifenoles y macromoléculas (proteínas y polisacáridos), las cuales dependen de sus estructuras químicas, composición y fuerza iónica del medio, temperatura y pH. En los alimentos las interacciones covalentes aparecen después de una oxidación (enzimática o no enzimática), y los polifenoles son sustancias muy sensibles a la oxidación. Las no covalentes son en gran parte el resultado de una combinación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Le Bourvellec y Renard 2012).

12.7.2.1 Interacción con la pared celular

Se sabe que los flavonoides se encuentran en un ambiente rico en polisacáridos dentro de los frutos y que es durante el proceso de elaboración de alimentos donde la destrucción de los tejidos vegetales multiplica los contactos entre polisacáridos y flavonoides (Watrelet et al. 2013), por lo tanto, los componentes celulares de la fruta están muy relacionados con las interacciones fisicoquímicas de los flavonoides; el componente más conocido de la pared celular es la celulosa, los no celulósicos son la pectina y la hemicelulosa (Fry 2011). Como ya se ha descrito con anterioridad, los flavonoides se encuentran presentes en la naturaleza como compuestos glucosilados; existen varios estudios que nos hablan de la interacción de estos compuestos con los polisacáridos y la pared celular, se abordaran algunos a continuación:

Mazzaracchio et al. (2004) llevó a cabo un estudio para observar el comportamiento de algunas de las principales antocianinas al interactuar con algunos compuestos orgánicos como ácidos lácticos, galacturónicos, tánicos, fenólicos además de pirogalol, furfural, pectina, celulosa y lignina hidrolítica, todos estos presentes en los productos alimenticios. También se estudió el efecto del pH, debido a que en los alimentos este cambiará y por ende las interacciones serán distintas. Las interacciones se midieron por medio de espectrofotometría UV-Visible los cambios de absorbancia en un rango de longitud de onda considerando un blanco con la antocianina sola y después combinándola con las compuestos orgánicos a estudiar a los rangos de pH establecidos (3, 4.3), los resultados encontrados mostraron que los monoglucósidos son excelentes reductores de antocianinas a pH 3 cuando están en forma de catión, la pectina de la manzana con alto número de grupos metoxilos forma interacciones hidrofóbicas débiles con los grupos hidroxilo del anillo “B” antocianina (Mazzaracchio et al. 2004)

Existe una serie de estudios sobre interacciones, realizados desde 2001 hasta 2005 en los que se evaluó la conservación de polifenoles de la manzana después de la obtención de sidra, ya que en este producto, es deseable que estén libres en cierta medida pues son los responsables de la ligera astringencia, en la sidra elaborada en Francia, la astringencia es un

atributo de calidad. Los resultados demuestran que el perfil de polifenoles de la sidra es diferente del de la fruta de la que se partió, los investigadores atribuyen ese cambio, a las interacciones fisicoquímicas (fuerzas de Van-der Waals, puentes de hidrógeno) (Le Bourvellec y Renard 2005; Le Bourvellec et al., 2004; Renard et al. 2001).

LeBourvellec et al. (2005), realizaron una investigación en soluciones modelo de polisacáridos, con el fin de evaluar el efecto del tipo de polisacárido en la interacción procianidina/pared celular. Encontraron mayor afinidad de las procianidinas por las pectinas y lo atribuyeron a que la pectina tiene la capacidad de desarrollar una red tipo gel que tienen que formar zonas hidrofóbicas capaces de encapsular a la procianidina (Le Bourvellec y Renard, 2005).

Para la determinación de interacciones, también se ha usado la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía de capa fina (TLC), que son métodos indirectos y se basan en la separación de una mezcla de compuestos por medio de la diferencia de afinidad de dichos compuestos por dos fases de diferente polaridad. Gracias a que los polifenoles tienen una afinidad especial por la celulosa, estos pueden separarse de una mezcla o desligarse de un complejo por TLC y ha sido utilizado para determinar el orden de unión de los polifenoles complejados con celulosa (Le Bourvellec y Renard, 2012).

12.7.2.2 Interacción con pectina

Se ha observado con anterioridad que los flavonoides se unen a la pectina (Watrelet et al. 2013; Maier et al. 2009; Le Bourvellec, Guyot y Renard 2004), y que dicha interacción influye en algunas características sensoriales (astringencia y turbidez) de algunas bebidas (Watrelet et al. 2013), así como en la biodisponibilidad mediante la posibilidad de que el complejo con el polisacárido llegue al intestino para su posterior degradación por las bacterias de la flora intestinal (Padayachee et al. 2012), sin embargo, la información sobre el mecanismo de formación de dichas interacciones no está esclarecido.

Los datos obtenidos de la interacción entre flavonoides y pectinas en su mayoría fueron realizados con la suspensión de las paredes celulares en tampón acuoso y demostraron la unión no covalentes de flavonoides con los polisacáridos de la pared. Estos estudios tienen importancia ya que se obtiene un gran contenido de flavonoides en los jugos de frutas sin que este contenido sea mayor al encontrado en el fruto sin procesar (Leopoldini et al., 2007; Kroon et al. 2004). En estudios como los llevados a cabo por **Renard et al. (2001)** se observó que la unión es rápida y espontánea y que implica interacciones débiles, en su mayoría interacciones hidrofóbicas y la formación de puentes de hidrógeno. **WatreLOT et al. (2013)** confirman estas afirmaciones, sugiriendo que las interacciones son dirigidas por la entropía y además de las interacciones ya mencionadas habrá fuerzas de expansión, desolvatación y cambios conformacionales. Watrelot también propone que hay factores como el tipo, tamaño, forma, movilidad conformacional y flexibilidad del flavonoide (prociánidina) y las características estructurales y conformacionales de la pectina influyen en la intensidad de la interacción, esto fue detectado mediante calorimetría de titulación isotérmica y la densidad óptica.

En estudios más recientes realizados en Europa, se intenta utilizar el conocimiento que existe sobre la formación del complejo entre polifenoles y polisacáridos para el desarrollo de nuevos productos donde se utilicen las antocianinas como colorantes naturales en alimentos para niños, un claro ejemplo son los trabajos de **Buchweitz et al. (2013)** y **Maier et al. (2009)**, en donde buscan conocer las interacciones de las antocianinas con los ingredientes alimentarios como co-pigmentos, azúcares, ácido ascórbico y enzimas en la estabilidad del pigmento. Ellos sugieren que una asociación intermolecular entre los grupos carboxílicos y antocianinas puede mejorar la estabilidad del flavonoide (Maier et al. 2009; Buchweitz et al. 2013).

Por otro lado, en un ensayo hecho por **Sivam et al. 2012** se determinaron interacciones entre polifenoles y polisacáridos en un medio sólido, para ello se formuló un producto de panificación en el cual se demuestran los efectos de añadir extracto de polifenoles y pectina, así como la cantidad de agua utilizada para la formulación en el pan de la estructura secundaria de la proteína. La adición de polifenoles y pectina al pan resultó en una mayor firmeza de la miga y la disminución de la concentración de S-H libre, esto

gracias a la presencia de polifenoles polares y sus productos de oxidación/ degradación mejorando la unión hidrofílica (incluyendo H unión con agua) durante la fabricación de pan, lo que limita el agua disponible para retrogradación del almidón.

Sivam et al. (2012) observaron que la microestructura del pan está estrechamente asociada con el tipo de polifenol añadido, la pectina y la cantidad de agua utilizada para la formulación de pan (Sivam et al. 2012)

Todos estos mecanismos de interacción se deben a que los flavonoides poseen diferentes estructuras químicas cada una con distinta polaridad además de tener múltiples grupos hidroxilo que pueden actuar como sitios para la conjugación a azúcares, ácidos o grupos alquilo (Sivam et al. 2012; Panouillé et al. 2006); además, las interacciones intermoleculares tienen como uno de sus componentes fundamentales un comportamiento electrostático. Las fuerzas electrostáticas tienen un rango de acción relativamente amplio, el mismo que involucra las distancias de contacto (radio de Van der Waals) de las moléculas, siendo importantes para determinar las posibilidades de acercamiento o repulsión de las mismas. Uno de los índices más conocidos para determinar este componente es el llamado potencial electrostático molecular (por sus siglas en inglés, MEP), que es el resultado de la densidad electrónica alrededor de la molécula. Esta propiedad determina la polaridad molecular alrededor de una cáscara ubicada a una distancia dada de los núcleos atómicos. Esta propiedad fue medida para el caso de algunos polifenoles por **Salazar y Palacios (2011)** mediante un estudio de MEP's y otro de dinámica molecular, para estudiar la influencia del grado de hidroxilación y la estereoquímica molecular en la capacidad de formación de puentes de hidrógeno de los polifenoles, usaron como base, la quercetina y la fisetina. La genisteína y la floretina permitieron establecer contrastes adicionales respecto a la estereoquímica molecular. Es decir, conocer la orientación de los planos moleculares y sus ramificaciones. Las moléculas de los ácidos caféico y ferúlico permitirán entender el rol del grupo metoxi. Observaron que los estudios mecano-cuánticos al inicio son cruciales para entender la estructura y propiedades moleculares. La densidad electrónica alrededor del anillo B en las moléculas de quercetina y fisetina explicaría la mayor reactividad antioxidante de estas moléculas y en dichas regiones. La presencia del enlace C2-C3 junto con la función 4-oxo y el grupo 3-OH, en el anillo C de estas moléculas, confieren

características importantes sobre la deslocalización electrónica, la planaridad molecular y un potencial electrostático importante en las propiedades antioxidantes de estas moléculas (Salazar y Palacios 2011).

12.7.2.3 Interacción con Ciclodextrina

Hay muy poca información acerca de las interacciones entre ciclodextrina y flavonoide, se sabe que durante la formación del complejo las propiedades fisicoquímicas tanto de la molécula huésped como de la ciclodextrina cambian. Una manera de evidenciar estas uniones es por espectrofotometría UV-VIS; **Tang et al. (2002)** demostraron que hay cambios en la absorbancia al combinarse con la β -CD que indica un blindaje parcial de los electrones excitables y cromóforos en la cavidad de la ciclodextrina además, los resultados que obtuvieron con espectroscopia infrarrojo (IR), proponen que existe un complejo curcumina/ β -ciclodextrina y las interacciones entre ellos son de tipo no covalentes como fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, lo cual disminuye la energía de la parte de la curcumina incluida, lo que se verá reflejado en la disminución de su frecuencia de absorción (Tang et al. 2002).

Estas uniones también se pueden explicar termodinámicamente, ya sea por calorimetría diferencial de barrido o por solubilidad de fases; **Nguyen et al. (2013)** afirman que hay un cambio negativo en la entalpía que indica que el proceso de interacción es exotérmico mientras que la magnitud del cambio sugiere que se necesita poca energía, respecto a estos cambios, se refleja que se incluye el desplazamiento de agua de la cavidad de la β -CD por una molécula más hidrofóbicas (rutina), por lo que aumentan las interacciones de baja energía como los puentes de hidrógeno, fuerzas de van-der Waals entre otras. Estas afirmaciones son sustentadas por el estudio de solubilidad de fases de **Liu et al. (2013)** que aplicaron la ecuación de Van Hoff y demostraron que la reacción de formación del complejo es espontánea y que hay una menor estabilidad del complejo cuando aumenta la temperatura (Liu et al. 2013; Nguyen et al. 2013).

Algunos otros métodos utilizados para medir la formación de complejo flavonoide/ciclodextrina son los métodos espectroscópicos como: Fluorescencia, Espectrometría de Masas, Resonancia Magnética Nuclear (RMN) además de la inhibición enzimática (Le Bourvellec y Renard 2012; Alvarez-Parrilla et al.,2005)

En el estudio realizado por **Li et al. (2012)** se utilizan los métodos de fluorescencia y RMN, donde, resulta que el espectro de fluorescencia sugiere que la β -CD ofrece al flavonoide de una cavidad con un ambiente apolar por lo que aumenta la fluorescencia del mismo mientras que el RMN muestra que hay un desplazamiento químico más largo de los H3, H2', H6' al estar en complejo con la β -CD lo que indica que se encuentran dentro de la cavidad mientras que los H3', H4', H5' se encuentran fuera de la cavidad (figura 18) (Li, Chao y Zhang 2012).

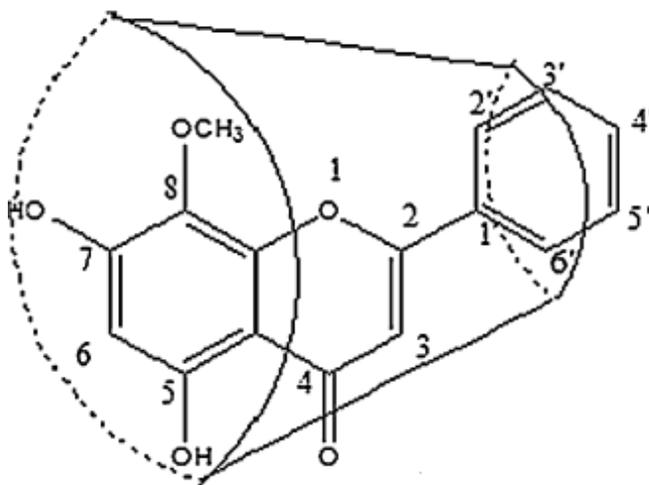


Figura 18. Complejo de inclusión β -CD y flavonoide

Otro aspecto que influye en la formación de complejo es la estructura del flavonoide, debido la manera como se introducirá en la ciclodextrina dependiendo de la estequiometria. Tang et al. (2002) proponen que la estructura aromática de cada curcumina es la que se introduce en la β -CD, lo cual se confirmó por espectroscopia IR; también, pareciera que el anillo B es el que más interacciona esto es confirmado por NMR en los estudios realizados por Julian et al. (2007), Dias et al. (2008) y Liu et al. (2013) (Jullian et al. 2007; Dias, Nikolaou y De Giovanni 2008; Liu et al. 2013).

Cabe destacar que esto depende completamente de las características del flavonoide, moléculas como la curcumina que por ser un flavonoide grande forma un complejo 2:1 teniendo todas sus estructuras aromáticas dentro de la β -CD (Tang et al. 2002) o la rutina, que sugiere que el anillo A es el que se encuentra en complejo debido a que el anillo B presenta un impedimento estérico por dos grupos azúcar (Nguyen et al. 2013), otro claro ejemplo es la neohesperidina que forma complejo con el anillo terminal isovanillina (Caccia et al. 1998), existe una interacción significativa entre las unidades de ramnosa de este mismo flavonoide con la cara externa de la β -CD (Malpezzi et al. 2004).

Otro parámetro muy importante es la capacidad antioxidante que como ya se había mencionado con anterioridad, depende de la capacidad del flavonoides de donar hidrógeno; en el estudio propuesto por Nguyen et al. (2013), hay un aumento en la capacidad antioxidante que se puede atribuir a la formación de uno o más puentes de hidrógeno; el grupo hidroxilo de la rutina forma el puente con algunos átomos electronegativos de la ciclodextrina, lo cual debilitara el enlace covalente del grupo hidroxilo convirtiéndolo en un excelente donador de protones. El aumento en la capacidad antioxidante también se asocia con el aumento de la solubilidad ya que los compuestos hidrofóbicos no están disponibles por si solos en soluciones acuosas, pero en complejo, su disponibilidad cambia (Nguyen et al. 2013).

Otro estudio en el que se utiliza DPPH para medir la capacidad antioxidante de harinas de papa, demostró que las harinas encapsuladas en comparación con aquellas no encapsuladas tienen una mayor capacidad antioxidante, un mayor contenido total de polifenoles, debido a que al agregar la maltodextrina al principio del proceso inactiva la polifenoloxidasas durante el proceso de elaboración de la harina que es la que se cree, es responsable de la pérdida de los polifenoles en los procesos térmicos (Ahmed et al. 2010)

Hoy en día hay muy pocos análisis que midan u observen de manera directa las interacciones fisicoquímicas, algunas de ellos son: laser pulsado (Leitner et. al.,2008), vista directa o fotos con microscopio electrónico o de fuerza atómica, además de la

espectroscopia infrarroja, en el caso de esta investigación, la espectroscopia infrarroja no se puede aplicar porque la gran cantidad de agua presente en la muestra representaría un ruido importante en los resultados.

A pesar de la gran cantidad de metodologías existentes actualmente hay muy pocos estudios que analicen las interacciones fisicoquímicas entre la matriz de un alimento y sus compuestos biofuncionales. En los cítricos primordialmente se encuentran investigaciones que se enfocan a analizar interacciones al encapsular o aislar ciertos compuestos, principalmente volátiles relacionados con el aroma. Por otro lado, ninguno de estos estudios ha tratado de relacionar el impacto de las interacciones fisicoquímicas de un alimento funcional con el efecto biológico *in vivo*.

Para esto, como ya se ha mencionado, se pueden emplear metodologías directas o indirectas, las metodologías planteadas en este proyecto de investigación se describen a continuación

13. Procedimientos o métodos

13.1 Implementación de los métodos de medición de variables de respuesta y evaluación de los jugos frescos y de la fórmula seleccionada, obtención de parámetros a emplear en las soluciones modelo.

13.1.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño multifactorial en donde las variables de estudio fueron:

Jugos de cítricos:

- Procesamiento: fresco y pasteurizado
- pH: natural (lima 5.6 y naranja agria 2.7) de procesamiento (lima 5 y naranja agria 4).
- Polisacárido: adición de β - CD y sin β - CD
- Edulcorante: solo en el caso de jugo de naranja agria con y sin sucralosa

Se llevaron a cabo un total de 24 experimentos para simular el comportamiento de un jugo industrializado

Sistema modelo:

- Tipo de flavonoide: tres niveles (dos de cada cítrico y la mezcla de estos)
- pH: en el caso de la lima se utilizó 5 y 5.5 mientras que en el caso de la naranja agria 2.6 y 4
- Temperatura: ambiente (25°C) y pasteurización (90°C por 90 segundos)
- Tipo de polisacárido: pectina, β -ciclodextrina y pectina/ β -ciclodextrina
- Edulcorante: solo en sistema modelo de naranja agria con y sin sucralosa

Se llevaron a cabo un total de 432 soluciones modelo de las cuales 144 pertenecieron al sistema modelo de lima y 288 al sistema modelo de naranja agria

La estrategia se basó en la suposición de la disponibilidad del flavonoide para interactuar con los reactivos, se cree que si hay una disminución de capacidad antioxidante y concentración de flavonoides en las soluciones modelo, esta disminución será debida a que se generó una interacción con el polisacárido.

Las variables de respuesta en el caso de los jugos fueron:

- ✓ Caracterización de los jugos (pruebas fisicoquímicas)

- ✓ Cantidad de pectina
- ✓ Cantidad de flavonoides totales
- ✓ Capacidad antirradical
- ✓ Identificación y cuantificación de flavonoides (cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta resolución).
- ✓ Efecto biológico (hipoglucemiante e hipocolesterolémico) en modelo animal

Mientras que en las soluciones modelo se midieron cambios en:

- ✓ Contenido de flavonoides totales
- ✓ Capacidad antirradical
- ✓ Contenido de flavonoides libres (cromatografía líquida de alta resolución)
- ✓ Efecto biológico (hipoglucemiante e hipocolesterolémico) en modelo animal

Todas las pruebas se realizaron por triplicado y se analizaron estadísticamente por medio de una prueba ANOVA multifactorial utilizando el software Statgraphics centurión XVI® tomando como nivel de significancia, para cada variable de estudio, valores de $P_{H0} \leq 0.05$, se presentan los valores promedio \pm desviación estándar.

13.1.2 Pruebas fisicoquímicas

Las características del jugo dependerán de la composición, las propiedades físicas y las propiedades fisicoquímicas de la materia prima empleada para su elaboración,. Las pruebas más comunes además de la determinación el rendimiento del cítrico, el contenido de sólidos solubles ($^{\circ}$ Bx), pH, y acidez titulable relacionados con la madurez (Kimball 1999).

Sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix).- Se utilizó un refractómetro en el cual se colocó 1 gota de muestra entre 1 lente y el prisma del refractómetro. El equipo funciona de la siguiente manera: la luz atraviesa primero una lente de vidrio esmerilado que dispersa la luz de manera uniforme en todas direcciones, la luz dispersa penetra a continuación en la muestra y es refractada en la superficie del prisma sobre la que está situada la muestra, el grado de refracción dependerá de la concentración de solutos dentro de la muestra y equivale a la concentración de azúcares, sin embargo, ya que la materia soluble de los jugos no se compone exclusivamente de hidratos de carbono en este caso se considera como sólidos solubles (Kimball 1999).

pH.- se midió mediante un potenciómetro cuyo fundamento es la diferencia de potencial que se genera entre dos electrodos sumergidos en una solución donde hay una concentración dada de iones, un electrodo se utiliza como referencia (generalmente de plata/cloruro de plata) y el electrodo de vidrio que es sensible al ion de hidrógeno.

Acidez titulable.- Esta técnica, a diferencia del pH, determina la concentración total de hidrógenos ácidos, independientemente si están en forma libre o no, se pesan 5g de muestra agregando 50ml de agua y 3 gotas de fenolftaleína (1% en etanol y agua) como indicador para después titular con solución valorada de hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1N y calcular el porcentaje de acidez con la siguiente formula:

$$\% \text{ de acidez} = \frac{(V \text{ de NaOH})(Eq \text{ del ácido})(N)(100)}{g \text{ muestra}}$$

Donde V de NaOH es el volumen gastado en la titulación, Eq del ácido se refiere a los equivalentes químicos del ácido que para el ácido cítrico es 0.64Eq, N se refiere a la normalidad de NaOH con la que se tituló.

13.1.3 Determinación de pectina

La pectina se encuentra principalmente en la materia opaca o pulpa centrifugable del jugo y corresponde aproximadamente al 5% del mismo y solo el 15% de éste es protopectina, por lo tanto, se utilizó la metodología propuesta por Kimball en 1999 para determinar la cantidad de pectina presente en el jugo fresco.

El jugo se extrajo mediante un exprimidor “Moulinex® vita press 1000”, una vez extraído se tomó un volumen determinado (25ml) y se filtró a vacío en papel filtro Whatman número 50 para después centrifugar a 18138g por 15 minutos para eliminar cualquier materia insoluble presente en el jugo, se retiró el sobrenadante y se pesó el residuo para sacar el porcentaje de materia insoluble en agua por medio de la fórmula:

$$\% \text{ de materia insoluble} = \frac{(g \text{ de pulpa} \times 100)}{ml \text{ de jugo}}$$

Del porcentaje obtenido mediante la fórmula, para la elaboración de las soluciones modelo se tomó en cuenta que solo el 5% de la pulpa podría ser pectina, del resultado arrojado tomando en cuenta solo el 5%, se descartó de nuevo de esta cantidad el 75% debido a que solo la protopectina está disponible para interactuar lo cual, coincide con lo reportado por kimball en 1999.

La pectina soluble está presente en el sobrenadante, esta porción también estará disponible para interactuar con los flavonoides, por lo tanto, se determinó mediante la técnica propuesta por Kimball (1999) para lo cual, al sobrenadante del paso anterior se le agregó isopropanol 1:3 y se dejó precipitar por 24 horas, una vez transcurrido este tiempo se separó por decantación para eliminar el alcohol, se dejó secar y se pesó para reportar la pectina soluble mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de pectina soluble} = \frac{(\text{g de residuo} \times 100)}{\text{ml de jugo}}$$

13.1.4 Flavonoides totales

Esta técnica se realizó según lo propuesto por Tounsi et al. (2011) con algunas modificaciones. La determinación de polifenoles se basa en la formación de un complejo entre el tricloruro de aluminio y los flavonoides, mostrando un cambio de coloración que puede ir del amarillo intenso al transparente. En una microplaca se agregan 100µl de la muestra y se mezcla con 24µl de solución acuosa de NaNO₂ (5%) recientemente preparada, después de 6min se agregan 48µl de solución acuosa de AlCl₃ (10%) recientemente preparada, después de 5min, agregar 160µl de NaOH 1M y dejar reposar por 30 minutos en la obscuridad y temperatura ambiente (25°C), leer la absorbancia a 510nm y comparar con un blanco (el cual contiene 100µl agua desionizada en vez de muestra). El contenido total de flavonoides de la muestra se expresa como miligramos equivalentes de Quercetina por gramos de peso seco, calculados a través de una curva de calibración con Quercetina.

Los rangos de la curva de calibración fueron 1,10,20,30,40,60,200,600,800 mg/L (Anexo 2) (Tounsi et al. 2011)

13.1.5 Capacidad anti-radical por DPPH

Los flavonoides interceptan la cadena de oxidación y donan electrones del grupo hidroxilo formando un producto estable, que no iniciará o propagará la reacción radical. Para medir esta capacidad se utiliza un radical estable como el 2,2-Difenil-1-picrilhidracil (DPPH).

La técnica fue desarrollada según lo propuesto por González y Nazareno (2011), se preparó una solución con 0.002365g del radical DPPH disuelto en una mezcla de 80 ml de metanol y 20ml de agua, se sonicó por 5min para asegurar que la mezcla estuviera correctamente homogeneizada. Una vez preparada esta solución metanólica se mezclaron 3.9 ml de la misma con 100µl de la muestra diluida 1:1 con agua destilada, se dejó reposar por 90min y se lee absorbancia a 515nm; los resultados se expresaron como % de inhibición. Además se realizó una curva de calibración con trolox (600-4000 micromoles multiplicando por 2 la concentración anterior hasta llegar a la concentración final, anexo 3) y los datos se reportaron como micromoles equivalentes de trolox (µMET/L)(González y Nazareno 2011)

$$I\% = \left[\frac{AB - AM}{AB} \right] \times 100$$

13.1.6 Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC)

Tiene como finalidad conocer, de manera preliminar, el perfil y concentración de flavonoides presentes en la bebida a base de naranja agria (*citrus aurantium*) y de lima (*citrus limetta*), de acuerdo al método propuesto por López et al. (2014).

Se utilizó placa de silica gel 60W F₂₅₄S y DC de 10X20 cm (Fertigfolien Alugram xtra silica gel G/UV254) para la fase estacionaria y se probaron distintas fases móviles, variando la polaridad de las mismas, las cuales se enumeran la tabla 4. Las placas se

revelaron con anisaldehído que contenía 0.5 ml de anisaldehído, 10ml de ácido acético y 1ml de ácido sulfúrico; el revelador de vainillina contenía metanol (80%): ácido clorhídrico (19%): agua (1%), sin importar el tipo de revelador se aplica calor.

Tabla 4. Fases móviles utilizadas para HPTLC del jugo de lima y naranja agria

	Reactivos	Proporciones
1.-	Tolueno-Acetato de etilo-Acido fórmico	36:12:5
2.-	Tolueno-Acetato de etilo	24:1
3.-	Acetato de etilo-Acetona-Ac. acético-Agua	15:5:2.5:2.5
4.-	Acetato de etilo-Ac. acético-Ac. fórmico-Agua	17:2:2:4
5.-	Acetato de etilo-Metanol-Ac. fórmico-Agua	20:1.5:1.5:2

13.1.7 Identificación y cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La identificación y cuantificación de los flavonoides se llevó a cabo por medio de cromatografía líquida de alta resolución, adaptando el método reportado por Abad y col. (2012); se utilizó una columna C18 (Whatman) 4.6 x 250mm, que se introdujo en un horno a 40°C. El volumen de inyección fue de 20µl y la velocidad de flujo fue de 0.7ml/min. La fase móvil consistió en un gradiente lineal de agua acidificada con ácido acético al 1% (a) y metanol puro (b), que fueron variando como sigue: 95%a - 5%b (0-15min), 80%a - 20%b (15-20min), 70%a - 30%b (20-35min), 60%a - 40%b (35-40min), 50%a - 50%b (40-45min) y 95%a - 5%b (45-55min) (Abad-García et al. 2012).

Este proceso se llevó a cabo en un equipo HPLC marca VARIAN® Pro Star modelo 230, se trabajó con dos longitudes de onda, a 278nm y 260nm.

La cuantificación de los flavonoides se realizó con base al área bajo el pico del cromatograma correspondiente la recta de calibración de cada flavonoide, las soluciones usadas para las rectas de calibración tuvieron un rango de concentración de 20 a 200ppm en el caso de la hesperidina y de 2 a 50 ppm para la eriocitrina (Anexo 4).

13.1.7 Evaluación sensorial del nivel de dulzor en jugo de naranja agria

Debido a que el propósito de este estudio es impulsar la creación de bebidas comercializables para humanos, en el caso de la naranja agria se incorporó un edulcorante con la finalidad de obtener un nivel de acidez-dulzor que se aproxime al de los jugos de cítrico dulces comerciales a los que está acostumbrado el consumidor. El ajuste de la cantidad de edulcorante se realizó por medio de evaluación sensorial. Se utilizó sacarosa como referencia y un edulcorante no calórico (sucralosa).

Para ajustar el dulzor de la bebida, endulzada con sucralosa, al dulzor que aporta la sacarosa se aplicó una prueba “A No-A” que tiene por objetivo determinar semejanzas de muestras problema (diferentes concentraciones de sucralosa) respecto a una muestra referencia ya conocida, para lo cual, se preguntó a los jueces ¿Cuál o cuáles de las muestras codificadas se parece a “A”? Los datos se analizaron por medio de una prueba chi cuadrada (χ^2).

La evaluación del dulzor fue realizada por jueces previamente entrenados en la detección del nivel de dulzor de la sacarosa y algunos edulcorantes. Se proporcionaron 4 muestras codificadas con números de tres dígitos al azar conteniendo 10 ml de jugo de naranja agria con sucralosa a las siguientes concentraciones: 33, 30, 25mg/100ml además de una referencia endulzada con sacarosa (20g/100ml) marcada como “A”. Se les pidió probar la referencia una sola vez y recordar el nivel de dulzor detectado, después tomar las muestras problema de izquierda a derecha, probarlas, analizar y comparar el nivel de dulzor respecto a “A” e indicar cuál o cuáles de las muestras se parecían. La evaluación se realizó por triplicado en días distintos entre 11-11:30 am y las muestras fueron elaboradas entre 10 y 15 minutos antes de la evaluación para evitar cambios que no se debieran al dulzor.

Los resultados se analizaron para encontrar la concentración de sucralosa que aporte un nivel de dulzor semejante o muy cercano al nivel de dulzor de la muestra referencia endulzada con sacarosa y fueron analizados con estadística no paramétrica por medio del cálculo de la distribución de χ^2 , observando la significancia estadística por medio de las tablas de distribución de χ^2 propuestas en Sensory Evaluation Techniques (Meilgaard, Civille y Carr 1999).

13.1.8 Formulación de jugos

Buscando simular la industrialización de los cítricos utilizados en este proyecto se formularon los jugos y se agregaron aditivos:

- Pasteurización: 90°C por 40 segundos para después enfriar en agua con hielo.
- Adición de β -CD: se agregaron 3g por cada 100ml según lo propuesto por Howard et al. (2013) buscando la estabilidad de los flavonoides a los cambios de temperatura y pH (Howard et al. 2013).

En el caso de la naranja agria, además, se controlaron factores como el pH en el cual se realizó un ajuste de 2.7 a 4 buscando disminuir la acidez pero manteniendo un pH bajo estándar para este tipo de jugos para evitar la proliferación bacteriana siguiendo las recomendaciones de la NOM-086-SSA1-1994. El ajustar del pH se realizó con fosfato de sodio dibásico-dodecahidratado (J.T.Baker, Cat. 3822) y el dulzor se ajustó con sucralosa de acuerdo a los resultados obtenidos mediante la prueba sensorial A No-A.

13.2 Preparación del sistema modelo con flavonoides de lima o naranja agria y polisacáridos para probar las interacciones fisicoquímicas controladamente.

13.3.1 Preparación de soluciones probadas en el sistema modelo

Como flavonoides se utilizaron hesperidina (Hesp) (Fluka Cat. 45714), naringina (Nar), eriocitrina (erio) y neohesperidina (NH) grado HPLC (Sigma-Aldrich Cat. 71162, 45714, N1887, respectivamente), que se prepararon en las concentraciones encontradas en el análisis del jugo fresco y se aplicó el proceso de pasteurización como en la bebida y dos niveles de pH para cada uno, además de una concentración fija de pectina utilizando estándar de pectina de cítrico de alto metoxilo (Sigma-Aldrich Cat. P9561) y como polisacárido no presente en el jugo se utilizó la β -CD (Carbiochem Cat. 239760) en una concentración equimolar con los flavonoides.

13.3.1.1 Soluciones de Pectina-Flavonoide.

Se preparó una solución madre de pectina diluida en agua, la cual se agregó en la concentración deseada a una solución de flavonoide, se ajustó el pH con un buffer hecho a base de ácido cítrico y/o fosfato de sodio dibásico dodecahidratado grado reactivo (JTBaker). Una vez elaboradas las soluciones modelo, se mantuvieron en contacto por agitación veinte minutos a temperatura ambiente para asegurar la formación de interacciones. Las soluciones a las que se les aplicó el proceso de pasteurización se llevaron a un termoblock a 90°C y una vez que las soluciones alcanzaron 90°C se mantuvieron a esa temperatura por 40 segundos para simular la pasteurización del jugo.

Una vez formado el complejo de interacción, se centrifugó a 1467g por 5 minutos para precipitar el complejo, los análisis posteriores se hicieron utilizando solamente el sobrenadante.

13.2.1.2 Soluciones de β -Ciclodextrina-Flavonoide.

Se preparó una solución madre de β -CD en agua y se dejó en agitación a 20°C por 16 horas para asegurar la disolución completa del compuesto; se tomó una alícuota de la misma y se preparó una solución equimolar que se agregó a la solución de flavonoide, ajustando el pH con buffer, hecho a base de ácido cítrico o fosfato de sodio dibásico dodecahidratado grado reactivo (JTBaker), una vez añadidos todos los ingredientes se sometieron a una agitación de 85 rpm por 72 horas a 25°C en un baño maria con agitación marca Boekel de Boekel Scientific, pasado este tiempo, aquellas muestras que requerían ajustar temperatura se llevaron a un termoblock a 90°C por 40 segundos para simular la pasteurización del jugo.

Una vez formado el complejo de interacción se centrifugó a 1467g por 5 minutos para precipitar el complejo, los análisis posteriores se hicieron utilizando el sobrenadante.

13.3 Evaluación y comparación de los parámetros biológicos (capacidad hipoglucemiantes e hipocolesterolémico) de los sistemas modelo, el jugo fresco y el jugo a base de lima o la naranja agria modificado *in vivo* (modelo animal).

Para determinar indirectamente el impacto de las interacciones físico-químicas en la disponibilidad de los flavonoides y su posible efecto biológico (hipoglucemiante o hipocolesterolémico), se planteó hacer dos pruebas postprandiales en ratones Balb/c, provocando niveles elevados de glucosa y colesterol reversiblemente de manera que el efecto de estas soluciones simulara el consumo de un alimento y el posible efecto sobre los niveles que se elevan al consumir de manera excesiva algún alimento rico en grasa o en colesterol, por tanto se realizaron las siguientes pruebas:

Se utilizaron 72 ratones, de ocho semanas de edad, 36 ratones machos Balb/c adquiridos en el Zooterio de la Universidad de Guadalajara que se utilizaron para la prueba hipoglucemiante, y 36 ratones Harlam que se utilizaron para la prueba hipocolesterolémica. Los ratones fueron alimentados con dieta estándar (Proteína 20%, grasa 10% fibra 2.1%) y se mantuvieron a temperatura ambiente (22°C y humedad relativa de 50%) en periodos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Los animales fueron manejados siguiendo las pautas de cuidado de animales de acuerdo con las regulaciones promulgadas por el Gobierno Federal de México (NOM-062-ZOO-1999 y NOM-033-ZOO-1995).

13.3.1 Efecto hipoglucemiante

El método utilizado en este proyecto se ha llevado a cabo en otras ocasiones para la evaluación biológica de productos naturales y se basa en administrar a distintos modelos animales una dosis elevada de disacáridos para crear un pico de glucosa parecido o mayor al que se obtendría después de consumir alimentos, de esta manera se prueba el efecto hipoglucemiante sin crear una enfermedad y se lleva a cabo de manera reversible (Rendell and Jovanovic, 2006)

Se formaron seis grupos de seis ratones, a cada grupo se le administró una de las soluciones que se describen a continuación:

- Control negativo, al que se administró agua.
- Control positivo, al que se administró una solución de acarbosa que inhibe la absorción de los carbohidratos (50 mg/kg ratón).
- Grupo A, al que se le administró la solución del modelo que presentó mayor concentración de flavonoides libres (interacción menos estable).
- Grupo A1, al que se le administró jugo fresco
- Grupo B, al que se administró una solución modelo que presentó la menor concentración de flavonoides libres (interacción más estable).
- Grupo B1, al que se le administró el jugo con la formula seleccionada.

Para poder suministrar dichas soluciones, se requirió dejar a los ratones en ayuno de 15-18 horas, una vez transcurrido este periodo, a cada ratón, se le midió la glucosa basal con un glucómetro marca Accu-Chek® una vez realizado lo anterior, se les administró vía oral una solución de maltosa (4g/kg ratón) para elevar los niveles de glucosa en sangre, inmediatamente después, a cada grupo se le administró una segunda solución según fuera su clasificación (agua, acarbosa y las soluciones modelo con mayor ó menor concentración de flavonoides libres).

Después de 30 minutos, se tomó una muestra de sangre de la cola de cada ratón la que fue analizada utilizando el glucómetro. Los resultados presentados, se basan en los aumentos de la glucosa postprandial, obtenido por la diferencia entre los niveles de glucosa postprandial (gr/dl) menos los niveles de glucosa basales (gr/dl).

13.3.2 Efecto hipocolesterolémico

Al igual que en el efecto hipoglucemiante, este método se ha utilizado con anterioridad para evaluar propiedades biofuncionales de productos naturales, se basa en la administración (intraperitoneal) de Tiloxapol, que es un detergente no iónico que inhibe la lipoprotein-lipasa induciendo una hiperlipidemia aguda (Ramchoun et al. 2012).

De la misma manera que en el efecto hipogluceminate, se formaron seis grupos de seis ratones, a cada grupo se le administró una de las soluciones que se describen a continuación:

- Control negativo, al que se administró agua.

- Control positivo, al que se administró una solución de atorvastatina (100 mg/kg ratón).
- Grupo A, al que se le administró la solución modelo que presentó mayor concentración de flavonoides libres (interacción menos estable).
- Grupo A1, al que se le administró jugo fresco
- Grupo B, al que se administró una solución modelo que presentó la menor concentración de flavonoides libres (interacción más estable).
- Grupo B1, al que se le administró el jugo con la formula seleccionada.

Para poder administrar dichas soluciones, se requirió dejar a los ratones en ayuno de 15-18 horas, una vez transcurrido este periodo, a cada ratón se le midió el colesterol basal para después administrar vía intraperitoneal 100µl de una solución de tiloxapol (500 mg/kg ratón). Una vez conseguida la hiperlipidemia a cada grupo se le administró una solución problema y después de 24 horas, se tomó una muestra de sangre de la vena coclear y se analizó utilizando el Kit enzimático Colesterol liquicolor Stanbio (fabricado en Estados Unidos de Norteamérica y distribuido en México por laboratorios Licon).

Esta determinación se realiza a través de un método enzimático que provoca la hidrólisis de esteres mediante la enzima colesterol esterasa originando colesterol libre, después este colesterol se oxida por acción de la colesterol oxidasa para después unirse a un compuesto cromógeno en presencia de peroxidasa, la intensidad del color rojo final es proporcional a la concentración de colesterol total. Se utilizan 10µl de suero y 1ml del reactivo proporcionado en el kit, los valores de colesterol total sérico se obtienen de la siguiente ecuación:

$$\text{Colesterol total serico} \left(\frac{mg}{dl} \right) = \frac{Au}{As} \times 200$$

Donde Au es la absorbancia de la muestra y As la absorbancia de un estándar proporcionado por el kit. Los resultados presentados en esta investigación son: aumento del colesterol postprandial, obtenido por la diferencia entre los niveles de colesterol postprandial (gr/dl) menos los niveles de colesterol basales (gr/dl).

14.Resultados y discusión

14.1 Implementación de los métodos de medición de variables de respuesta y evaluación de los jugos frescos y la formula seleccionada, obtención de parámetros a emplear en las soluciones modelo.

14.1.1 Pruebas fisicoquímicas

Los parámetros fisicoquímicos del jugo de lima y naranja agria fresco se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados fisicoquímicos

Prueba	Lima	Naranja agria
Rendimiento de fruto en jugo (%)	40	23
pH	5.66±0.01	2.71±0.02
°Brix	8.3±0.1	10.3±1
Acidez titulable (% de acidez)	1.36±1.15	53.87±0.24

El jugo con mayor contenido de sólidos solubles (°Brix) es el de naranja agria, es muy probable que se deba a que, en este parámetro, se reflejan no solo los azúcares sino también la cantidad de ácidos y sus sales, esta afirmación se comprueba con el porcentaje de acidez titulable correspondiente a la naranja agria, el cual es mayor que el de la lima. El rendimiento es mayor para la lima, la cantidad de residuos es del 55% (cascara y pulpa) mientras que para la naranja agria es de 66%. Estos parámetros son importantes para establecer los balances de materia y la rentabilidad de la producción, para el control de calidad del jugo así como también para la estandarización de la materia prima (Kimball 1999).

14.1.2 Determinación de pectina total

El contenido de pectina no presentó diferencias significativas entre un cítrico y otro, sin embargo, la lima muestra una tendencia mayor en contenido de pectina tanto soluble como insoluble con 1 ± 0.5 g/100ml de jugo y la naranja agria 0.6 ± 0.02 g/100ml de jugo (gráfico 1). Esta diferencia se debe a la composición específica de cada fruto y dependerá del estado de madurez, del lugar de cultivo y del pH típico del mismo. Tecnológicamente hablando, una de las principales funciones de la pectina es la de espesante, agente gelificante o bien como estabilizador, por lo tanto, la naranja agria, al tener un pH más ácido requiere una menor cantidad de pectina para estabilizar el jugo, debido a la formación de gel por parte de la pectina al estar en medio ácido.

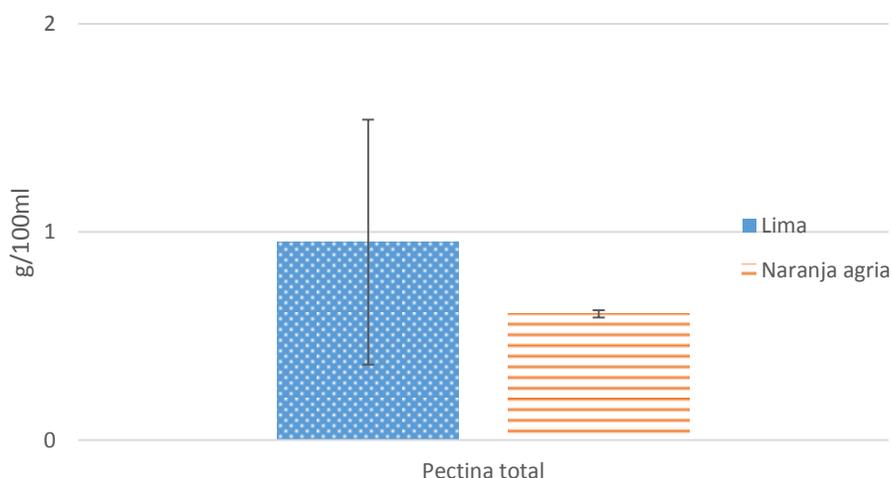


Gráfico 1. Contenido de pectina de jugos frescos de lima y naranja agria

14.1.3 Cromatografía de capa fina (TLC)

Se probaron 5 fases móviles, 2 tipos de fase estacionaria y 2 reveladores encontrando que hay un mayor factor de retardación (RF), con mejor definición y separación (resolución) de compuestos con la placa para TLC de silica gel 60W F₂₅₄S (Figura 19) además de que el revelador más eficaz en este caso fue el que contenía anisaldehído ya que se cree podría formar un complejo con los flavonoides atrapados en la placa, que al someterse a calor, permite colorear el mismo en tonos que van del verde al naranja.

En las fases móviles con menor polaridad como la de tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico y tolueno: acetato de etilo, las muestras tienen mayor afinidad por la fase estacionaria con un RF de 0, a diferencia de lo propuesto por López-Nuñez (2014), esto debido a que la mayor proporción de solventes son de tipo apolar o polar aprótico, es decir, aquellos en los cuales no hay grupos hidroxilo y no aceptan ni dan protones, lo que provocó que haya una mayor afinidad del compuesto a los grupos expuestos de la sílica. En la fase móvil acetato de etilo: acetona: ácido acético: agua (15:5:2.5:2.5) la mayor proporción de la fase móvil está constituida por solventes polares apróticos lo cual evita la separación adecuada de los compuestos de la misma manera que la fase móvil con mayoría de solventes apolares.

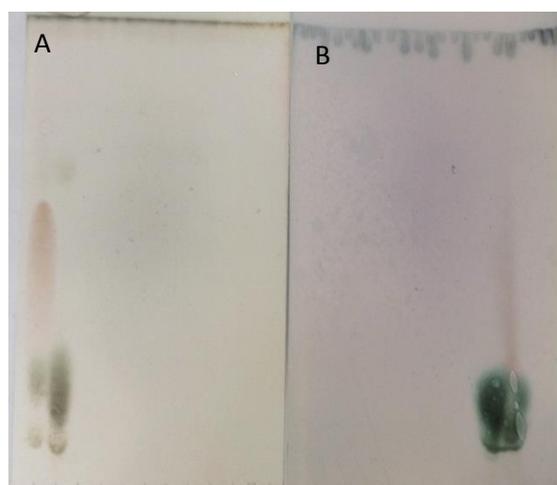


Figura 19. Resultados de distintas fases estacionarias, A: TLC sílica gel 60W F25 S y B: DC Fertigfolien Alugram xtra sílica gel G/UV254

La fase móvil de acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (20:1.5:1.5:2), al ser muy polar y tener mayor proporción de solventes próticos que la fase móvil acetato de etilo: metanol: ácido fórmico: agua (20:1.5:1.5:2) evita que los compuestos presentes en el jugo se separen de manera adecuada, provocando la elución de los compuestos en mezcla y no una separación adecuada, mientras que la segunda fase móvil mencionada (acetato de etilo: metanol: ácido fórmico: agua) separa mejor los compuestos presentes en el jugo.

En la figura 20 se muestra la placa y fase móvil más adecuada para separar los flavonoides de interés, de izquierda a derecha se inyectaron los siguientes estándares: eriocitrina,

naringina, hesperidina, neohesperidina y mezcla en una relación de 1000 mg/l, además de jugo de lima, naranja, lima liofilizada. Se puede apreciar que todos los estándares corren en un rango de RF similar que incluye las manchas más intensas de las muestras. En los carriles del 1 al 5 están distribuidos los estándares en el siguiente orden: eriocitrina, naringina, hesperidina, neohesperidina y mezcla, mientras que en los carriles 6, 7, y 8 se encuentran los jugos de naranja agria y lima fresca así como la fórmula de jugo de lima (secreto industrial), debido a la distinta coloración mostrada por los compuestos al revelar la placa, no se puede garantizar que estos correspondan a los estándares de flavonoides de interés, sin embargo, ya que el RF es similar al reportado por los estándares podría suponerse que los flavonoides están presentes pero se encuentran en interacción con otros compuestos, lo cual provoca un cambio en la coloración al revelarse.

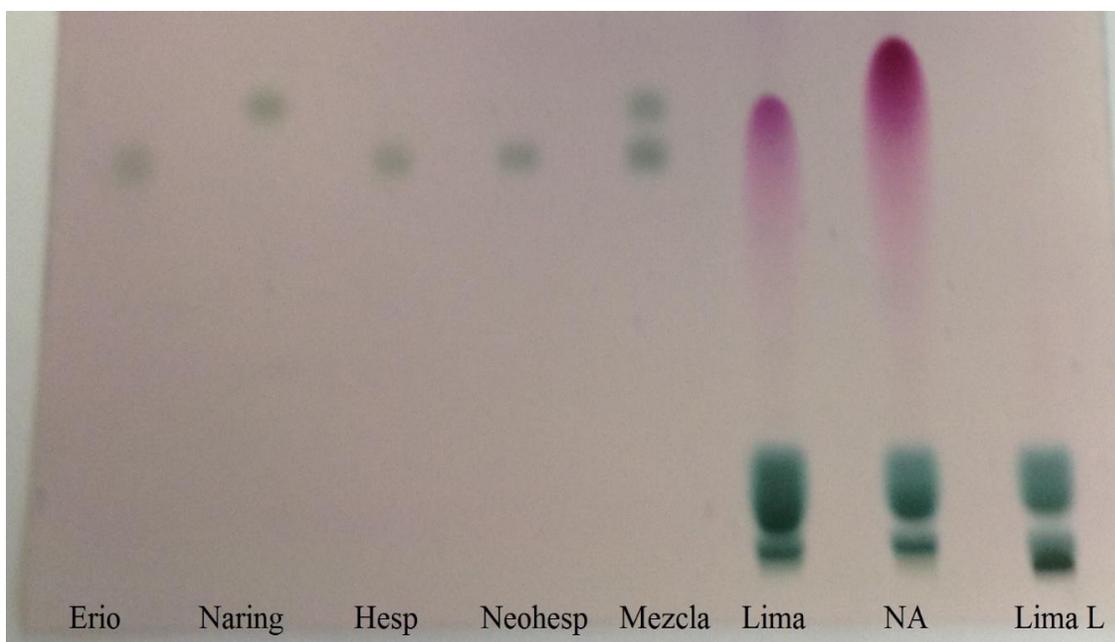


Figura 20. HPTLC silica gel 60W F254S, fase móvil acetato de etilo: metanol: ácido fórmico: agua (20:1.5:1.5:2) donde 1: Erio (eriocitrina), 2: Naring (naringina), 3: Hesp (hesperidina), 4: Neohesp (neohesperidina), 5: Mezcla (mezcla de flavonoides), 6: lima, 7: NA (naranja agria), 8: Lima L (lima liofilizada).

14.1.4 Flavonoides totales

El contenido total de flavonoides se estimó con base en el rango de respuesta en la curva de Quercetina. En los gráficos 2 y 3 se muestra las concentraciones de flavonoides de los jugos frescos y las fórmulas seleccionadas de ambos cítricos.

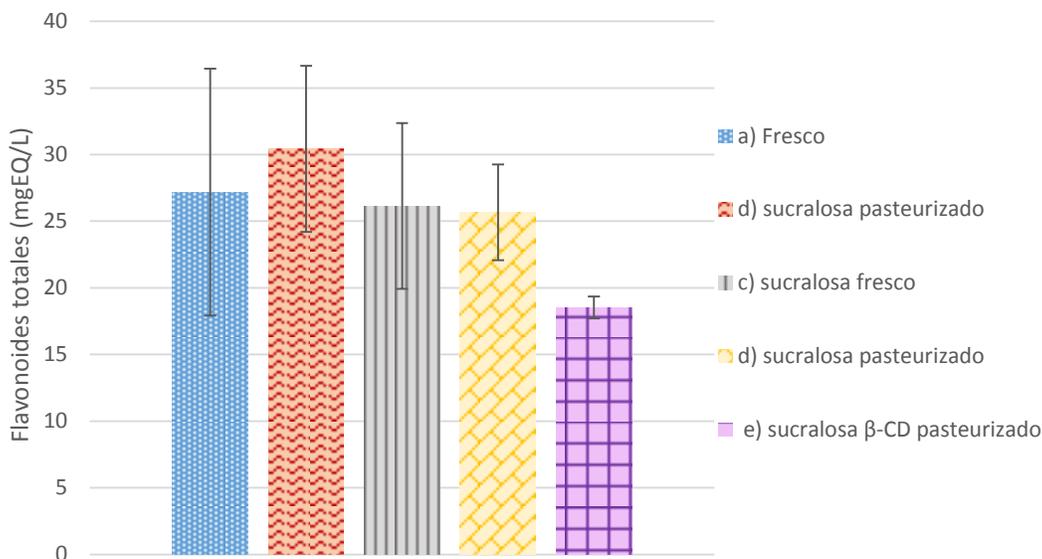


Gráfico 2. Flavonoides totales de los jugos de naranja agria de izquierda a derecha: jugo fresco, pasteurizado a 90°C por 30seg, con sucralosa sin pasteurizar, con sucralosa y pasteurizado a 90°C por 30s, con sucralosa y ciclodextrina pasteurizado a 90°C por 30s (* valores $p < 0.005$ en comparación con jugo fresco)

En los jugos frescos (gráfico 2 y 3 barra “a”), el mayor contenido de flavonoides totales se encuentra en la naranja agria con 27 ± 9 mg equivalentes de quercetina por litro (mgEQ/L), este comportamiento se observa debido a que los flavonoides de la naranja agria poseen una distribución ortodihidroxi en el anillo B (Barreca, Belloco et al. 2011), provocando que estos tengan una mayor disposición para formar el complejo de inclusión con el AlCl_3 dando una absorbancia mayor que con el jugo de lima (grafico 3) (Denni Mammen and Daniel 2012). Al agregar sucralosa al jugo de naranja agria fresco no hay un cambio significativo en comparación con el jugo fresco sin sucralosa (barra “a”) detectandose 26 ± 6 mgEQ/L en el jugo fresco con sucralosa (barra “c”), lo cual significa que los flavonoides que pudieran estar interactuando con la matriz no presentan mayor afinidad por la sucralosa. Al pasteurizar el jugo fresco (barra “b”) sin añadir edulcorante o β -CD se

aprecia un ligero aumento no significativo (27 ± 9 y 30 ± 6 mgEQ/L) en comparación con el jugo fresco (barra “a”) que podría deberse a la hidrólisis de compuestos (Plaza et al. 2011). Cuando se le agrega β -CD y sucralosa al jugo y se pasteuriza hay una disminución significativa de los flavonoides totales (barra “d”), podría deberse al encapsulado de los flavonoides libres y la protección que la ciclodextrina ofrece frente al calor.

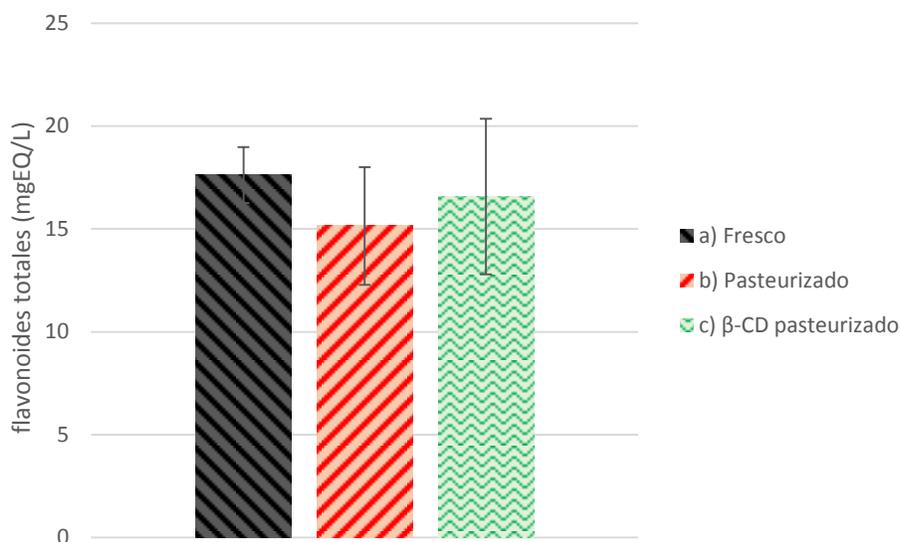


Gráfico 3. Flavonoides totales de los jugos de lima (* valores $p < 0.005$ en comparación con jugo fresco)

Por su parte la lima presentó un menor contenido de flavonoides (18 ± 4 mgEQ/L) (gráfico 3) que el jugo de naranja agria. La literatura reporta que el flavonoide más abundante en la lima es la hesperidina (4.29mg/l) una flavanona que tiene en su estructura O-disacárido como sustituyente lo cual obstaculiza la quelación con el $AlCl_3$ provocando que estos no sean detectados por el método, no hay una diferencia significativa al someter el jugo a pasteurización (barra “b”) o al agregarle β -CD (barra “c”) si se compara con el jugo fresco (barra “a”), sin embargo, se aprecia una tendencia a disminuir al agregar β -CD debido a que cualquier bloqueo de los grupos hidroxilos en los carbonos 3,5,3',4' evitan la quelación reduciendo el desplazamiento batocrómico (Denni Mammen and Daniel 2012)

14.1.5 Capacidad anti-radical por DPPH

La habilidad del jugo de lima y naranja agria para actuar como antioxidante, se midió con base a su capacidad de inhibir el radical DPPH (%), los resultados se muestran en el gráfico 4.

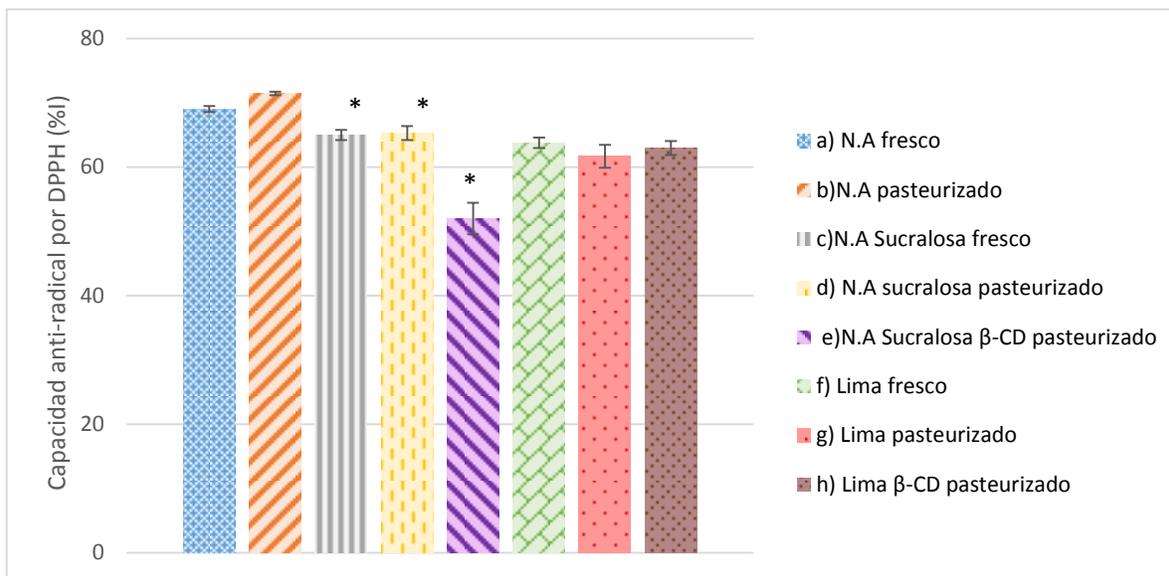


Gráfico 4. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de los jugos de naranja agria de izquierda a derecha: a) jugo fresco, b) pasteurizado (90°C por 30seg), c) con sucralosa sin pasteurizar, d) con sucralosa y pasteurizado, e) con sucralosa y β-CD pasteurizado y jugos de lima: f) fresco, g) pasteurizado, h) con β-CD pasteurizado (letras minúsculas indican diferencia significativa entre valores $p < 0.005$ en comparación con jugo fresco)

Al analizar los jugos frescos (gráfico 4, barra “a y f”) se aprecia que el jugo de naranja agria (barra “a”) tienen un porcentaje de inhibición del radical DPPH (%I) significativamente mayor que el jugo de lima (barra”f”), esto concuerda con lo reportado por Barreca et al (2011), ellos afirman que el jugo de naranja agria tiene un %I de hasta 75% y se puede explicar debido a que como ya se mencionó, la actividad antirradical está determinada por la habilidad de donar electrones que estará asociada con el grado y posición de hidroxilación y metilación en el anillo B y los flavonoides del jugo de naranja agria poseen un anillo B catecólico en flavonoides como la Neerocietrina, eriocitrina y lucenin-2 lo cual confiere una gran estabilidad al radical aroxil formado por el DPPH (Barreca et al. 2011a), además los ácidos también pueden dar una señal en este método y debido a que la naranja agria tiene mayor contenido de ácidos que la lima esto podría estar influyendo en el resultado.

En el jugo de naranja agria (gráfico 4) hubo un incremento en el %I, al ser pasteurizado (69 ± 0.5 y 71 ± 0.3 %I en jugo fresco (barra “a”) y pasteurizado (barra “b”) respectivamente). Esto podría deberse a la hidrólisis de los compuestos que aumentan la capacidad de donar electrones, esto se ha observado en otros estudios, Plaza et al. (2011) mostraron un aumento en el contenido de flavonoides y la capacidad antirradical de los mismos cuando se somete a pasteurización un jugo de naranja (Plaza et al. 2011). La adición de sucralosa al jugo de naranja agria mostró una disminución significativa en el %I sin importar si se somete a pasteurización o no (barras gris, amarillo y morado), esto podría deberse a la interacción entre el edulcorante y los flavonoides en el jugo y la resistencia de sucralosa a los cambios en el pH y la temperatura (Tollefsen et al., 2012), la interacción se vuelven más fuertes cuando se añade β -CD mostrando el menor %I de todos los jugos (52 ± 2.5 %I barra “h”).

En el gráfico 4 en la parte derecha se muestra el % de inhibición del radical DPPH de los distintos jugos de lima, al someter el jugo de lima a pasteurización (barra “g”) o al agregarle β -CD y pasteurizarlo (barra “h”) no se mostraron diferencias significativas con respecto al jugo fresco (barra “f”), esto puede deberse a que la composición química podría no ser afectada por un procesamiento mínimo como lo es la pasteurización (Del Caro et al. 2004).

14.1.6 Detección y cuantificación de flavonoides en los jugos por HPLC

El análisis mediante HPLC, el uso de estándares y la determinación del tiempo de retención permitió identificar a los flavonoides eriocitrina, hesperidina, neohesperidina, naringina, hesperidina y neoeriocitrina en jugos frescos de naranja agria y lima. Los tiempos de retención y las concentraciones de estos flavonoides se muestran en la tabla 6. Además se muestran los cromatogramas de cada jugo en la figura 21.

Los flavonoides encontrados concuerdan con lo reportado por diversos autores (Park et al., 2014; Peterson et al., 2006; Rodríguez-Rivera et al., 2014).

Tabla 6. Concentración de flavonoides en jugos frescos y pasteurizados, además de los jugos de naranja agria con sucralosa (3mg/100ml)

Tipo de flavonoide	Tiempo de retención [Min]	Concentración (mg/l)					
		Jugo de lima			Jugo de naranja agria		
		Fresco	CD	Bibliografía	Fresco	CD + sucralosa	Bibliografía
Eriocitrina	28.28	16±0.5	61±1.3	2.1±0.27	2±0.1	7±1	0.8±0.07
Neoeriocitrina	29.25	2±0.04	ND	ND	6±0.02	ND	9.03±0.8
Naringina	33.28	31±3.5	9±0.7	ND	683±0.01	63±4	23.4±1.4
Hesperidina	35.29	501±62	121±2.1	4.3±0.53	0	0	ND
Neohesperidina	36.43	0	0	ND	542±6.1	459±20	18.09±1.2

Datos de la columna "Reportes" se obtuvieron de Barreca y col 2011 a y b.

De la bibliografía consultada solo Barreca et al. (2011) realizaron estudios sobre el jugo de naranja agria y lima encontrando las concentraciones que se presentan en la tabla 6 en la columna de "Bibliografía". Las concentraciones encontradas por estos autores y las encontradas en el presente trabajo son diferentes, lo que puede deberse a factores tales como región de procedencia, el grado de madurez, la variedad y las condiciones de cultivo además, puede influir el método de obtención y conservación del jugo, así como la metodología que se utilizó para la identificación y cuantificación de los flavonoides (Barreca et al. 2011a, 2011b).

Al pasteurizar y añadir β -CD al jugo de lima como si fuera una bebida formulada, puede haber una disminución significativa en la concentración de algunos flavonoides presentes en el producto, mientras que otros parecen aumentar (tabla 6). La eriocitrina aumenta aproximadamente 45 ppm en comparación con lo encontrado en el jugo fresco, esto podría deberse, a que este compuesto tuviera más afinidad por los polisacáridos presentes en el jugo (celulosa, pectina) que con la β -CD lo cual podría dejar al flavonoide desprotegido (tabla 6).

La hesperidina parece tener mayor afinidad por la β -CD, lo que se ve reflejado en una disminución de 24% de su concentración en solución, con lo que podría pensarse que este compuesto estaría protegido por la β -CD (Nguyen et al. 2013) (tabla 6).

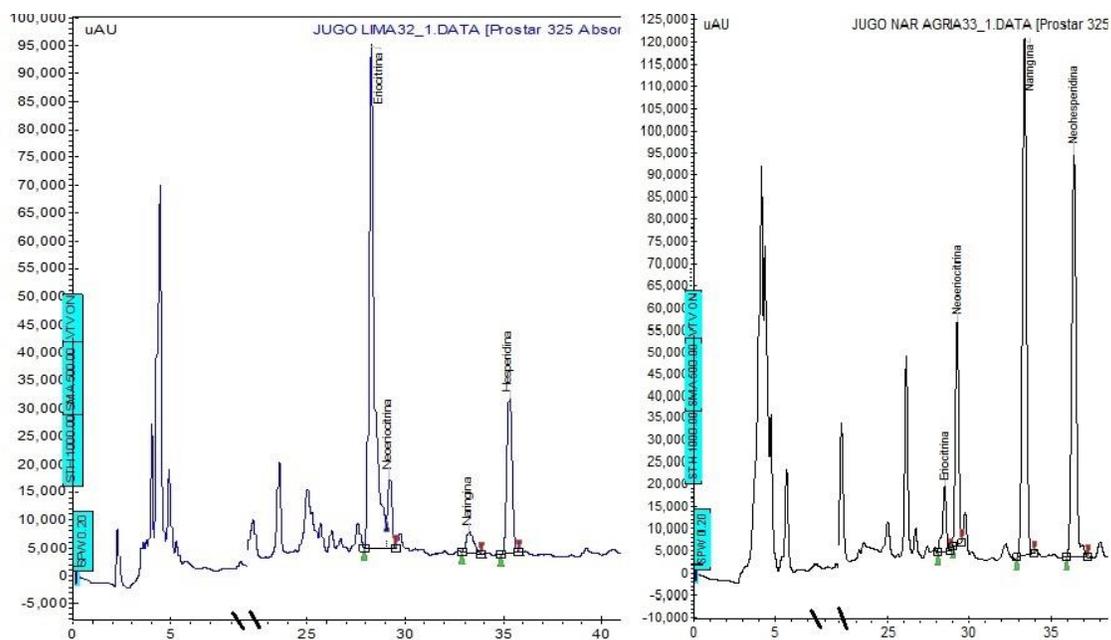


Figura 21. Cromatogramas de jugos frescos, izquierda: lima y derecha: naranja agria

Al jugo de naranja agria, además de la β -CD también se le agregó sucralosa, al adicionar estas sustancias se observó una disminución significativa en todos los flavonoides estudiados con respecto a los encontrados en el jugo fresco, siendo la formula a la que se le agrega β -CD y sucralosa la que disminuye en mayor proporción, ya que en el jugo fresco se encontraron 683 ± 0.01 ppm de naringina mientras que en el jugo con β -CD y sucralosa/pasteurizado se encontraron 63 ± 4 ppm del mismo flavonoide, esto puede deberse a la protección de los compuestos al ser puestos en contacto con la ciclodextrina, además esta interacción se hace aún más estable al adicionar sucralosa, tal vez debido a que, se ha demostrado que la sucralosa es estable a cambios de pH y temperaturas, lo cual puede proteger a los flavonoides en mayor medida que solo con la β -CD (tabla 6) (Tollefsen, Nizzetto y Huggett 2012).

En base a estos resultados se seleccionaron cuatro estándares para la elaboración del sistema modelo: hesperidina, eriocitrina, naringina y neohesperidina, las variables y los parámetros se muestran en la figura 22, parámetros como la cantidad de pectina (0.095g/100ml) y la temperatura (25 y 90 °C) se dejaron fijos en ambos sistemas modelo.

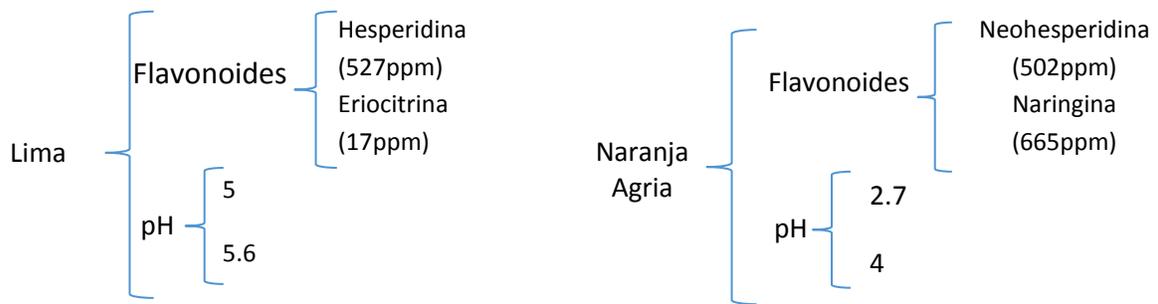


Figura 22. Diseño esquematizado de los parámetros tomados en cuenta en las soluciones modelo.

14.2 Preparación y análisis de los sistemas modelos con flavonoides de lima o naranja agria y polisacáridos, para probar las interacciones fisicoquímicas controladamente.

14.2.1 Flavonoides totales

Debido a que el AlCl_3 se utiliza como precipitante de pectina en la clarificación de jugos con una concentración de 0.64% (Lević et al. 2007), la determinación de flavonoides solo se aplicó a las soluciones modelo con β -CD. El contenido de flavonoides totales para los sistemas modelo se estimó con el rango de respuesta de la curva de Quercetina (concentraciones desde 0-60mg/l) y los datos se muestran en los gráficos 5 y 6.

Al analizar los resultados de flavonoides totales del sistema modelo de flavonoides de la lima (gráfico 5), se observa que el mayor contenido de flavonoides totales lo tiene la solución que solo contiene hesperidina a pH 5.5 y 25°C (barra II, control) y la solución que contiene eriocitrina a pH 5 y 25°C (barra II, control).

Las soluciones que contienen solo eriocitrina (gráfico 5, barra "I" control) a pH 5.5 no presentan diferencia significativa si se aumenta la temperatura, sin embargo si se cambia el pH a 5 hay un aumento significativo en el contenido de flavonoides sin importar la temperatura, este contenido aumenta mayormente al cambiar el pH de 5.5-5 a 25°C, esto podría deberse a que a pH 5.5 se favorece la auto-asociación de los flavonoides protegiéndose de los cambios de temperatura, sin embargo al variar el pH esta auto-asociación se debilita dejando a los flavonoides disponibles para reaccionar con los reactivos propios del método (Riou et al., 2002)

Al añadir β -CD a las soluciones con eriocitrina (barra "I" β -CD) hay una disminución significativa en el contenido de flavonoides totales sin importar pH ni temperatura, esta disminución es mayor para aquellas soluciones a pH 5.5 lo cual podría reflejar la presencia de asociación con el polisacárido lo cual provoca que haya menor cantidad de flavonoides libres para interactuar con los reactivos del método (Del Valle, 2004).

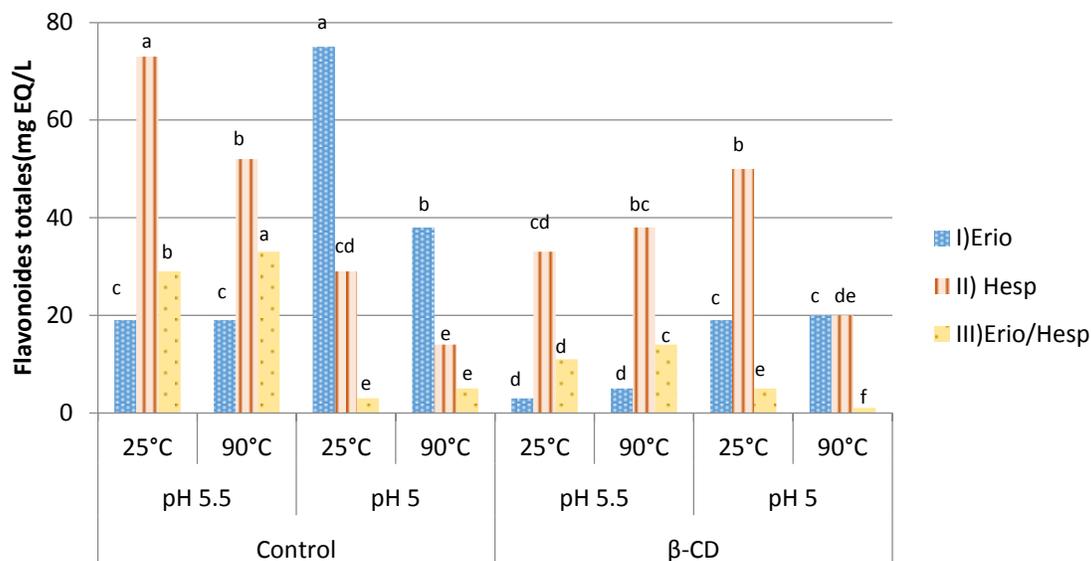


Gráfico 5. Flavonoides Totales, comparación entre eriocitrina (Erio), hesperidina (Hesp) y mezcla de flavonoides (Erio/Hesp) solos (control) y las soluciones con β-CD a pH 5.5 y 5, temperaturas 25 y 90°C (letras minúsculas iguales indican diferencia significativa para cada flavonoide entre los factores evaluados: pH, temperatura, contenido de polisacárido).

En aquellas soluciones que contienen solo hesperidina (gráfico 5, barra “II” control) hay una disminución significativa en el contenido de flavonoides totales al cambiar la temperatura de 25°C a 90°C y al cambiar el pH de 5.5 a 5, presentando los valores más bajos a pH 5 y 90°C en este caso también podría deberse a una auto-asociación, al estar presentes en una solución a pH 5.5 y 25°C la hesperidina está libre y no asociada entre ella debido a un impedimento estérico, los cambios de pH y temperatura evitarían este impedimento ayudando a que estos a auto-asociarse evitando que estén disponibles para interactuar con los reactivos del método y dando un menor contenido de flavonoides libres. En las soluciones que contienen hesperidina y β-CD (gráfico 5, barra “II” β-CD) en ambos niveles de pH y 90°C no hay diferencia significativa si se compara con las soluciones control, mientras que a pH 5 y 25°C se presenta una disminución significativa del contenido de flavonoides totales, este comportamiento podría deberse a que según lo propuesto por Pinho y col. 2014 quienes demostraron que a altas temperaturas la formación del complejo de inclusión es menos favorable (Pinho et. al., 2014).

En las soluciones que contienen la mezcla de flavonoides (gráfico 5, barra “III” control) hay una disminución del contenido de flavonoides totales al cambiar el pH de 5.5 a 5 sin

importar la temperatura, esta disminución es aún mayor al agregar la β -CD (gráfico 5, barra “III” β -CD), este comportamiento podría deberse a la aparición de ambos fenómenos, una auto-asociación y la interacción con el polisacárido.

Las soluciones del sistema modelo de naranja agria (gráfico 6) tienen un comportamiento similar a las de lima, resalta que en esta ocasión la solución con mayor contenido de flavonoides totales es la que contiene la mezcla de flavonoides. Aquellas soluciones que contienen solo naringina o neohesperidina (gráfico 6, barra I y II control) presentan un aumento significativo al cambiar el pH de 2.7 a 4 lo que se podría que se debilita la auto-asociación que podría generarse a pH 2.7, además podría deberse a la formación de un complejo estable entre flavonoide y tricloruro de aluminio que provoque una mayor señal, Young y col. en 2001 encuentran que a pH entre 4 y 6 la interacción con el AlCl_3 es estable.

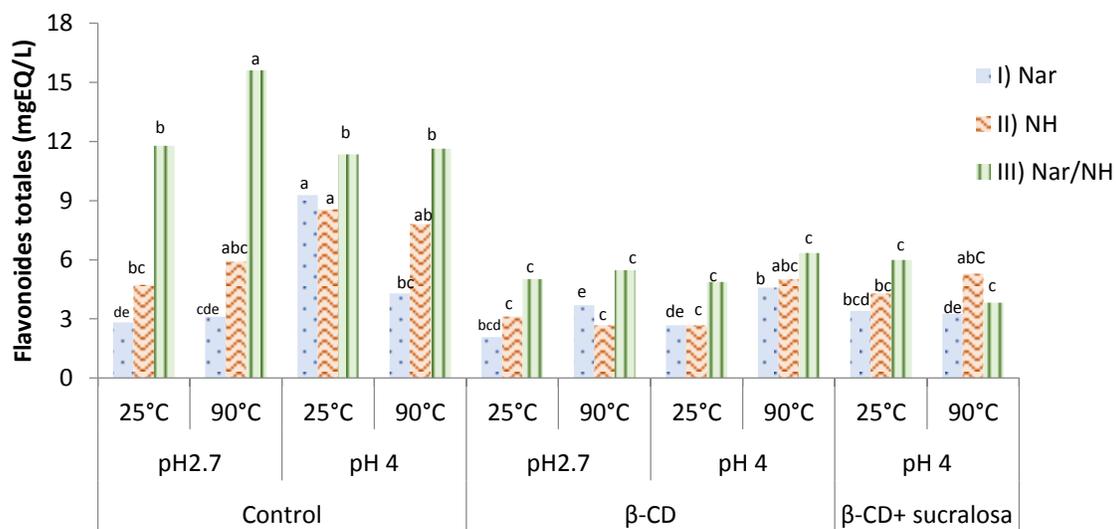


Gráfico 6. Flavonoides Totales, comparación entre naringina (Nar), neohesperidina (NH) y mezcla de flavonoides (Nar/NH) solos (control) y las soluciones con β -CD y β -CD con sucralosa a pH 2.7 y 4, temperaturas 25 y 90°C (letras minúsculas iguales indican diferencia significativa para cada flavonoide entre los factores evaluados: pH, temperatura, contenido de polisacárido).

En las soluciones que contienen naringina y β -CD (gráfico 6, barra “I” β -CD) hay una disminución significativa del contenido de flavonoides totales a pH 4 y 25°C si se compara con la solución control bajo las mismas condiciones de pH y temperatura, lo cual podría deberse a una interacción del flavonoide y la β -CD que lo protege de los cambios del

medio, este comportamiento se mantiene con aquellas soluciones que además de β -CD contienen sucralosa.

Las soluciones que contienen neohesperidina y β -CD (gráfico 6, barra “II” β -CD) se observa una disminución significativa de los flavonoides totales al agregar β -CD a pH4 sin importar la temperatura, de la misma manera este comportamiento se mantiene si se agrega sucralosa, Caccia y col (1998) encontraron que se forma un complejo de inclusión entre la CD y la neohesperidina (1:1) y coincide con lo reportado por Malpezi (2004), ellos además encontraron que el residuo glucosídico de la neohesperidina queda fuera de la cavidad de la CD, lo cual puede llevar a interacciones huésped-huésped dejando la neohesperidina protegida completamente.

Las soluciones que contienen solo la mezcla de flavonoides (gráfico 6, barra “III” control) a pH 2.7 aumentan el contenido de flavonoides totales si se cambia la temperatura a 90°C, sin embargo el contenido de flavonoides totales de estas soluciones no se ve afectado por cambiar el pH de 2.7 a 4, al agregar β -CD y/o sucralosa a las soluciones (gráfico 6, barra “II” β -CD y β -CD+ sucralosa) hay una disminución significativa del contenido de flavonoides, sin importar el pH o la temperatura, lo cual podría deberse a la protección que la β -CD hacia los flavonoides presentes en la solución, agregar sucralosa a la solución tiende a disminuir el contenido de flavonoides totales, esto podría deberse a que al encontrarse un edulcorante en el medio habrá una menor formación de puentes de hidrógeno entre el agua presente en la solución y la β -CD evitando que al calentarse se libere el flavonoide de la cavidad de la β -CD.

14.2.2 Capacidad anti-radical (DPPH) y concentración de flavonoides libres (HPLC)

El análisis estadístico del sistema modelo de lima mostró que el cambio de temperatura de 25°C a 90°C no tiene un efecto sobre la capacidad antirradical de las soluciones sin importar si estas contenían el polisacárido (anexo 5), el cambio de pH 5 a 5.5 provoca una disminución significativa de la capacidad anti-radical, esto podría deberse a que en pH 5.5 hay menor cantidad de hidronios disponibles para interactuar con los complejos de interacción dando una medición más acertada. El gráfico 7 se muestra los valores de capacidad anti-radical del sistema modelo de lima a 90°C.

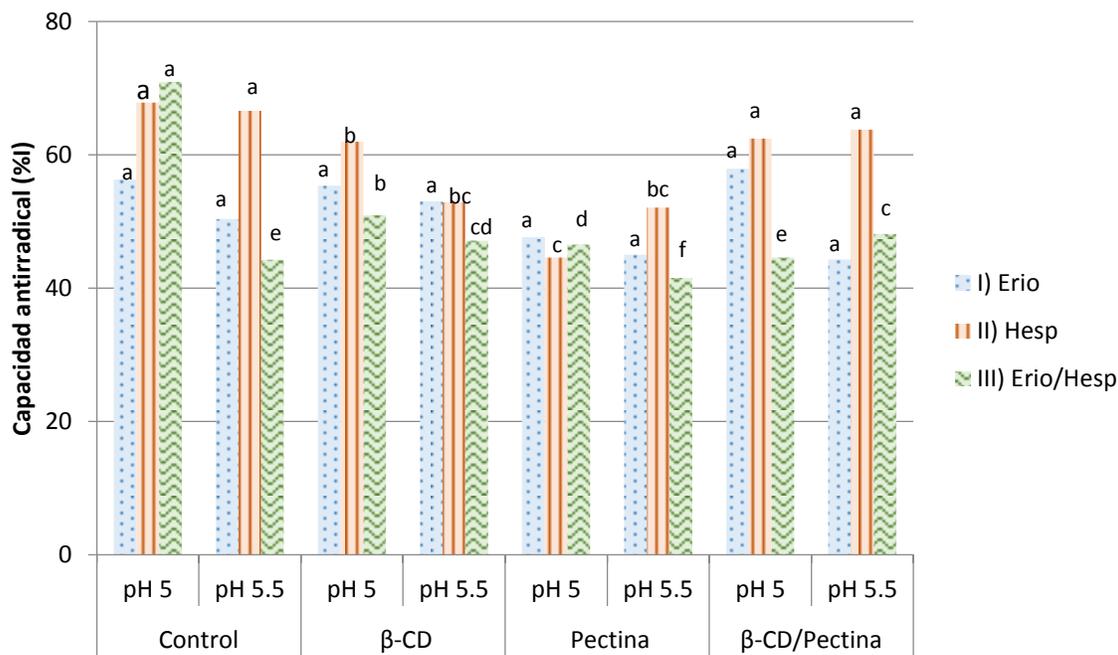


Gráfico 7. Capacidad anti-radical de algunas soluciones representativas del sistema modelo de lima: hesperidina (863 μmoles/L), eriocitrina (28.5 μmoles/L), hesperidina-eriocitrina (Hesp-Erio) a pH 5 y 5.6 90°C (letras minúsculas iguales indican diferencia significativa para cada flavonoide entre los factores evaluados: pH, temperatura, contenido de polisacárido).

En la primera parte del gráfico 7 se muestran las soluciones control, son aquellas que solo contienen el flavonoide, y se puede observar que la solución con mayor capacidad antioxidante es la hesperidina (barra “II” control) y la mezcla de flavonoides (barra “III” control), hay que resaltar que la concentración de eriocitrina (28.5 μM/L) es menor a la de

hesperidina (863 $\mu\text{M/L}$) y su capacidad antirradical no refleja esta diferencia en la concentración, la capacidad antirradical depende de la estructura específica de cada flavonoide particularmente de la posición y grado de hidroxilación, polaridad y solubilidad (Sroka et. al., 2005).

Las soluciones con eriocitrina (gráfico 7 barra “I”) no hay diferencia significativa al agregar un polisacárido o variar el pH sin embargo aquella solución que contiene pectina tiende a disminuir el %I si se compara con las soluciones que solo contienen el flavonoide, sin importar el pH al que se encuentren, este comportamiento se corrobora con la concentración de flavonoides libres encontrada en HPLC (tabla 7), la solución eriocitrina/pectina ($2.5 \pm 0.4 \text{ ppm}$) presenta una disminución significativa en comparación con la solución de eriocitrina control ($15 \pm 1 \text{ ppm}$), este comportamiento se debe a que la estructura de la pectina tiene la capacidad de formar cavidades hidrofóbicas, y debido a la relativa hidrofobicidad del flavonoide, éste entrará para interactuar con la pectina por medio de interacciones hidrofóbicas (Le Bourvellec y Renard 2005).

Tabla 7. Concentración de flavonoides libres (ppm) por HPLC en Sistema modelo de lima pH 5.5 temperatura 90°C

Polisacárido	Eriocitrina	Hesperidina	Mezcla	
			Eriocitrina	Hesperidina
Sin	15 ± 1.0^a	428.4 ± 1.1	15 ± 1.0	428.4 ± 1.1
Pectina	2.5 ± 0.4^b	90.1 ± 0.6	1.4 ± 0.04	271 ± 0.45
β -CD	4.7 ± 0.2^c	24.5 ± 0.01	0.6 ± 0.04	83.4 ± 6.1
β -CD/Pectina	0.5 ± 0.2^c	189 ± 46.5	0.1 ± 0.01	94.9 ± 0.1

En las soluciones que contienen hesperidina y polisacáridos (gráfico 7, barra “II”), no hay diferencia significativa entre las soluciones a las que se les adicionó β -CD y la mezcla de polisacáridos (β -CD-Pect) si se comparan con las soluciones control, la soluciones que contiene pectina a pH 5 disminuye significativamente el %I sin embargo este comportamiento no concuerda con la concentración de flavonoides libres mediante HPLC, en la tabla 7 se muestra que la solución con menor concentración de flavonoides libres es aquella que contiene β -CD, esto se explica con lo encontrado por Nguyen et al. (2013), al haber interacciones entre la β -CD y los flavonoides, los puentes de H^+ formados entre ellos harán que la transferencia de electrones sea más eficaz aumentando su capacidad

antioxidante, la diferencia entre ambos métodos pareciera obedecer a una interacción hesperidina/ β -CD (Nguyen et al. 2013), por lo tanto se cree que la interacción en este punto, se lleva a cabo por el residuo glucosídico de la hesperidina, pudiendo formar un complejo de inclusión 1:2 (Sameena y Enoch 2013).

Las soluciones con la mezcla de flavonoides (gráfico 7, barra “III”) a pH 5 disminuyen significativamente el %I al agregar cualquier polisacárido, siendo la solución que contiene β -CD y pectina la que más disminuye, los resultados concuerdan con la concentración de flavonoides libres reportada en la tabla 7, podría deberse a que están presentes ambos polisacáridos lo que favorecerá mayor interacción.

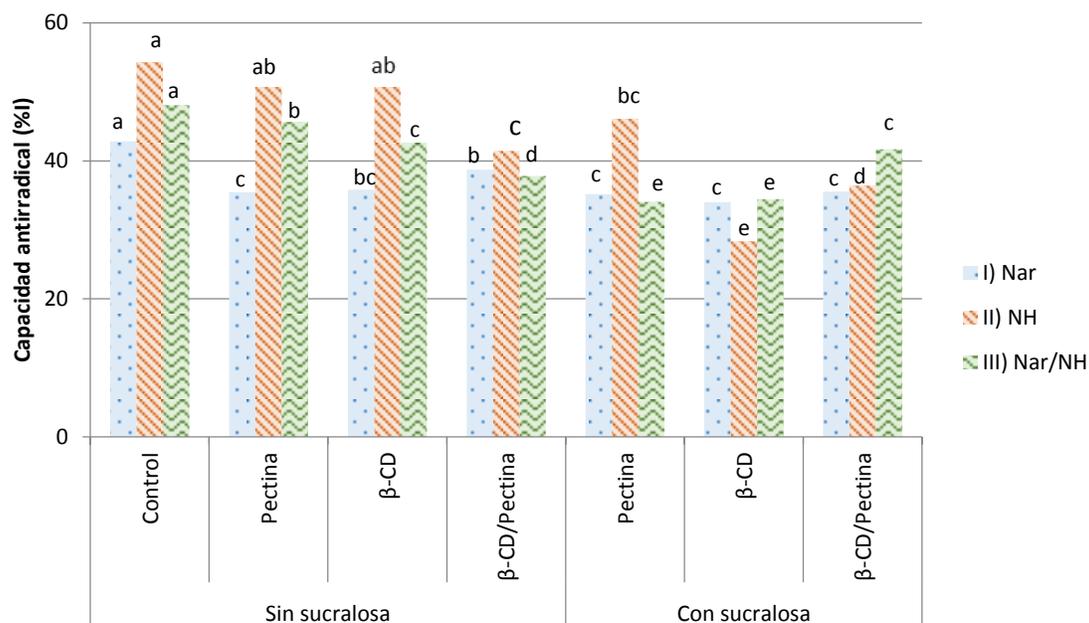


Gráfico 8. Capacidad antirradical del jugo fresco y algunas soluciones representativas del sistema modelo de naranja agria naringina (1145.5 μ moles/L), neohesperidina (822.1 μ moles/L), naringina-neohesperidina (Nar-NH) a pH 4 90°C (letras minúsculas iguales indican diferencia significativa para cada flavonoide entre los factores evaluados: pH, temperatura, contenido de polisacárido).

En el sistema modelo de naranja agria (gráfico 8), no hay diferencia significativa en el %I al variar el pH o la temperatura de las soluciones (anexo 6), por tanto en el gráfico 8 se presentaran las soluciones que simulan mayormente el jugo industrializado. En este caso la solución con mayor capacidad antirradical es la que contienen solo neohesperidina (NH), se relaciona con la estructura de los compuestos, en la cual la capacidad de atrapar especies

reactivas de oxígeno dependerá del grado de hidroxilación y la posición de los mismos en cada flavonoide (Sroka, Fecka y Cisowski 2005), ya que a diferencia de la neohesperidina contiene un grupo catecol que le da la capacidad de donar un electrón adicional al DPPH, lo cual provoca que su capacidad anti-radical sea más fuerte.

En las soluciones que contienen naringina (gráfico 8, barra “I” sin sucralosa) hay una disminución significativa en el %I al agregar cualquier polisacárido sin sucralosa, mientras que la solución Nar-β-CD/pectina (tabla 8) es aquella con la menor concentración de flavonoides libres, el mismo comportamiento se repite al agregar sucralosa (gráfico 8, barra “I” sin sucralosa y tabla 9) lo cual podría ser evidencia de la formación de un complejo de inclusión con el polisacárido, Liu et.al, 2013 encontró que la naringina formaba complejos de inclusión con la β-CD mediante el anillo “B”, lo cual dejaría el residuo glucosídico disponible para interactuar con la pectina, formando un complejo más estable a los cambios del medio (Liu et. al., 2013).

Tabla 8. Concentración de flavonoides libres (ppm) por HPLC en el sistema modelo de naranja agria, a pH4, temperatura 90°C y sin sucralosa

Polisacáridos	Naringina	Neohesperidina	Mezcla	
			Naringina	Neohesperidina
Sin	644.7± 0.76	468.8± 3.01	644.7± 0.76	468.8± 3.01
Pectina	318.7± 1.24	ND	68.4±0.88	330.2±0.26
β-CD	592.5± 1,59	ND	241.2±0.76	108±0.62
β-CD/Pectina	97.5± 0.05	ND	179.9±4.6	567±0.16

Las soluciones que contienen neohesperidina (NH) al agregar β-CD y pectina no tiene un efecto significativo en el %I (gráfico 8 barra “II” sin sucralosa), sin embargo la mezcla de polisacáridos (β-CD/Pectina) disminuye significativamente el %I si se compara con la solución control, Malpezzi et al. (2004) observaron la formación de complejo de inclusión de β-CD y neohesperidina dihidrochalcona, demostrando que el complejo de inclusión formado por la estructura base del flavonoide, dejando fuera el residuo glucosídico que podría interactuar con la pectina generando un complejo más estable, al agregar sucralosa a la solución con β-CD/pectina o β-CD (gráfico 8 barra “II” sucralosa), hay una disminución significativa en el %I si se compara con las soluciones sin sucralosa, estos resultados concuerdan con el contenido de flavonoides libres (tabla 9) siendo la solución que contiene β-CD y sucralosa la que más disminuye, Malpezzi también encontró que podrían formarse

interacciones huésped-huésped entre los residuos glucosídicos de los flavonoides ya incluidos en la β -CD (Malpezzi et. al., 2004)

Tabla 9. Concentración de flavonoides libres (ppm) por HPLC en el sistema modelo de naranja agria, pH4 temperatura 90°C con sucralosa

Polisacáridos	Naringina	Neohesperidina	Mezcla	
			Naringina	Neohesperidina
Sin *	644.7± 0.76	468.8± 3.01	644.7± 0.76	468.8± 3.01
Pectina	318.7±1.24	ND	411.1±150.5	416.1±182.4
β -CD	256.5±4.26	188.1±0.30	218.2±2.57	89.7±0.86
β -CD/Pectina	134.1±1.51	182.7±0.97	197.1±0.32	91.9±2.69

* La solución sin no contiene sucralosa

Aquellas soluciones que contienen la mezcla de flavonoides (gráfico 8 barra “III” sin sucralosa) disminuyen significativamente el %I si se agrega cualquier polisacárido, disminuyendo mayormente aquellas soluciones que contienen β -CD, estos resultados concuerdan con el contenido de flavonoides libres (tabla 8) y podría deberse a que en ambos casos hay una interacción β -CD/ flavonoides mediante la estructura base del mismo. Al agregar sucralosa a las soluciones que contiene polisacárido y la mezcla de los flavonoides (gráfico 8 barra “III” sucralosa) hay una disminución significativa en el %I, la mayor disminución es para la solución que contiene pectina, sin embargo estos resultados no concuerdan con la concentración de flavonoides libres, en este caso la solución con menor concentración de flavonoides es aquella en la que está presente la mezcla de polisacáridos (β -CD/pectina, según lo observado por Nguyen et al. (2013) los puentes de H^+ formados debido a la interacción β -CD/ flavonoides harán que la transferencia de electrones sea más eficaz aumentando su capacidad antioxidante, además podría ser debido a la capacidad de la β -CD para mover agua (deshidratación), haciendo que la pectina formara redes que producían una interacción más estable (Basu et. al., 2013).

Una vez analizados los resultados fisicoquímicos se seleccionaron las soluciones a utilizar para probar el papel de la disponibilidad de flavonoides en el efecto biológico reportado para ellos. La selección se basó en la disponibilidad de los flavonoides dentro de la matriz y por lo tanto, en el nivel de interacción presente en las soluciones (una menor disponibilidad indica una mayor interacción y viceversa).

Menos interacciones/ mayor disponibilidad:

- Hesperidina/ eriocitrina pectina (Hesp/erioc pec) en el sistema modelo de lima
- Naringina/ neohesperidina ciclodextrina (N/NH β -CD) en el sistema modelo de naranja agria
- Jugo fresco de lima
- Jugo fresco de naranja agria

Más interacciones/ menos disponibilidad:

- Hesperidina/ eriocitrina β -CD (Hesp/erioc β -CD) en el sistema modelo de lima.
- Naringina/ neohesperidina β -CD sucralosa (N/NH β -CD sucralosa) en el sistema modelo de naranja agria.
- Jugo de lima adicionado con β -CD.
- Jugo de naranja agria adicionado con β -CD.

14.3 Evaluación y comparación de los parámetros biológicos (capacidad hipoglucemiantes e hipocolesterolémico) de los sistemas modelo, el jugo fresco y el jugo a base de lima o la naranja agria modificado, *in vivo* (modelo animal).

14.3.1 Efecto hipoglucemiante

En el gráfico 9 se muestra el incremento en los niveles de glucosa de los grupos de ratones a los que se les administraron las soluciones modelo seleccionada en el capítulo anterior. En la primera barra se muestra el comportamiento del grupo control al que solo se le administró maltosa y agua (barra “a”), seguido por el grupo control al que se le administro maltosa y acarbosa (barra “b”) que, como ya se mencionó, es un medicamento utilizado para inhibir la α -glucosidasa que evita la descomposición y absorción de los carbohidratos provenientes de la dieta, las siguientes barras representan los grupos a los que se les administró las soluciones modelo de mayor y menor disponibilidad de flavonoides del sistema modelo de lima (barras “c y d”) seguidas por las soluciones del sistema modelo de naranja agria en el mismo orden (barras “e y f”). Al comparar el grupo control (maltosa barra “a”) contra los grupos suministrados con las soluciones modelo, se puede observar un tendencia a disminuir los niveles de glucosa en sangre en algunos grupos de ratones (excepto hesp/erioc pec), esto se puede deber a que se ha demostrado que la hesperidina y la naringina tienen la capacidad de disminuir la hiperglicemia, mediante el control en la actividad de algunas enzimas (Mahmoud et al. 2012; Zhang et al. 2012; Unnikrishnan et al. 2014).

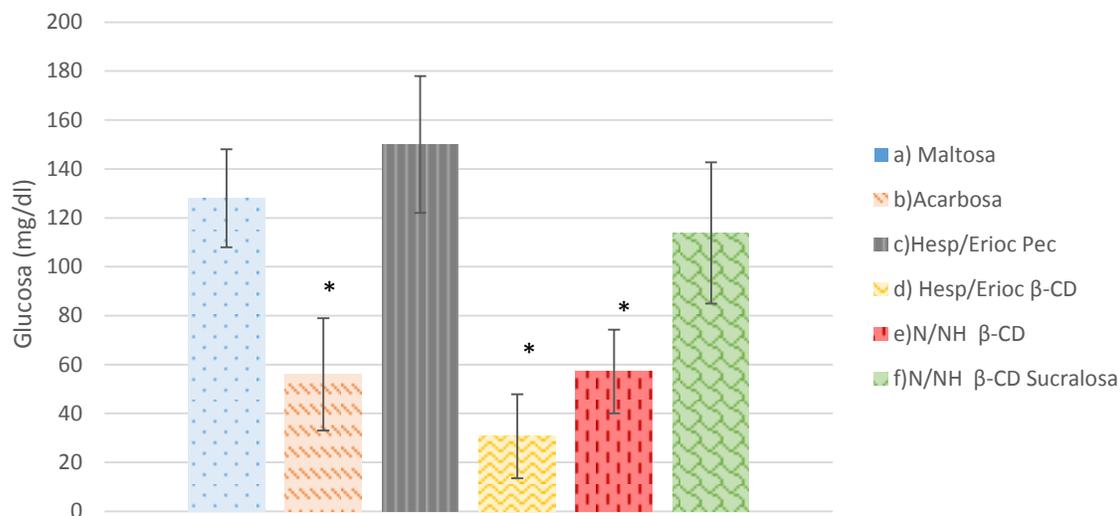


Gráfico 9. Incremento de la glucosa de grupos de ratones administrados con las soluciones de mayor disponibilidad de flavonoides (Hesp/Erioc Pec y NH/N β-CD) así como las soluciones de menor disponibilidad de flavonoides (Hesp/Erioc CD y NH/N CD sucralosa) de los sistemas modelo de lima y naranja agria (* valores $p < 0.005$ en comparación con grupo control)

El análisis estadístico del gráfico 9 demostró que no hay diferencia significativa con el grupo de ratones suministrados con la solución de mayor disponibilidad del sistema modelo de lima (Hesp/Erioc Pec) y el grupo control, mientras que al grupo que se le administró la solución de menor disponibilidad (Hesp/Erioc β-CD) presenta una diferencia significativa y su comportamiento es similar al grupo administrado con acarbosa ya que al comparar estos dos grupos no hay diferencias significativas, esto debido a su biodisponibilidad, una suposición sería que el flavonoide fue liberado de la β-CD por enzimas del intestino delgado y deglucosilado en el tracto intestinal para llegar al colon como aglicona y poder suprimir la actividad de enzimas como la α-glucosidasa (Saura-Calixto, Serrano y Goñi 2007; Unnikrishnan et al. 2014).

En la comparación de los grupos suministrados con las soluciones modelo de naranja agria contra el grupo control administrado solo con maltosa y agua (grafico 9, barras “a, e y f”), el comportamiento es contrario al observado en los grupos a los que se les administraron las soluciones modelo de lima. En este caso el grupo que consumió la solución con mayor disponibilidad de flavonoides (NH/N β-CD, barra “e”) es en la que se observa una disminución significativa al compararla con el grupo que consumió maltosa (barra ”a”) y

no muestra una diferencia significativa con el grupo administrado con acarbosa (barra “b”), mientras que el grupo de menor disponibilidad de flavonoides no disminuye de manera significativa los niveles de glucosa (barra “f”), probablemente gracias a que se logra una protección eficiente del flavonoide por la matriz de polisacáridos, de la cual no se logra liberar el flavonoide para que éste sea biodisponible en el intestino grueso y lleve a cabo su correspondiente efecto biológico. Algunos autores han demostrado la importancia de la estructura de cada flavonoide en el reconocimiento enzimático y la actividad de las mismas, lo que puede impactar en la actividad hipoglucemiante (Unnikrishnan et al. 2014; Zhang et al. 2012). Se cree que la presencia de grupos hidroxilo en la estructura base del flavonoide es importante para la capacidad inhibitoria de las enzimas por tanto, la unión y extremada protección de los flavonoides evita que estos grupos hidroxilo estén disponibles para desencadenar la actividad inhibitoria de las enzimas provocando el grupo de ratones administrados con la solución de menor disponibilidad presente el menor efecto en los niveles de glucosa en sangre (Gao et al. 2004; Zhang et al. 2012).

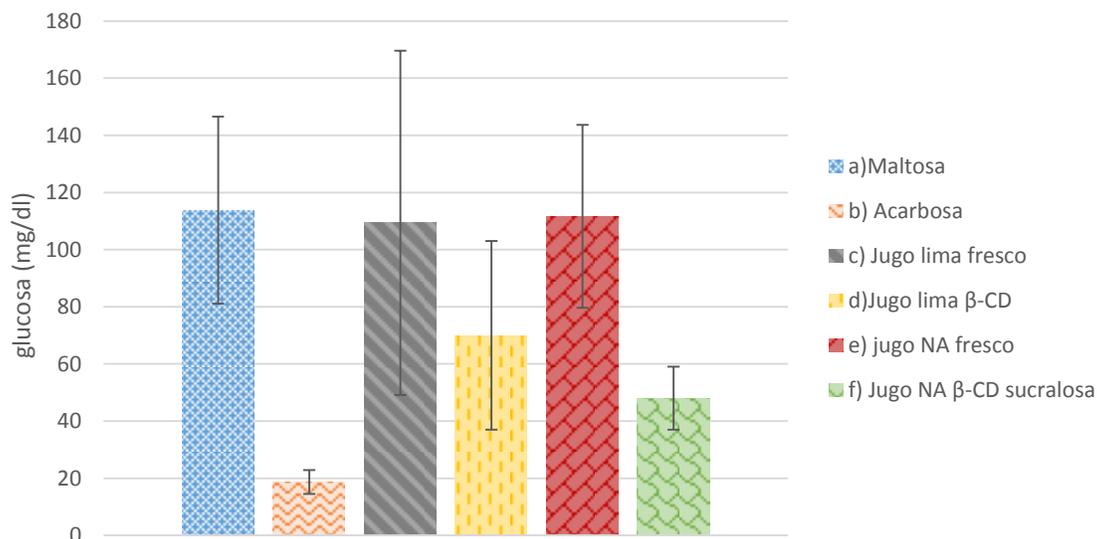


Gráfico 10. Incremento en la glucosa de grupos de ratones administrados con los jugos frescos y las formulas seleccionadas de lima (β -Ciclodextrina, pasteurizado a 90°C) y naranja agria (β -CD sucralosa, pasteurizado a 90°C) (* valores $p < 0.005$ en comparación con grupo control)

En el grafico 10 se muestra el incremento de glucosa en los grupos de ratones administrados con los jugos frescos y las formulas seleccionadas. En la barra “a” se muestra el comportamiento del grupo control al que solo se le administró maltosa y agua,

seguido por el grupo control al que se le administró maltosa y acarbosa (barra “b”), las barras posteriores muestran el jugo de lima fresco y la formula seleccionada (barras: “c y d”) seguido del jugo de naranja agria en el mismo orden (barras: “e y f”).

Al realizar una comparación entre el grupo control al que se le administro agua y maltosa (barra “a”) con los grupos administrados con los jugos de lima no se presentó una diferencia significativa (barra “c y d”), sin embargo, se observa una tendencia a disminuir los niveles de glucosa al agregar β -CD a la formulación, lo cual concuerda con lo observado en las soluciones modelo, Kundusen et al. (2011) quienes demostraron que el extracto de cáscara de lima en una concentración desde 200 a 400mg/kg tiene un efecto hipoglucemiante en ratones sanos, se cree que este efecto podría ser debido a la regulación hepática de glucosa (Kundusen et al. 2011), otro estudio realizado por Padilla et al. (2014) se demuestra que la lima (*Citrus limetta*) tiene potencial para fungir como inhibidor de α -amilasa y α -glucosidasa que inhiben la absorción de carbohidratos procedentes de la dieta, además proponen que la actividad inhibitoria depende de la concentración de polifenoles presentes en el extracto (Padilla-Camberos et al. 2014). Ambos estudios fueron realizados con los polifenoles provenientes de la cáscara de lima, sin embargo, el jugo de lima tiene un menor contenido de flavonoides (Barreca et al. 2011b), debido a esto, el efecto hipoglucemiante no es tan marcado como en el caso de los estudios realizados con la cáscara del mismo fruto.

En el caso de los grupos administrados con jugo de naranja agria, consumir jugo fresco, bajo las condiciones del estudio, no tiene un efecto en los niveles de glucosa en sangre (gráfico 10, barra “e”), estos resultados concuerdan con lo encontrado por Figueroa et al. (2009) en el que se observó que al administrar extractos de naranja agria, hay una variación en los niveles de glucosa sin llegar a normalizarlos (Figueroa-Valverde et al. 2009). El consumo del jugo de naranja agria con la fórmula seleccionada (naranja agria β -CD y sucralosa) disminuye los niveles de glucosas en sangre de los ratones de manera significativa. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Sharma et al. (2008) a pesar de no ser la misma muestra ni la misma metodología, estos investigadores administraron 500mg/kg de un extracto de flavonoides procedentes de la cáscara de naranja agria y demostraron una disminución significativa de los niveles de glucosa en ratones

sanos (Sharma et al. 2008), sin embargo, los resultados no concuerdan con lo encontrado en el experimento con las soluciones modelo, en el cual pareciera que la solución que contiene β -CD y sucralosa no disminuye los niveles de glucosa (grafico 10), se cree que la diferencia presentada al realizar la formulación del jugo se debe a la complejidad de la matriz alimentaria, es decir la β -CD y la sucralosa podrían estar interactuando con otros ingredientes de la matriz dejando más susceptibles a los flavonoides para la degradación en el tracto gastrointestinal, pudiendo de esta manera, estar biodisponibles en la barrera intestinal para llevar a cabo su función.

14.3.2 Efecto hipocolesterolémico

La regulación de la glucosa que ejercen los flavonoides está estrechamente ligada con una regulación del perfil lipídico, por lo tanto, en este proyecto también se estudió la capacidad hipocolesterolémica de los flavonoides seleccionados y los jugos. En el grafico 11 se muestra el cambio en el nivel de colesterol en la sangre de los grupos de ratones a los que se les administraron las soluciones modelo.

En la primera barra se muestra el grupo al que solo se le administró agua y tiloxapol (barra “a”), que es un detergente no iónico que inhibe la actividad de la enzima lipoproteína-lipasa (Ramchoun et al. 2012) causando una hiperglicemia aguda, seguido de los grupos que consumieron las soluciones modelo de lima y naranja agria. En este caso no se presentan los resultados de la atorvastatina (control positivo) debido a que la dosis empleada no generó una disminución significativa en los niveles de colesterol de los ratones a los que se les administró este medicamento.

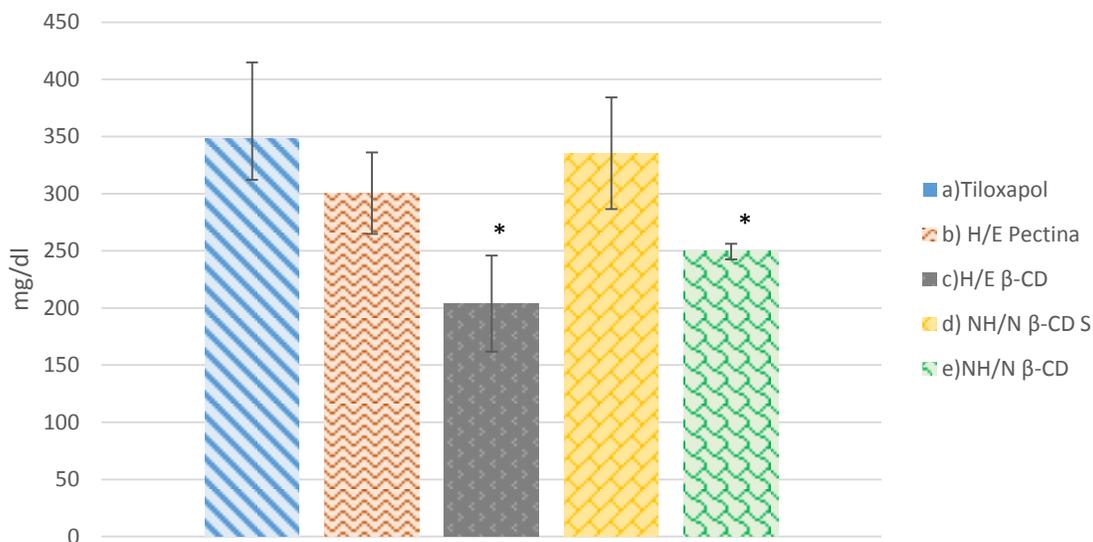


Gráfico 11. Incremento en el colesterol de grupos de ratones administrados con las soluciones de mayor disponibilidad de flavonoides (Hesp/Erio Pec y NH/N β -CD) así como las soluciones de menor disponibilidad de flavonoides (Hesp/Erio β -CD y NH/N β -CD sucralosa) de los sistemas modelo de lima y naranja agria (* valores $p < 0.005$ en comparación con grupo control tiloxapol).

Al analizar los resultados obtenidos se aprecia una tendencia a disminuir los niveles de colesterol en sangre de todos los grupos a los que se les administraron las soluciones modelo si se compara con el grupo de ratones que solo consumió tiloxapol (grafico 11). Esto demuestra, al igual que en el caso de la glucosa, que la hesperidina y la naringina tienen efecto en el perfil lipídico. Estos compuestos regulan la actividad de receptores nucleares llamados PPAR, reducen la actividad de enzimas que están involucradas en el metabolismo de colesterol como las Acil-coA transferasas (ACATs) en especial la 3-hidroxi-3metilglutaril CoA (HMGCoA), inhiben la peroxidación lipídica, y aumentan el catabolismo de la fracción LDL que se considera el “colesterol malo”, aumentan los niveles de HDL o “colesterol bueno” (Wilcox, Borradaile y Huff 2006; Jeon et al. 2001; Kim et al. 2003; Roohbakhsh et al. 2015).

En el sistema modelo de lima el grupo que fue administrado con la solución con mayor disponibilidad de flavonoides, es decir, la de menor interacción (Hesp/Erio Pec) no mostró una diferencia significativa en relación con el grupo control (gráfico 11, barra “a y b”), sin embargo, se observa una tendencia a disminuir los valores de colesterol. El grupo administrado con las soluciones de menor disponibilidad (Hesp/Erio β -CD) disminuye significativamente los niveles de colesterol (barra “c”), esto se debe, como en el caso de la

prueba de glucosa postprandial, a la disponibilidad de los flavonoides, en el estómago estos compuestos son expuestos a condiciones ácidas que pueden desestabilizar las interacciones con los polisacáridos para que los flavonoides puedan ser liberados y deglucosilados en el intestino delgado (Lewandowska et al. 2013) y, como en el caso de la hesperetina tener la oportunidad de traspasar la barrera epitelial mediante difusión pasiva y así llevar a cabo su función biológica (Ziberna et al. 2014). Se ha demostrado que la hesperetina inhibe la enzima hepática HMG-CoA y ACAT reduciendo la producción hepática de apoB contenido en las lipoproteínas (Kim et al. 2003).

En el sistema modelo de naranja agria el comportamiento fue el contrario, el grupo de ratones administrados con solución de mayor interacción, es decir, menor contenido de flavonoides libre, no mostró una disminución en los niveles de colesterol en sangre (gráfico 11, barra “d”), mientras que los grupos que consumieron la solución con menor disponibilidad presenta una disminución significativa (gráfico 11, barra “e”), este comportamiento es similar al encontrado en la prueba hipoglucemiante y se ha demostrado que la formación de complejos flavonoides- β -CD puede aumentar la biodisponibilidad de estos compuestos, además de que puede servir como acarreador para que el efecto biológico se lleve a cabo (Lucas-Abellán et al. 2007), la β -CD al ser un polisacárido cíclico derivado de la degradación del almidón no es digerible por lo que se ha demostrado que puede formar un complejo de inclusión con el colesterol, disminuyen su absorción intestinal y aumenta su secreción en las heces por lo tanto al debilitarse las interacciones fisicoquímicas con los flavonoides y romper el complejo flavonoide- β -CD la cavidad de la ciclodextrina queda libre para interactuar con el colesterol presente en el intestino (Trautwein et al. 1999), al agregar un edulcorante (sucralosa) la interacción se vuelve tan fuerte que a pesar de pasar por las condiciones ácidas del estómago, la liberación no es tan efectiva como aquella solución que solo contiene β -CD reduciendo así la biodisponibilidad del flavonoide y por lo tanto, su efecto biológico.

El gráfico 12 muestra los niveles de colesterol obtenidos al administrar los jugos frescos y las fórmulas seleccionadas a los grupos de ratones, en la primera columna (barra “a”) como en los demás casos se muestran los resultados del grupo control que fue administrado con

agua y tiloxapol, seguido de los grupos que consumieron jugo de lima (barra “b y c”) y naranja agria (barra “d y e”).

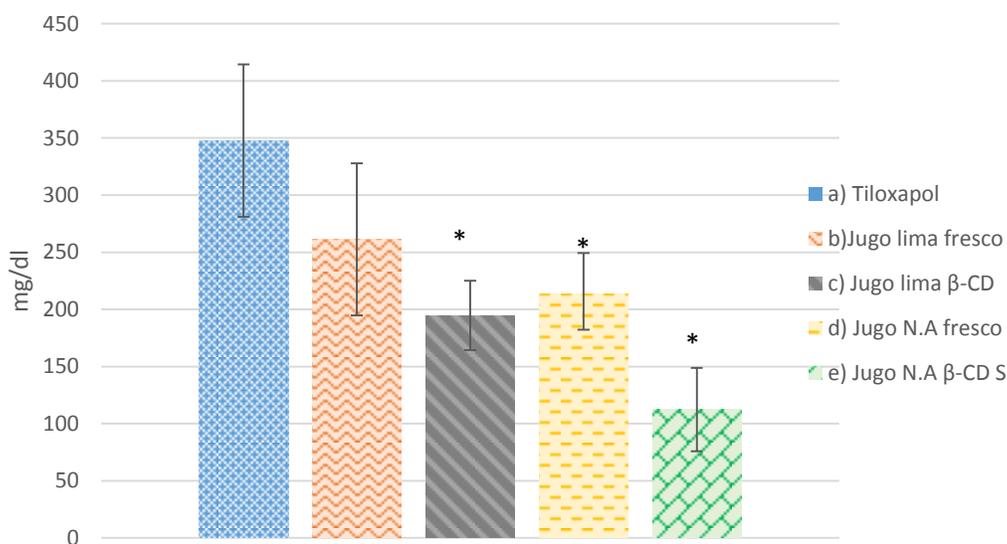


Gráfico 12. Cambio en los niveles de colesterol de los grupos de ratones administrados con los jugos frescos y las formulas seleccionadas de lima (β -CD, pasteurizado a 90°C) y naranja agria (β -CD y sucralosa, pasteurizado a 90°C) (* valores $p < 0.005$ en comparación con grupo control tiloxapol).

En los resultados obtenidos de los grupos que consumieron el jugo de lima, se observa una tendencia a disminuir los niveles de colesterol del grupo administrado con jugo fresco (gráfico 12, barra “b”) mientras que el grupo que consumió jugo con β -CD disminuyó significativamente estos nivel (barra “c”), esta observación concuerda con lo encontrado en el sistema modelo, por lo tanto, se podría suponer que este efecto se debe a la presencia de flavonoides, se ha demostrado que la presencia de flavonoides cítricos como hesperidina disminuye los niveles de colesterol (Jung et al. 2006), además se cree que la presencia de compuestos que se encuentran dentro de la matriz del jugo como la pectina, disminuye los niveles de colesterol en ratas (Krzysik et al. 2011), también se ha demostrado como ya se había mencionado que la β -CD puede formar complejos de inclusión con el colesterol promoviendo de esta manera una disminución de los niveles presentados en los ratones (Trautwein et al. 1999).

En el caso de los grupos administrados con los jugos de naranja agria, hay una disminución significativa en los niveles de colesterol al compararlos con el grupo control (gráfico 12, barra “a, d y e”), sin importar el tipo de jugo. Sharma et al. (2008) demostró que al

administrar extractos etanólicos de cáscara de naranja agria hay disminución de los niveles de colesterol en ratones con diabetes inducida, esto se podría deber a una estimulación de las células β -pancreáticas que estimulan la secreción de insulina, la insulina estimulará la biosíntesis de ácidos grasos, además de la incorporación de ácidos grasos a triglicéridos en el hígado y las células (Sharma, Manoj et al. 2008)

Los ratones que consumieron el jugo que contiene β -CD y sucralosa disminuye estos niveles de colesterol en mayor proporción que el jugo fresco, esto podría deberse como en el caso del efecto hipoglucemiante, a la disponibilidad de los compuestos biológicamente activos y a la complejidad de compuestos presentes en la matriz alimentaria que interactúan no solo con los flavonoides, sino también con otros compuestos presentes en la matriz dejando mayormente disponibles a los flavonoides.

15. Conclusiones

Se demostró la presencia de interacciones fisicoquímicas entre los flavonoides y los polisacáridos pectina y β -CD presentes en las formulas seleccionadas para jugos de naranja agria y lima mediante una disminución en las variables de respuesta (flavonoides totales, %I del radical DPPH, concentración de flavonoides libres por HPLC). Estas interacciones pueden involucrar puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas.

La utilización de sistemas modelo ayudó a observar las interacciones específicas, flavonoide-polisacárido y a suponer los mecanismo de unión de los distintos flavonoides utilizados. Las interacciones dependerán del tipo de flavonoides y el polisacárido al que se unan, eriocitrina y naringina interactúan en mayor proporción con la pectina mientras que hesperidina y neohesperidina con la β -CD, este comportamiento se debe a la estructura de cada flavonoide.

Estas interacciones afectan directamente en la disponibilidad y accesibilidad de los compuestos estudiados, tanto en las soluciones modelo, como dentro de la matriz compleja. De esta manera se comprueba que, el efecto biológico se ve influenciado por la disponibilidad de los compuestos. Se requiere una interacción que proteja al flavonoide de manera que pueda ser liberado en el intestino grueso, sin embargo, demasiada protección obstruye la liberación del flavonoide evitando que lleve a cabo su efecto hipoglucemiante e hipocolesterolémico.

En los jugos, el tratamiento térmico afecta la capacidad anti-radical, adicionar β -CD parece proporcionar estabilidad a la bebida al someterla a pasteurización, además de ayudar a llevar a cabo un mejor efecto biológico (hipoglucemiante e hipocolesterolémico) que los jugos frescos.

Por todo lo anterior, el diseño de un alimento funcional requiere considerar factores como tipo de compuestos bioactivos presentes en la matriz alimentaria, las interacciones entre estos compuestos y la matriz alimentaria así como las condiciones de procesamiento a los que estos productos serán sometidos, aun cuando sean un simple jugo pasteurizado.

16. Recomendaciones futuras

Llevar a cabo estudios con algunos otros componentes de la matriz celular, utilizando como estrategia sistemas modelo, quizá utilizando otros polisacáridos usados en la industria como almidón o celulosa y otros flavonoides.

Adicional a lo planteado en este estudio, se podrían utilizar métodos directos para medir las interacciones que se determinaron de manera indirecta en este estudio, mediante laser pulsado, microscopio de fuerza atómica entre otras técnicas, esto debería hacerse sin variar los parámetros utilizados en esta ocasión.

Seguir con la formulación de los jugos industrializados llevando a cabo evaluaciones sensoriales para buscar un producto apto para el consumo.

La parte biológica del presente trabajo se realizó en un tiempo relativamente corto (30min efecto hipoglucemiante y 24hrs efecto hipocolesterolémico), pero un alimento funcional se ingiere durante mayor tiempo en la vida de un ser humano, por lo tanto sería necesario realizar pruebas de mayor duración primero en animales y después con seres humanos sanos para ver el impacto real del producto en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas.

Realizar pruebas biológicas de las matrices utilizadas en este proyecto con modelos animales enfermos de diabetes mellitus tipo 2 para ver el comportamiento de las soluciones en un metabolismo en déficit debido a una enfermedad crónico degenerativa.

17. Bibliografía

- ABAD-GARCÍA, B., BERRUETA, L. a, GARMÓN-LOBATO, S., URKAREGI, A., GALLO, B. y VICENTE, F., 2012. Chemometric characterization of fruit juices from Spanish cultivars according to their phenolic compound contents: I. Citrus fruits. *Journal of agricultural and food chemistry* [en línea], vol. 60, no. 14, pp. 3635-44. ISSN 1520-5118. DOI 10.1021/jf300022u. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22423971>.
- ABRAMOVIČ, H., JAMNIK, M., BURKAN, L. y KAČ, M., 2008. Water activity and water content in Slovenian honeys. *Food Control* [en línea], vol. 19, no. 11, pp. 1086-1090. [Consulta: 1 diciembre 2012]. ISSN 09567135. DOI 10.1016/j.foodcont.2007.11.008. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713507002587>.
- AHMED, M., AKTER, M.S., LEE, J.-C. y EUN, J.-B., 2010. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT - Food Science and Technology* [en línea], vol. 43, no. 9, pp. 1307-1312. [Consulta: 26 octubre 2012]. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2010.05.014. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643810001805>.
- AKIYAMA, S., KATSUMATA, S., SUZUKI, K., NAKAYA, Y., ISHIMI, Y. y UEHARA, M., 2009. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of hesperidin and cyclodextrin-clathrated hesperetin in Goto-Kakizaki rats with type 2 diabetes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 73, no. 12, pp. 2779-2782. ISSN 0916-8451. DOI 10.1271/bbb.90576.
- ALVAREZ-PARRILLA, E., DE LA ROSA, L. y RODRIGO-GARCIA, J., 2005. Aplicaciones de las ciclodextrinas en alimentos. En: G. GONZALEZ-AGUILAR, A. GARDEA y F. CUAMEA-NAVARRO (eds.), *Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados*. Hermosillo, Mexico: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C, pp. 359-376.
- ASTRAY, G., GONZALEZ-BARREIRO, C., MEJUTO, J.C., RIAL-OTERO, R. y SIMAL-GÁNDARA, J., 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids* [en línea], vol. 23, no. 7, pp. 1631-1640. [Consulta: 17 diciembre 2013]. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2009.01.001. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X09000022>.
- BARRECA, D., BELLOCCO, E., CARISTI, C., LEUZZI, U. y GATTUSO, G., 2011a. Distribution of C- and O-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl)glycosyl flavanones and furocoumarins in *Citrus aurantium* L. juice. *Food Chemistry* [en línea], vol. 124, no. 2, pp. 576-582. [Consulta: 8 enero 2014]. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2010.06.076. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610007879>.
- BARRECA, D., BELLOCCO, E., CARISTI, C., LEUZZI, U. y GATTUSO, G., 2011b. Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterranean sweet lemon (*Citrus limetta* Risso) juice. *Food Chemistry* [en línea], vol. 129, no. 2, pp. 417-422. [Consulta: 8 enero 2014]. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.04.093. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611006595>.
- BASU, S., SHIVHARE, U.S. y SINGH, T.V., 2013. Effect of substitution of stevioside and sucralose on rheological, spectral, color and microstructural characteristics of mango jam. *Journal of Food Engineering* [en línea], vol. 114, no. 4, pp. 465-476. [Consulta: 27 marzo 2014]. ISSN 02608774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2012.08.035. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877412004189>.
- BUCHWEITZ, M., SPETH, M., KAMMERER, D.R. y CARLE, R., 2013. Impact of pectin type on the storage stability of black currant (*Ribes nigrum* L.) anthocyanins in pectic model solutions. *Food chemistry* [en línea], vol. 139, no. 1-4, pp. 1168-78. [Consulta: 27 marzo 2014]. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.02.005. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23561223>.

- CACCIA, F., DISPENZA, R., FRONZA, G., FUGANTI, C., MALPEZZI, L., CNR, C. y NATURALI, S.O., 1998. Structure of Neohesperidin Dihydrochalcone / -Cyclodextrin Inclusion Complex : NMR , MS , and X-ray Spectroscopic Investigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 8561, no. 97, pp. 1500-1505.
- CALGAROTTO, A.K., MIOTTO, S., HONÓRIO, K.M., DA SILVA, A.B.F., MARANGONI, S., SILVA, J.L., COMAR, M., OLIVEIRA, K.M.T. y DA SILVA, S.L., 2007. A multivariate study on flavonoid compounds scavenging the peroxynitrite free radical. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* [en línea], vol. 808, no. 1-3, pp. 25-33. [Consulta: 30 abril 2013]. ISSN 01661280. DOI 10.1016/j.theochem.2006.12.031. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166128006008530>.
- CASABÓ I GISPERT, J., 2007. Sólidos moleculares. *Estructura atómica y enlace químico*. Barcelona: Reverté, pp. 348-350. ISBN 9788429171891.
- CHAKRABARTI, S., 2006. Probing Ingredient Functionalities in Food Systems Using Rheological Methods. En: A. GAONKAR y A. MCPHERSON (eds.), *INGREDIENT INTERACTIONS Effects on food quality*. 2. USA: Taylor and Francis, pp. 50-52. ISBN 987-0-8247-5748-9.
- CHI-TANG, H., MOHAMED, R. y GEETHA, G., 2008. Bioactive Substances: Nutraceutical and Toxicants. En: O. FENNEMA, D. SRINIVASAN y P. KIRK (eds.), *Food Chemistry*. 4. Boca Raton: CRC Press, pp. 751-780. ISBN 9780849392726.
- CONTRERAS, R., 1994. De los átomos a las moléculas. En: A. GARRITZ y C. J.A (eds.), *Química*. S.l.: Adison-Wesley Iberoamericana, pp. 460-461. ISBN 0201625660.
- DE RIJKE, E., OUT, P., NIESSEN, W.M. a, ARIESE, F., GOOIJER, C. y BRINKMAN, U. a T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of chromatography. A* [en línea], vol. 1112, no. 1-2, pp. 31-63. [Consulta: 15 diciembre 2013]. ISSN 0021-9673. DOI 10.1016/j.chroma.2006.01.019. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16480997>.
- DEL CARO, A., PIGA, A., VACCA, V. y AGABBIO, M., 2004. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry* [en línea], vol. 84, no. 1, pp. 99-105. [Consulta: 8 enero 2014]. ISSN 03088146. DOI 10.1016/S0308-8146(03)00180-8. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814603001808>.
- DEL TORO-SÁNCHEZ, C.L., AYALA-ZAVALA, J.F., MACHI, L., SANTACRUZ, H., VILLEGAS-OCHOA, M. a., ALVAREZ-PARRILLA, E. y GONZÁLEZ-AGUILAR, G. a., 2010. Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β -cyclodextrin capsules. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* [en línea], vol. 67, no. 3-4, pp. 431-441. [Consulta: 11 septiembre 2014]. ISSN 0923-0750. DOI 10.1007/s10847-009-9726-3. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10847-009-9726-3>.
- DEL VALLE, E.M.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* [en línea], vol. 39, no. 9, pp. 1033-1046. [Consulta: 23 diciembre 2013]. ISSN 13595113. DOI 10.1016/S0032-9592(03)00258-9. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959203002589>.
- DEROSA, G. y MAFFIOLI, P., 2012. Efficacy and Safety Profile Evaluation of Acarbose Alone and in Association With Other Antidiabetic Drugs: A Systematic Review. *Clinical Therapeutics* [en línea], vol. 34, no. 6, pp. 1221-1236. ISSN 01492918. DOI 10.1016/j.clinthera.2012.04.012. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2012.04.012>.
- DIAS, K., NIKOLAOU, S. y DE GIOVANI, W.F., 2008. Synthesis and spectral investigation of Al(III) catechin/ β -cyclodextrin and Al(III) quercetin/ β -cyclodextrin inclusion compounds. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* [en línea], vol. 70, no. 1, pp. 154-61. [Consulta: 24 diciembre 2012]. ISSN 1386-1425. DOI 10.1016/j.saa.2007.07.022. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054838>.
- ESTÉVEZ, M., VENTANAS, S., HEINONEN, M. y PUOLANNE, E., 2011. Protein Carbonylation and Water-Holding Capacity of Pork Subjected to Frozen Storage : Effect of Muscle Type , Premincing , and Packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 10, pp. 5435-5443.

- FANG, Z. y BHANDARI, B., 2010. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology* [en línea], vol. 21, no. 10, pp. 510-523. [Consulta: 27 octubre 2012]. ISSN 09242244. DOI 10.1016/j.tifs.2010.08.003. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224410001925>.
- FENNEMA, O., 2008. *Food Chemistry*. 2. S.I.: Acribia. S.A.
- FERNANDES, A., IVANOVA, G., BRÁS, N.F., MATEUS, N., RAMOS, M.J., RANGEL, M. y DE FREITAS, V., 2014. Structural characterization of inclusion complexes between cyanidin-3-O-glucoside and β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers* [en línea], vol. 102, pp. 269-277. ISSN 01448617. DOI 10.1016/j.carbpol.2013.11.037. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.037>.
- FIGUEROA-VALVERDE, L., DÍAZ-CEDILLO, F., CAMACHO-LUIS, A. y RAMOS-LÓPEZ, M., 2009. Artículo Efectos inducidos por Ruta graveolens L., Cnidocolus chayamansa McVaugh y Citrus aurantium L. sobre los niveles de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en un modelo de rata diabética. *Brazilian Journal of pharmacognosy*, vol. 19, no. October, pp. 898-907.
- FRAGA, C.G., GALLEANO, M., VERSTRAETEN, S. V y OTEIZA, P.I., 2010. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular aspects of medicine* [en línea], vol. 31, no. 6, pp. 435-45. [Consulta: 10 julio 2014]. ISSN 1872-9452. DOI 10.1016/j.mam.2010.09.006. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20854840>.
- FRY, S.C., 2011. Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. *Annual Plant Reviews*, vol. 41, pp. 1-42. DOI 10.1002/9781444391015.ch1.
- GAO, H., NISHIOKA, T., KAWABATA, J. y KASAI, T., 2004. Structure-activity relationships for alpha-glucosidase inhibition of baicalein, 5,6,7-trihydroxyflavone: the effect of A-ring substitution. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 68, no. January, pp. 369-375. ISSN 0916-8451. DOI 10.1271/bbb.68.369.
- GATTUSO, G., BARRECA, D., GARGIULLI, C., LEUZZI, U., CARISTI, C., ORGANICA, C., MESSINA, U. y SPERONE, S., 2007. Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules*, pp. 1641-1673.
- GAYATHRI, V., ANANTHI, S. y VASANTHI, H.R., 2013. Antihyperlipidemic Potential of Polyphenol and Glycoside Rich Nerium oleander Flower against Triton WR-1339-Induced Hyperlipidemia in Experimental Sprague Dawley Rats. *Journal of Chemistry* [en línea], vol. 2013, pp. 1-8. ISSN 2090-9063. DOI 10.1155/2013/825290. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/jchem/2013/825290/>.
- GHOLAMHOSEINIAN, a., FALLAH, H. y SHARIFI FAR, F., 2009. Inhibitory effect of methanol extract of Rosa damascena Mill. flowers on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia in normal and diabetic rats. *Phytomedicine* [en línea], vol. 16, no. 10, pp. 935-941. ISSN 09447113. DOI 10.1016/j.phymed.2009.02.020. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.02.020>.
- GONZÁLEZ, E. a. y NAZARENO, M. a., 2011. Antiradical action of flavonoid–ascorbate mixtures. *LWT - Food Science and Technology* [en línea], vol. 44, no. 2, pp. 558-564. [Consulta: 8 enero 2014]. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2010.09.017. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381000335X>.
- GUARNER, F. y AZPIROZ, F., 2005. La evaluación científica de los alimentos. En: M. JUAREZ, A. OLANO y F. MORAIS (eds.), *Alimentos Funcionales*. España: Fundación Española de ciencia y tecnología, pp. 1-21.
- HĂDĂRUGĂ, D.I., HĂDĂRUGĂ, N.G., BANDUR, G.N. y ISENGARD, H.-D., 2012. Water content of flavonoid/cyclodextrin nanoparticles: Relationship with the structural descriptors of biologically active compounds. *Food Chemistry* [en línea], vol. 132, no. 4, pp. 1651-1659. [Consulta: 24 enero 2013]. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.06.004. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611008521>.
- HARNAFI, H., SERGHINI CAID, H., EL HOUDA BOUANANI, N., AZIZ, M. y AMRANI, S., 2008. Hypolipemic activity of polyphenol-rich extracts from Ocimum basilicum in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Food Chemistry* [en línea], vol. 108, no. 1, pp. 205-212. [Consulta: 12 julio 2013]. ISSN 03088146.

- DOI 10.1016/j.foodchem.2007.10.062. Disponible en:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607011053>.
- HEDGES, A.R., 1998. Industrial Applications of Cyclodextrins. *Chemical reviews* [en línea], vol. 98, no. 5, pp. 2035-2044. ISSN 1520-6890. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848958>.
- HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R. y BOBILYA, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* [en línea], vol. 13, no. 10, pp. 572-584. ISSN 1873-4847. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12550068>.
- HELSTAD, S., 2006. Ingredient interactions: sweeteners. En: A. GAONKAR y M. ANDREW (eds.), *INGREDIENT INTERACTIONS Effects on food quality*. 2. Northwest, Washington: Taylor and Francis group, pp. 170-93. ISBN 0824757483.
- HIEUN-TRUNG, T., SANG-JUN, H., SANG-WOOK, K., CHUL LEE, Y. y DONG-HYUN, K., 2007. Bifidus fermentation Increases Hypolipidemic and Hypoglycemic Effects of Red Ginseng. *Journal of Microbiology and biotechnology*, vol. 17, no. 7, pp. 1127-1133.
- HOWARD, L.R., BROWNMILLER, C., PRIOR, R.L. y MAUROMOUSTAKOS, A., 2013. Improved Stability of Chokeberry Juice Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
- HUSSAIN, S.A., SULAIMAN, A.A. y ALJAMALY, A.A., 2013. Effect of proanthocyanidin single oral dose on glucose tolerance in response to oral maltose load in healthy women. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, vol. 2, no. 1, pp. 43-48.
- IACOBINI, C., MENINI, S., RICCI, C., SCIPIONI, A., SANSONI, V., MAZZITELLI, G., CORDONE, S., PESCE, C., PUGLIESE, F., PRICCI, F. y PUGLIESE, G., 2009. Advanced lipoxidation end-products mediate lipid-induced glomerular injury : role of receptor-mediated mechanisms. , no. January, pp. 360-369. DOI 10.1002/path.
- JAKOBEK, L., 2015. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry* [en línea], vol. 175, pp. 556-567. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2014.12.013. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614019153>.
- JEON, S., BOK, S., JANG, M. y LEE, M., 2001. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. , vol. 69, pp. 2855-2866.
- JEONG, T.S., KIM, E.E., LEE, C.H., OH, J.H., MOON, S.S., LEE, W.S., OH, G.T., LEE, S. y BOK, S.H., 2003. Hypocholesterolemic activity of hesperetin derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 13, pp. 2663-2665. ISSN 0960894X. DOI 10.1016/S0960-894X(03)00574-2.
- JIA, S., HU, Y., ZHANG, W., ZHAO, X., CHEN, Y., SUN, C., LI, X. y CHEN, K., 2015. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of neohesperidin derived from Citrus aurantium L. in diabetic KK-A y mice. *Food Funct.* [en línea], vol. 6, no. 3, pp. 878-886. ISSN 2042-6496. DOI 10.1039/C4FO00993B. Disponible en: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4FO00993B>.
- JOANA GIL-CHÁVEZ, G., VILLA, J. a., FERNANDO AYALA-ZAVALA, J., BASILIO HEREDIA, J., SEPULVEDA, D., YAHIA, E.M. y GONZÁLEZ-AGUILAR, G. a., 2013. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 12, no. Harvey 2008, pp. 5-23. ISSN 15414337. DOI 10.1111/1541-4337.12005.
- JUÁREZ, M., OLANO, A. y MORAIS, F., 2005. *Alimentos funcionales*. Madrid: Fundacion Española de ciencia y tecnología. ISBN 8468942049.
- JULLIAN, C., MIRANDA, S., ZAPATA-TORRES, G., MENDIZÁBAL, F. y OLEA-AZAR, C., 2007. Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling. *Bioorganic & medicinal chemistry* [en línea], vol. 15, no. 9, pp. 3217-24. [Consulta: 29 mayo 2013]. ISSN 0968-0896. DOI 10.1016/j.bmc.2007.02.035. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350847>.
- JUNG, U.J., LEE, M.K., PARK, Y.B., KANG, M. a. y CHOI, M.S., 2006. Effect of citrus flavonoids on lipid

- metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 38, pp. 1134-1145. ISSN 13572725. DOI 10.1016/j.biocel.2005.12.002.
- KAMRAN, M. y DANGLES, O., 2014. Journal of Food Composition and Analysis A comprehensive review on flavanones , the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* [en línea], vol. 33, no. 1, pp. 85-104. ISSN 0889-1575. DOI 10.1016/j.jfca.2013.11.004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.004>.
- KILARA, A., 2006. Interactions of ingredients in food systems: An introduction. En: A. GAONKAR y A. MCPHERSON (eds.), *INGREDIENT INTERACTION Effects on food quality*. 2. Northwest, Washington: Taylor and Francis group, pp. 2-17. ISBN 0824757493.
- KIM, H.K., JEONG, T.S., LEE, M.K., PARK, Y.B. y CHOI, M.S., 2003. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clinica Chimica Acta*, vol. 327, no. 1-2, pp. 129-137. ISSN 00098981. DOI 10.1016/S0009-8981(02)00344-3.
- KIMBALL, D., 1999. *Procesado de Cítricos*. 2da. Zaragoza España: Acribia. S.A. ISBN 842000965-2.
- KONIGSBERG, M., 2012. Estres oxidante y daño celular. En: E. ALVAREZ-PARRILLA, G. GONZALEZ-AGUILAR, L. DE LA ROSA y J. AYALA-ZAVALA (eds.), *Antioxidantes En alimentos y salud*. Primera. Mexico DF: Clave, pp. 15-38. ISBN 978-607-437-207-6.
- KROON, P. a, CLIFFORD, M.N., CROZIER, A., DAY, A.J., DONOVAN, J.L., MANACH, C. y WILLIAMSON, G., 2004. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *The American journal of clinical nutrition* [en línea], vol. 80, no. 1, pp. 15-21. ISSN 0002-9165. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15213022>.
- KRZYSIK, M., GRAJETA, H., PRESCHA, A. y WEBER, R., 2011. Effect of cellulose, pectin and chromium(III) on lipid and carbohydrate metabolism in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [en línea], vol. 25, no. 2, pp. 97-102. ISSN 0946672X. DOI 10.1016/j.jtemb.2011.01.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2011.01.003>.
- KUNDUSEN, S., HALDAR, P.K., GUPTA, M., MAZUMDER, U.K., SAHA, P., BALA, A., BHATTACHARYA, S. y KAR, B., 2011. Evaluation of Antihyperglycemic Activity of Citrus limetta Fruit Peel in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *ISRN endocrinology* [en línea], vol. 2011, no. 1995, pp. 869273. [Consulta: 8 enero 2014]. ISSN 2090-4649. DOI 10.5402/2011/869273. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3262637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- LANDETE, J.M., 2012. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Critical reviews in food science and nutrition* [en línea], vol. 52, no. 10, pp. 936-48. [Consulta: 19 agosto 2014]. ISSN 1549-7852. DOI 10.1080/10408398.2010.513779. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747081>.
- LE BOURVELLEC, C., BOUCHET, B. y RENARD, C.M.G.C., 2005. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica et biophysica acta* [en línea], vol. 1725, no. 1, pp. 10-8. [Consulta: 27 diciembre 2012]. ISSN 0006-3002. DOI 10.1016/j.bbagen.2005.06.004. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16023787>.
- LE BOURVELLEC, C., GUYOT, S. y RENARD, C.M.G.C., 2004. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material: Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochimica et biophysica acta* [en línea], vol. 1672, no. 3, pp. 192-202. [Consulta: 27 diciembre 2012]. ISSN 0006-3002. DOI 10.1016/j.bbagen.2004.04.001. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15182939>.
- LE BOURVELLEC, C. y RENARD, C.M.G.C., 2005. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part II: Quantification and impact of cell wall drying. *Biochimica et biophysica acta* [en línea], vol. 1725, no. 1, pp. 1-9. [Consulta: 27 diciembre 2012]. ISSN 0006-3002. DOI 10.1016/j.bbagen.2005.06.003. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009494>.

- LE BOURVELLEC, C. y RENARD, C.M.G.C., 2012. Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Critical reviews in food science and nutrition* [en línea], vol. 52, no. 3, pp. 213-48. [Consulta: 27 diciembre 2012]. ISSN 1549-7852. DOI 10.1080/10408398.2010.499808. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22214442>.
- LEITNER, D.M., GRUEBELE, M. y HAVENITH, M., 2008. Solvation dynamics of biomolecules: modeling and terahertz experiments. *HFSP journal* [en línea], vol. 2, no. 6, pp. 314-23. ISSN 1955-2068. DOI 10.2976/1.2976661. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2645579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- LEOPOLDINI, M., RUSSO, N. y TOSCANO, M., 2007. A comparative study of the antioxidant power of flavonoid catechin and its planar analogue. *Journal of agricultural and food chemistry* [en línea], vol. 55, no. 19, pp. 7944-9. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf070449c. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708650>.
- LEVIĆ, L., TEKIĆ, M., DJURIĆ, M. y KULJANIN, T., 2007. CaCl₂, CuSO₄ and AlCl₃ & NaHCO₃ as possible pectin precipitants in sugar juice clarification. *International Journal of Food Science & Technology* [en línea], vol. 42, no. 5, pp. 609-614. [Consulta: 10 abril 2014]. ISSN 0950-5423. DOI 10.1111/j.1365-2621.2006.01290.x. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2006.01290.x>.
- LEWANDOWSKA, U., SZEWCZYK, K., HRABEC, E., JANECKA, A. y GORLACH, S., 2013. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry* [en línea], vol. 61, no. 50, pp. 12183-99. ISSN 1520-5118. DOI 10.1021/jf404439b. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24295170>.
- LI, J., CHAO, J. y ZHANG, M., 2012. Studying on inclusion complexes of Wogonin with β -cyclodextrin and hydroxypropyl-cyclodextrin. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* [en línea], vol. 87, pp. 25-8. [Consulta: 30 abril 2013]. ISSN 1873-3557. DOI 10.1016/j.saa.2011.10.057. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22192416>.
- LI, R., LIANG, T., XU, L., LI, Y., ZHANG, S. y DUAN, X., 2013. Protective effect of cinnamon polyphenols against STZ-diabetic mice fed high-sugar, high-fat diet and its underlying mechanism. *Food and Chemical Toxicology* [en línea], vol. 51, pp. 419-425. ISSN 02786915. DOI 10.1016/j.fct.2012.10.024. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.024>.
- LI, T., LI, S., WANG, N. y LIU, J., 2008. Physicochemical properties and partial structural features of haw pectin. *European Food Research and Technology* [en línea], vol. 227, no. 4, pp. 1035-1041. [Consulta: 26 agosto 2014]. ISSN 1438-2377. DOI 10.1007/s00217-007-0817-3. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-007-0817-3>.
- LICONA, J., 2009. Estudio de Mercado para identificación de necesidades de infraestructura logística para la comercialización de jugo de cítricos en Veracruz. *SAGARPA* [en línea], Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/SISTPROD_CITRICOS.pdf.
- LIN, Y., VERMEER, M. a, BOS, W., VAN BUREN, L., SCHUURBIERS, E., MIRET-CATALAN, S. y TRAUTWEIN, E. a, 2011. Molecular structures of citrus flavonoids determine their effects on lipid metabolism in HepG2 cells by primarily suppressing apoB secretion. *Journal of agricultural and food chemistry* [en línea], vol. 59, no. 9, pp. 4496-503. ISSN 1520-5118. DOI 10.1021/jf1044475. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21425871>.
- LIU, B., ZHU, X., ZENG, J. y ZHAO, J., 2013. Preparation and physicochemical characterization of the supramolecular inclusion complex of naringin dihydrochalcone and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *FRIN* [en línea], vol. 54, no. 1, pp. 691-696. ISSN 0963-9969. DOI 10.1016/j.foodres.2013.08.007. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.007>.
- LOPEZ-NÚÑEZ, A., 2014. *Extracción, fraccionamiento y evaluación de la capacidad antioxidante de flavonoides de lima dulce (Citrus limetta riso) y naranja agria (Citrus aurantium)*. S.l.: Universidad de Guadalajara.

- LUCAS-ABELLÁN, C., FORTEA, I., LÓPEZ-NICOLÁS, J.M. y NÚÑEZ-DELICADO, E., 2007. Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chemistry* [en línea], vol. 104, no. 1, pp. 39-44. [Consulta: 29 mayo 2013]. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2006.10.068. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606008545>.
- LUND, M.N., HEINONEN, M., BARON, C.P. y ESTÉVEZ, M., 2011. Protein oxidation in muscle foods: a review. *Molecular nutrition & food research* [en línea], vol. 55, no. 1, pp. 83-95. [Consulta: 18 noviembre 2014]. ISSN 1613-4133. DOI 10.1002/mnfr.201000453. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21207515>.
- MAHMOUD, A.M., ASHOUR, M.B., ABDEL-MONEIM, A. y AHMED, O.M., 2012. Hesperidin and naringin attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress and proinflammatory cytokine production in high fat fed/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Journal of diabetes and its complications* [en línea], vol. 26, no. 6, pp. 483-90. [Consulta: 28 junio 2013]. ISSN 1873-460X. DOI 10.1016/j.jdiacomp.2012.06.001. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22809898>.
- MAHOMOODALLY, M.F., SUBRATTY, a H., GURIB-FAKIM, a, CHOUDHARY, M.I. y NAHAR KHAN, S., 2012. Traditional medicinal herbs and food plants have the potential to inhibit key carbohydrate hydrolyzing enzymes in vitro and reduce postprandial blood glucose peaks in vivo. *TheScientificWorldJournal*, vol. 2012, pp. 285284. ISSN 1537-744X. DOI 10.1100/2012/285284.
- MAIER, T., FROMM, M., SCHIEBER, A., KAMMERER, D.R. y CARLE, R., 2009. Process and storage stability of anthocyanins and non-anthocyanin phenolics in pectin and gelatin gels enriched with grape pomace extracts. *European Food Research and Technology* [en línea], vol. 229, no. 6, pp. 949-960. [Consulta: 12 septiembre 2014]. ISSN 1438-2377. DOI 10.1007/s00217-009-1134-9. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-009-1134-9>.
- MAJITHIYA, J.B., PARMAR, A.N. y BALARAMAN, R., 2004. Effect of curcumin on triton WR 1339 induced hypercholesterolemia in mice Prescribing pattern for outpatients in government hospitals in Jaipur. *Indian J Pharmacology*, vol. 36, no. 6, pp. 5-6.
- MALPEZZI, L., FRONZA, G., FUGANTI, C., MELE, A. y BRÜCKNER, S., 2004. Crystal architecture and conformational properties of the inclusion complex, neohesperidin dihydrochalcone-cyclomaltoheptaose (beta-cyclodextrin), by X-ray diffraction. *Carbohydrate research* [en línea], vol. 339, no. 12, pp. 2117-25. [Consulta: 27 marzo 2014]. ISSN 0008-6215. DOI 10.1016/j.carres.2004.05.029. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15280056>.
- MAMMEN, D. y DANIEL, M., 2012. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food chemistry* [en línea], vol. 135, no. 3, pp. 1365-8. [Consulta: 8 enero 2014]. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.05.109. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22953867>.
- MARAS, J.P.J., DEAVOURS, B., DIXON, R. y FERREIRA, D., 2006. The Stereochemistry of Flavonoids. En: E. GROTEWOLD (ed.), *The Science of Flavonoids*. Columbus Ohio USA: Springer, pp. 1-46. ISBN 9780387288215.
- MATSUMOTO, H., IKOMA, Y., SUGIURA, M., YANO, M. y HASEGAWA, Y., 2004. Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered hesperidin in rat plasma. *Journal of agricultural and food chemistry* [en línea], vol. 52, no. 21, pp. 6653-9. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf0491411. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479036>.
- MATTILA, P., ASTOLA, J. y KUMPULAINEN, J., 2000. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. *Journal of agricultural and food chemistry* [en línea], vol. 48, no. 12, pp. 5834-41. ISSN 0021-8561. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11312761>.
- MAZUMDER, S., MORVAN, C., THAKUR, S. y RAY, B., 2004. Cell wall polysaccharides from chalkumra (*Benincasa hispida*) fruit. Part I. Isolation and characterization of pectins. *Journal of agricultural and food chemistry* [en línea], vol. 52, no. 11, pp. 3556-62. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf0343130.

Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161230>.

- MAZZARACCHIO, P., PIFFERI, P., KINDT, M., MUNYANEZA, A. y BARBIROLI, G., 2004. Interactions between anthocyanins and organic food molecules in model systems. *International Journal of Food Science and Technology* [en línea], vol. 39, no. 1, pp. 53-59. ISSN 0950-5423. DOI 10.1111/j.1365-2621.2004.00747.x. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2004.00747.x>.
- MEILGAARD, M., CIVILLE, G. y CARR, T., 1999. Statistical Tables. En: L. FRANCO y C. ANDERSON (eds.), *Sensory Evaluation Techniques*. 3. Boca Raton: CRC Press, pp. 351-375.
- MIYAKE, Y., YAMAMOTO, K., TSUJIHARA, N. y OSAWA, T., 1998. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids*, vol. 33, no. 7, pp. 689-695. ISSN 00244201. DOI 10.1007/s11745-998-0258-y.
- MOLINARY, S. y QUINLAN, M., 2012. Sucralose. En: K. O'DONNELL y M. KEARSLEY (eds.), *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. 2. Oxford: L. JohnWiley and Sons, pp. 167-85.
- MUÑOZ DE CHAVEZ, M., LEDESMA SOLANO, J.A., CHAVEZ, A., PEREZ-GIL, F., MENDOZA, E., CASTAÑEDA, J., CALVO, C., CASTRO, I., SÁNCHEZ, C. y AVILA, A., 2002. *Tablas de valor nutritivo de alimentos*. Primera. Mexico DF: Mc Graw Hills. ISBN 9701032780.
- NG, S.W., SLINING, M.M. y POPKIN, B.M., 2012. Use of caloric and noncaloric sweeteners in US consumer packaged foods, 2005-2009. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, vol. 112, no. 11, pp. 1828-34.e1-6. ISSN 2212-2672. DOI 10.1016/j.jand.2012.07.009.
- NGUYEN, T.A., LIU, B., ZHAO, J., THOMAS, D.S. y HOOK, J.M., 2013. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food chemistry* [en línea], vol. 136, no. 1, pp. 186-92. [Consulta: 24 enero 2013]. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.07.104. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23017411>.
- PADAYACHEE, a, NETZEL, G., NETZEL, M., DAY, L., ZABARAS, D., MIKKELSEN, D. y GIDLEY, M.J., 2012. Binding of polyphenols to plant cell wall analogues - Part 2: Phenolic acids. *Food chemistry* [en línea], vol. 135, no. 4, pp. 2287-92. [Consulta: 12 septiembre 2014]. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.07.004. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22980803>.
- PADILLA CAMBEROS, E., MARTÍNEZ VELÁZQUEZ, M., FLORES FERNÁNDEZ, J.M. y VILLANUEVA RODRÍGUEZ, S., 2013. Acute Toxicity and Genotoxic Activity of Avocado Seed Extract (*Persea americana* Mill ., c . v . Hass). *The Scientific World Journal*,
- PADILLA-CAMBEROS, E., LAZCANO-DÍAZ, E., FLORES-FERNANDEZ, J.M., OWOLABI, M.S., ALLEN, K. y VILLANUEVA-RODRÍGUEZ, S., 2014. Evaluation of the Inhibition of Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes , the Antioxidant Activity , and the Polyphenolic Content of Citrus limetta Peel Extract. *The Scientific World Journal*,
- PALAFIX-CARLOS, H., AYALA-ZAVALA, J.F. y GONZÁLEZ-AGUILAR, G. a., 2011. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, vol. 76, no. 1, pp. 6-15. ISSN 00221147. DOI 10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x.
- PANOUILLE, M., THIBAUT, J.-F. y BONNIN, E., 2006. Cellulase and protease preparations can extract pectins from various plant byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry* [en línea], vol. 54, no. 23, pp. 8926-35. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf0617824. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17090143>.
- PARADA, J. y AGUILERA, J.M., 2007. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of food science* [en línea], vol. 72, no. 2, pp. R21-32. [Consulta: 7 noviembre 2012]. ISSN 1750-3841. DOI 10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17995848>.
- PARK, K.-I., PARK, H.-S., KIM, M.-K., HONG, G.-E., NAGAPPAN, A., LEE, H.-J., YUMNAM, S., LEE, W.-S., WON, C.-K., SHIN, S.-C. y KIM, G.-S., 2014. Flavonoids identified from Korean Citrus aurantium L. inhibit Non-Small Cell Lung Cancer growth in vivo and in vitro. *Journal of Functional Foods* [en línea], vol. 7, pp.

- 287-297. [Consulta: 1 mayo 2014]. ISSN 17564646. DOI 10.1016/j.jff.2014.01.032. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464614000498>.
- PAUL, A. y PAUL, A.C., 1995. AN ETHNOBOTANICAL SURVEY OF THE USES FOR CITRUS AURANTIUM (RUTACEAE) IN HAITI. *Economic Botany*, vol. 49, no. 3, pp. 249-256.
- PÉREZ-MARTÍNEZ, J.D., SÁNCHEZ-BECERRIL, M., ORNELAS-PAZ, J.D.J., GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.M., IBARRA-JUNQUERA, V. y ESCALANTE-MINAKATA, P., 2013. The Effect of Extraction Conditions on the Chemical Characteristics of Pectin from *Opuntia ficus indica* Cladode Flour. *Journal of Polymers and the Environment* [en línea], [Consulta: 31 octubre 2013]. ISSN 1566-2543. DOI 10.1007/s10924-013-0602-2. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-013-0602-2>.
- PETERSON, J.J., BEECHER, G.R., BHAGWAT, S. a., DWYER, J.T., GEBHARDT, S.E., HAYTOWITZ, D.B. y HOLDEN, J.M., 2006. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* [en línea], vol. 19, pp. S74-S80. [Consulta: 11 julio 2014]. ISSN 08891575. DOI 10.1016/j.jfca.2005.12.009. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157505001456>.
- PETERSON, J.J., DWYER, J.T., BEECHER, G.R., BHAGWAT, S. a., GEBHARDT, S.E., HAYTOWITZ, D.B. y HOLDEN, J.M., 2006. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* [en línea], vol. 19, pp. S66-S73. [Consulta: 11 julio 2014]. ISSN 08891575. DOI 10.1016/j.jfca.2005.12.006. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157505001432>.
- PINHO, E., GROOTVELD, M. y HENRIQUES, M., 2014. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. , vol. 101, pp. 121-135. DOI 10.1016/j.carbpol.2013.08.078.
- PLAZA, L., SÁNCHEZ-MORENO, C., DE ANCOS, B., ELEZ-MARTÍNEZ, P., MARTÍN-BELLOSO, O. y CANO, M.P., 2011. Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization. *LWT - Food Science and Technology* [en línea], vol. 44, no. 4, pp. 834-839. [Consulta: 3 septiembre 2014]. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2010.12.013. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643810004378>.
- PREININGER, M., 2006. Interactions of flavor components in food. En: A. GAONKAR y A. MCPHERSON (eds.), *INGREDIENT INTERACTIONS Effects on food quality*. 2. Northwest, Washington: Taylor and Francis group, pp. 478-512. ISBN 0824757483.
- PRIOR, R.L., WU, X. y SCHAICH, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 10, pp. 4290-4302. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf0502698.
- PRISCILLA, D.H., ROY, D., SURESH, A., KUMAR, V. y THIRUMURUGAN, K., 2014. Naringenin inhibits α -glucosidase activity: A promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions* [en línea], vol. 210, pp. 77-85. ISSN 00092797. DOI 10.1016/j.cbi.2013.12.014. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.12.014>.
- RAASMAJA, A., LECKLIN, A., LI, X.M., ZOU, J., ZHU, G.-G., LAAKSO, I. y HILTUNEN, R., 2013. A water-alcohol extract of *Citrus grandis* whole fruits has beneficial metabolic effects in the obese Zucker rats fed with high fat/high cholesterol diet. *Food chemistry* [en línea], vol. 138, no. 2-3, pp. 1392-9. [Consulta: 30 noviembre 2014]. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.09.140. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411259>.
- RAMCHOUN, M., HARNAFI, H., ALEM, C., BÜCHELE, B., SIMMET, T., ROUIS, M., ATMANI, F. y AMRANI, S., 2012. Hypolipidemic and antioxidant effect of polyphenol-rich extracts from Moroccan thyme varieties. *e-SPEN Journal*, vol. 7, pp. 3-8. ISSN 22128263. DOI 10.1016/j.clnme.2012.02.005.
- REGA, B., GUICHARA, E. y VOILLEY, A., 2002. Flavour release from pectin gels: Effects of texture, molecular interactions and aroma compounds diffusion. *Science des Aliments*, no. 22, pp. 235-248.

- REICH, E. y SCHIBLI, A., 2006. Introduction. *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. New York: s.n., pp. 264.
- REN, J., MENG, S., LEKKA, C.E. y KAXIRAS, E., 2008. Complexation of Flavonoids with Iron : Structure and Optical Signatures. *J.Phys.Chem. B*, vol. 112, no. 6, pp. 1845-1850.
- RENARD, C.M.G.C., BARON, A., GUYOT, S. y DRILLEAU, J., 2001. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *biological macromolecules*, pp. 1-10.
- RENDELL, M.S. y JOVANOVIC, L., 2006. Targeting postprandial hyperglycemia. *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 55, no. 9, pp. 1263-1281. ISSN 00260495. DOI 10.1016/j.metabol.2006.05.012.
- REZENDE, B. a, CORTES, S.F., DE SOUSA, F.B., LULA, I.S., SCHMITT, M., SINISTERRA, R.D. y LEMOS, V.S., 2009. Complexation with beta-cyclodextrin confers oral activity on the flavonoid dioclein. *International journal of pharmaceutics* [en línea], vol. 367, no. 1-2, pp. 133-9. [Consulta: 3 diciembre 2012]. ISSN 1873-3476. DOI 10.1016/j.ijpharm.2008.09.046. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955122>.
- ROBLES-SÁNCHEZ, M., GORINSTEIN, S., MARTÍN-BELLOSO, O., ASTIAZARÁN-GARCÍA, H., GONZÁLEZ-AGUILAR, G. y CRUZ-VALENZUELA, R., 2007. Frutos tropicales mínimamente procesados: Potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia*, vol. 32, no. 4, pp. 227-232. ISSN 03781844.
- RODRÍGUEZ-RIVERA, M.P., LUGO-CERVANTES, E., WINTERHALTER, P. y JERZ, G., 2014. Metabolite profiling of polyphenols in peels of Citrus limetta Risso by combination of preparative high-speed countercurrent chromatography and LC-ESI-MS/MS. *Food chemistry* [en línea], vol. 158, pp. 139-52. [Consulta: 9 mayo 2014]. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2014.02.077. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24731325>.
- RODRÍGUEZ-ROQUE, J., GRIGELMO-MIGUEL, N., ROJAS-GRAÜ, A. y MARTÍN-BELLOSO, O., 2012. Metodos para determinar la capacidad antioxidante en alimentos y sistemas biológicos. En: E. ALVAREZ-PARRILLA, G. GONZALEZ-AGUILAR, L. DE LA ROSA y F. AYALA-ZAVALA (eds.), *Antioxidantes En alimentos y salud*. Mexico DF: Clave, pp. 407-56. ISBN 978-607-437-207-6.
- ROOHBAKHSH, A., PARHIZ, H., SOLTANI, F., REZAEI, R. y IRANSHAHI, M., 2015. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life sciences* [en línea], vol. 124, pp. 64-74. ISSN 1879-0631 (Electronic). DOI 10.1016/j.lfs.2014.12.030. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.030>.
- ROOWI, S. y CROZIER, A., 2011. Flavonoids in tropical citrus species. *Journal of agricultural and food chemistry* [en línea], vol. 59, no. 22, pp. 12217-25. ISSN 1520-5118. DOI 10.1021/jf203022f. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21978223>.
- SAEIDI, I., HADJMOHAMMADI, M.R., PEYROVI, M., IRANSHAHI, M., BARFI, B., BABAEI, A.B. y DUST, A.M., 2011. HPLC determination of hesperidin, diosmin and eriocitrin in Iranian lime juice using polyamide as an adsorbent for solid phase extraction. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* [en línea], vol. 56, no. 2, pp. 419-22. [Consulta: 8 enero 2014]. ISSN 1873-264X. DOI 10.1016/j.jpba.2011.05.015. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683540>.
- SAGARPA, 2012. México, entre los líderes en producción de cítricos a nivel mundial. [en línea], Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/sanluispotosi/boletines/Paginas/BOL1301112.aspx>.
- SAGARPA, 2013. SIAP. [en línea]. Mexic: Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/tramitesyServicios/Paginas/siap02.aspx>.
- SALAZAR, S. y PALACIOS, A., 2011. Estudios de interacciones entre moleclas antioxidantes y moleculas relacionadas con radicales oxidativos mediante cálculos mecano cuánticos y simulaciones de dinámica molecular. *La Granja, Revista de cienias de la vida*, vol. 14, no. 2, pp. 13-23.
- SAMEENA, Y. y ENOCH, I.V.M. V, 2013. The influence of β -cyclodextrin on the interaction of hesperetin and its bismuth (III) complex with calf thymus DNA. *Journal of Luminescence* [en línea], vol. 138, pp. 105-

116. ISSN 0022-2313. DOI 10.1016/j.jlumin.2012.12.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2012.12.003>.
- SAURA-CALIXTO, F., 2011. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, pp. 43-49. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf1036596.
- SAURA-CALIXTO, F., SERRANO, J. y GOÑI, I., 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, vol. 101, pp. 492-501. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2006.02.006.
- SHARMA, B., VISWANATH, G., SALUNKE, R. y ROY, P., 2008. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chemistry*, vol. 110, pp. 697-705. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.02.068.
- SHARMA, M., FERNANDES, J., AHIRWAR, D. y JAIN, R., 2008. HYPOGLYCEMIC AND HYPOLIPIDIMIC ACTIVITY OF ALCOHOLIC EXTRACT OF CITRUS AURANTIUM IN NORMAL AND ALLOXAN-INDUCED DIABETIC RATS . , vol. 171, pp. 161-171.
- SHARMA, O.P. y BHAT, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* [en línea], vol. 113, no. 4, pp. 1202-1205. [Consulta: 20 marzo 2014]. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.08.008. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608009710>.
- SHIBAO, C., 2012. Acarbose. *Primer on the Autonomic Nervous System* [en línea]. S.l.: s.n., pp. 639-641. ISBN 9780123865250. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123865250001347>.
- SHIROSAKI, M., KOYAMA, T. y YAZAWA, K., 2008. Anti-Hyperglycemic Activity of Kiwifruit Leaf (*Actinidia deliciosa*) in Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [en línea], vol. 72, no. 4, pp. 1099-1102. [Consulta: 12 julio 2013]. ISSN 0916-8451. DOI 10.1271/bbb.70704. Disponible en: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bbb/70704?from=CrossRef>.
- SIVAM, a. S., SUN-WATERHOUSE, D., PERERA, C.O. y WATERHOUSE, G.I.N., 2012. Exploring the interactions between blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads; a FTIR and HPLC investigation. *Food Chemistry* [en línea], vol. 131, no. 3, pp. 802-810. [Consulta: 12 septiembre 2014]. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.09.047. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611013094>.
- SONG, L.X., BAI, L., XU, X.M., HE, J. y PAN, S.Z., 2009. Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry. *Coordination Chemistry Reviews* [en línea], vol. 253, no. 9-10, pp. 1276-1284. [Consulta: 31 agosto 2014]. ISSN 00108545. DOI 10.1016/j.ccr.2008.08.011. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854508001689>.
- SPENCER, J.P.E., VAUZOUR, D. y RENDEIRO, C., 2009. Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Archives of biochemistry and biophysics* [en línea], vol. 492, no. 1-2, pp. 1-9. [Consulta: 28 junio 2013]. ISSN 1096-0384. DOI 10.1016/j.abb.2009.10.003. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19822127>.
- SROKA, Z., FECKA, I. y CISOWSKI, W., 2005. Antiradical and Anti-H₂O₂ Properties of Polyphenolic Compounds from an Aqueous Peppermint Extract. *Z. Naturforsch.*, vol. 60, no. 2004, pp. 826-832.
- TAGLIAZUCCHI, D., VERZELLONI, E., BERTOLINI, D. y CONTE, A., 2010. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry* [en línea], vol. 120, no. 2, pp. 599-606. [Consulta: 22 agosto 2014]. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2009.10.030. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609012230>.
- TANG, B., MA, L., WANG, H. y ZHANG, G., 2002. Study on the supramolecular interaction of curcumin and beta-cyclodextrin by spectrophotometry and its analytical application. *Journal of agricultural and food chemistry* [en línea], vol. 50, no. 6, pp. 1355-61. ISSN 0021-8561. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11879002>.
- TOLLEFSEN, K.E., NIZZETTO, L. y HUGGETT, D.B., 2012. Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment. *The Science of the total environment*, vol. 438, pp. 510-6. ISSN

1879-1026. DOI 10.1016/j.scitotenv.2012.08.060.

- TOUNSI, M.S., WANNES, W.A., OUERGHEMMI, I., JEGHAM, S., BEN NJIMA, Y., HAMD AOUI, G., ZEMNI, H. y MARZOUK, B., 2011. Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. *Journal of the science of food and agriculture* [en línea], vol. 91, no. 1, pp. 142-51. [Consulta: 22 junio 2014]. ISSN 1097-0010. DOI 10.1002/jsfa.4164. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20862741>.
- TRAUTWEIN, E. a., FORGBERT, K., RIECKHOFF, D. y ERBERSDOBLER, H.F., 1999. Impact of β -cyclodextrin and resistant starch on bile acid metabolism and fecal steroid excretion in regard to their hypolipidemic action in hamsters. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1437, no. 1, pp. 1-12. ISSN 13881981. DOI 10.1016/S0005-2760(98)00174-X.
- TRIPOLI, E., GUARDIA, M. La, GIAMMANCO, S., MAJO, D. Di y GIAMMANCO, M., 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry* [en línea], vol. 104, no. 2, pp. 466-479. [Consulta: 15 diciembre 2013]. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2006.11.054. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606009356>.
- UNNIKRISHNAN, M.K., VEERAPUR, V., NAYAK, Y., PAUL, P. y MATHEW, G., 2014. *Polyphenols in Human Health and Disease* [en línea]. S.l.: Elsevier. [Consulta: 24 octubre 2014]. ISBN 9780123984562. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00013-X>.
- UTRERA, M., 2014. *Advanced studies on meat protein oxidation in model systems and in meat subjected to frozen storage*. S.l.: Extremadura.
- VAN DAM, R.M., NAIDOO, N. y LANDBERG, R., 2013. Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings. *Current opinion in lipidology* [en línea], vol. 24, pp. 25-33. ISSN 1473-6535. DOI 10.1097/MOL.0b013e32835bcdff. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254472>.
- VILLANUEVA, S., 2008. Desarrollo de un jugo de lima fluido a nivel laboratorio, un polvo para preparar jugo de lima a nivel laboratorio ademas de un estudio de factibilidad tecnica y económica para la producción y concervación de estos productos R. C. p. l. industrial. . Guadalajara, Mexico:
- WATRELOT, A. a, LE BOURVELLEC, C., IMBERTY, A. y RENARD, C.M.G.C., 2013. Interactions between pectic compounds and procyanidins are influenced by methylation degree and chain length. *Biomacromolecules* [en línea], vol. 14, no. 3, pp. 709-18. ISSN 1526-4602. DOI 10.1021/bm301796y. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23327557>.
- WILCOX, L.J., BORRADAILE, N.M. y HUFF, M.W., 2006. Antiatherogenic Properties of Naringenin, a Citrus Flavonoid. *Cardiovascular Drug Reviews* [en línea], vol. 17, no. 2, pp. 160-178. ISSN 08975957. DOI 10.1111/j.1527-3466.1999.tb00011.x. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1527-3466.1999.tb00011.x>.
- WILLIAMS, R.J. y SPENCER, J.P.E., 2012. Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free radical biology & medicine* [en línea], vol. 52, no. 1, pp. 35-45. [Consulta: 28 mayo 2013]. ISSN 1873-4596. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.010. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982844>.
- WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E. y RICE-EVANS, C., 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine* [en línea], vol. 36, no. 7, pp. 838-49. [Consulta: 21 mayo 2013]. ISSN 0891-5849. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019969>.
- XU, J., TAN, T., JANSON, J., KENNE, L. y SANDSTROM, C., 2007. NMR Studies on the interaction between (À) -epigallocatechin gallate and cyclodextrins , free and bonded to silica gels. *Carbohydrate Research*, vol. 342, pp. 843-850. DOI 10.1016/j.carres.2007.01.007.

- YAO, N., HE, R.R., ZENG, X.H., HUANG, X.J., DU, T.L., CUI, J.C. y HIROSHI, K., 2014. Hypotriglyceridemic effects of apple polyphenols extract via up-regulation of lipoprotein lipase in triton WR-1339-induced mice. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, vol. 20, no. 1, pp. 31-35. ISSN 16720415. DOI 10.1007/s11655-012-1243-3.
- YOSHIDA, H., 2007. ER stress and diseases. *The FEBS journal* [en línea], vol. 274, no. 3, pp. 630-58. [Consulta: 23 julio 2014]. ISSN 1742-464X. DOI 10.1111/j.1742-4658.2007.05639.x. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17288551>.
- ZHANG, B., CHEN, T., CHEN, Z., WANG, M., ZHENG, D., WU, J., JIANG, X. y LI, X., 2012. Synthesis and anti-hyperglycemic activity of hesperidin derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* [en línea], vol. 22, no. 23, pp. 7194-7. [Consulta: 12 junio 2014]. ISSN 1464-3405. DOI 10.1016/j.bmcl.2012.09.049. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23067551>.
- ZIBERNA, L., FORNASARO, S., CVOROVIC, J. y TRAMER, F., 2014. Bioavailability of flavonoids: the role of cell membrane transporters. *Polyphenols in Human Health and Disease*. S.l.: Elsevier, pp. 489-511. ISBN 9780123984562.

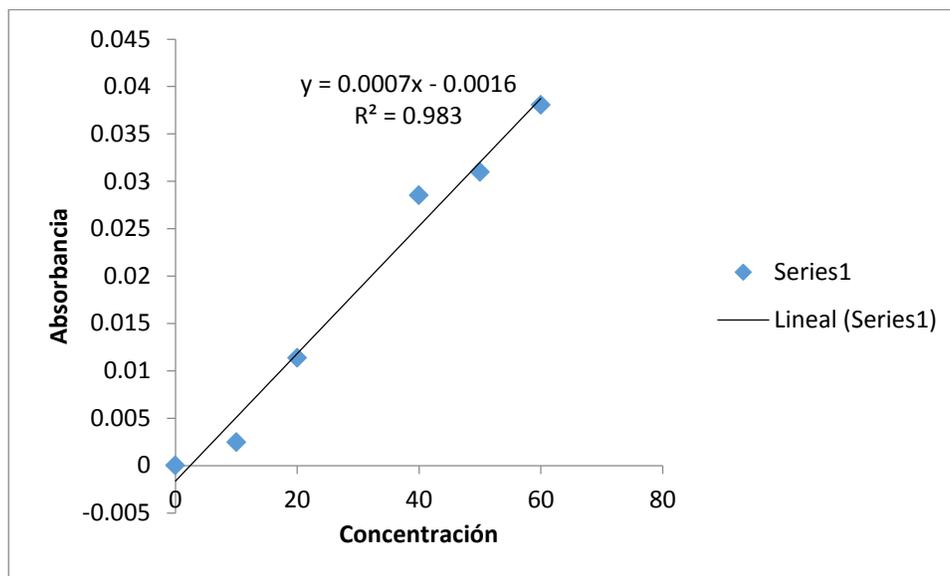
18.Anexos

18.1 Anexo 1. Tabla de macro/micro-nutrientes de lima y naranja agria

Nutriente	Unidades	Lima	Naranja agria
Porción comestible	%	63	63
Energía	kcal	47	65
Humedad	%	88.3	82.4
Fibra dietética	g	0.50	1.3
Hidratos de Carbono	g	10.50	13.40
Proteínas	g	0.70	1.5
Lípidos totales	g	0.20	0.6
Ac. Grasos			
Saturados	g	-	-
Monoinsaturado	g	-	-
Poliinsaturado	g	-	-
Colesterol	g	0.0	0.0
Minerales			
Calcio	mg	33	65
Fósforo	mg	18	17
Hierro	mg	0.6	0.8
Magnesio	mg	-	11
Sodio	mg	2	1
Potasio	mg	102	200
Zinc	mg	0.11	0.05
Vitaminas			
RAE (vit.A)	µg	1	5
Ac. Ascórbico	mg	29	31
Tiamina	mg	0.03	0.07
Riboflavina	mg	0.02	0.01
Niacina	mg	0.20	0.4
Piridoxina	mg	-	-
Ac. Fólico	µg	8	-
Cobalamina	µg	0.0	0.0

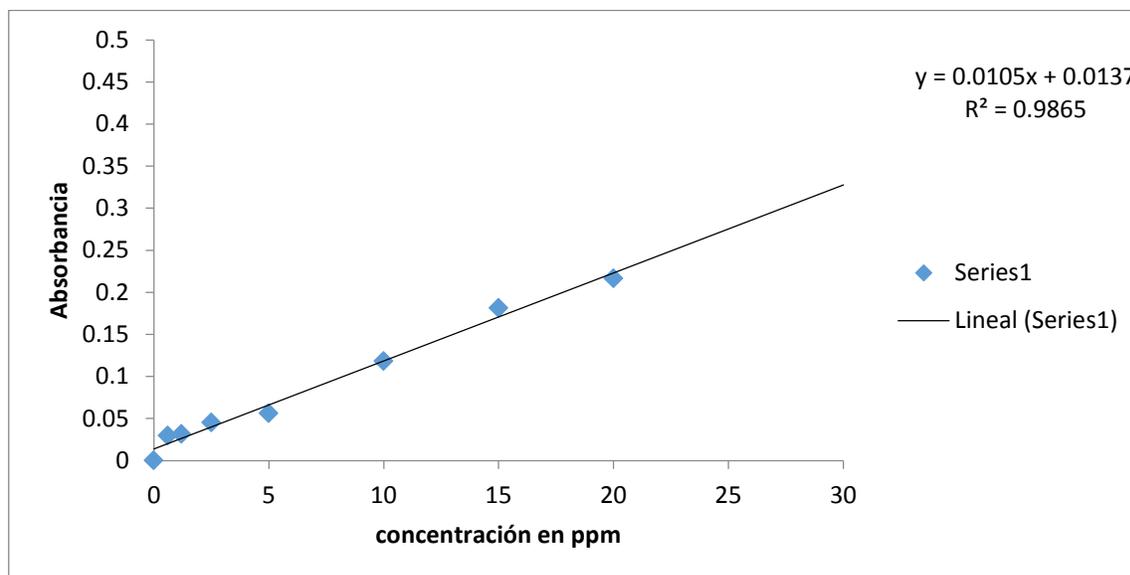
18.2 Anexo 2. Curva de calibración de flavonoides totales

Curva de calibración con quercetina a 510nm para el método de flavonoides totales.



18.3 Anexo 3. Capacidad antirradical equivalente en trolox

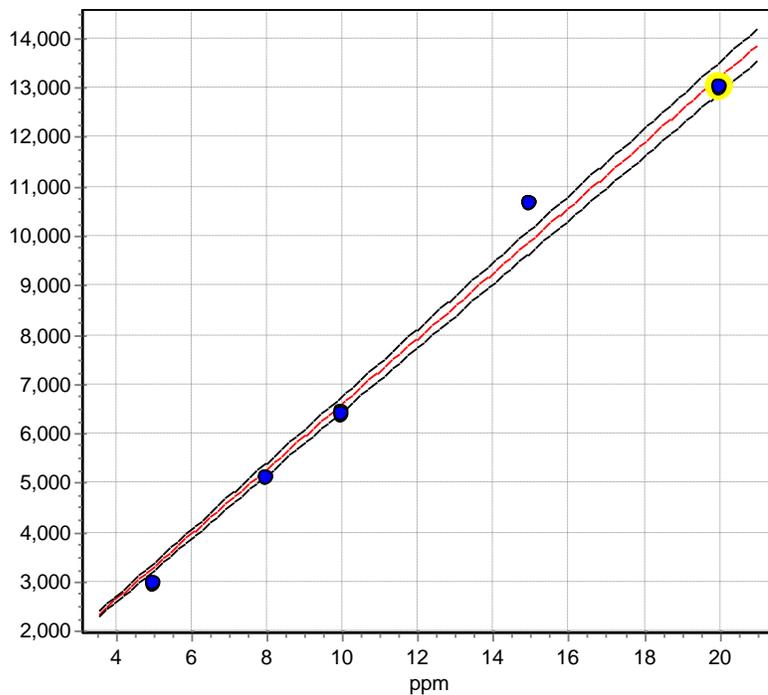
Curva de calibración con trolox a 570nm para el radical DPPH



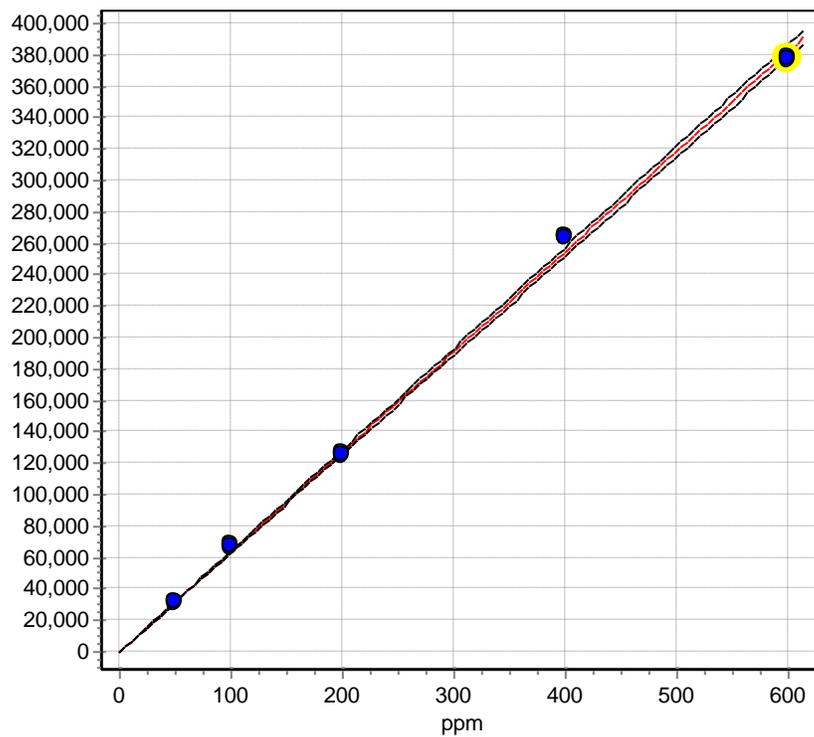
18.4 Anexo 4. Curvas de calibración para cromatografía líquida (HPLC)

Curva de calibración de los flavonoides utilizados para la cuantificación de compuestos en el jugo.

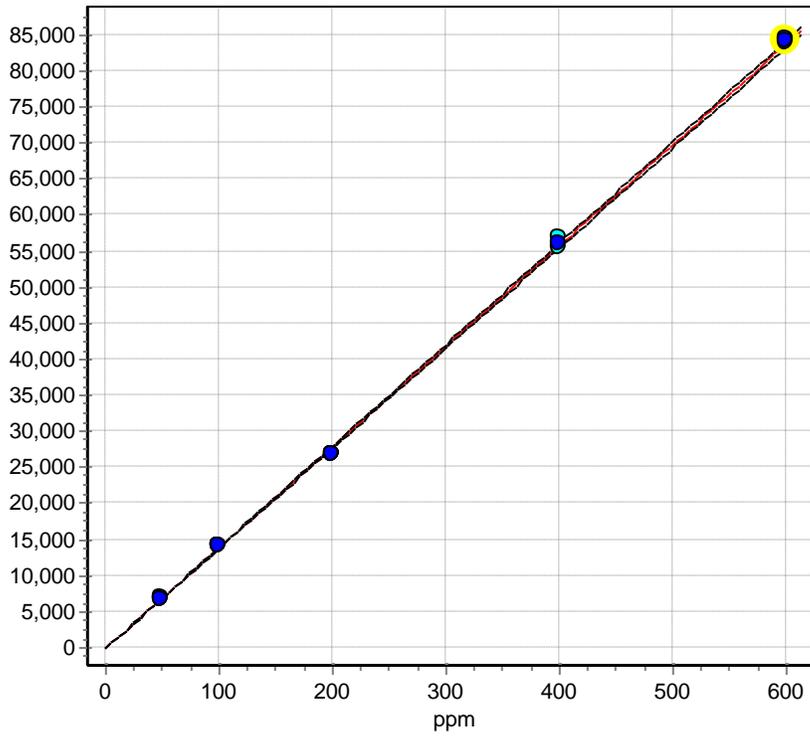
Calibration curve: Flavonoides Nancy SML 2014 - Eriocitrina



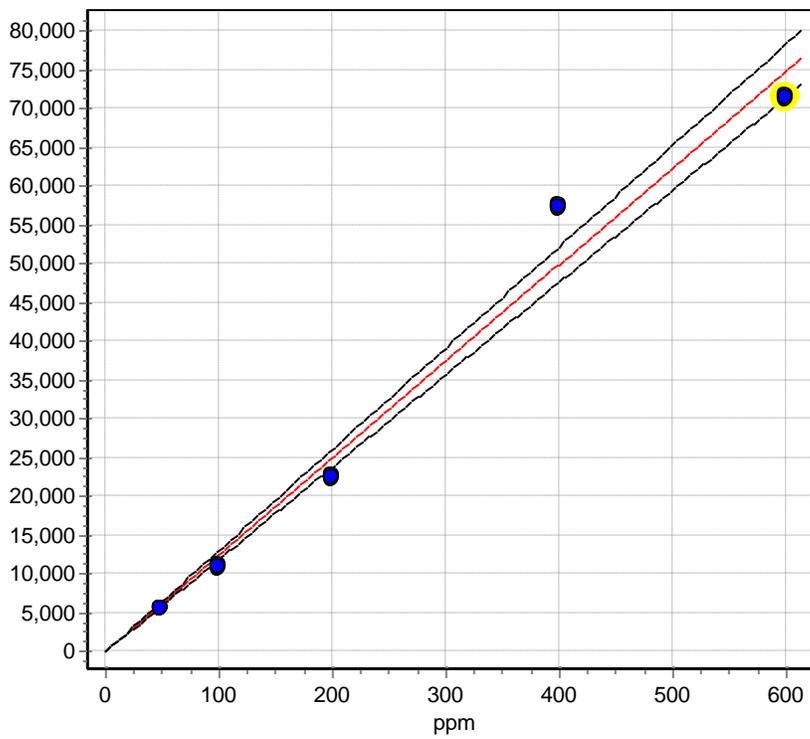
Calibration curve: Flavonoides Nancy SML 2014 - Naringina



Calibration curve: Flavonoides Nancy SML 2014 - Neohesperidina



Calibration curve: Flavonoides Nancy SML 2014 - Hesperidina



18.5 Anexo 5. Análisis estadístico de las soluciones modelo

Análisis de Varianza para %I del sistema modelo de lima

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	5723.62	26	220.139	3.53	0.0000
Residuo	4300.65	69	62.3283		
Total (Corr.)	10024.3	95			

Suma de Cuadrados Tipo III					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tipo de polisacárido	772.416	2	386.208	6.20	0.0034
tipo de flavonoide	1641.95	3	547.317	8.78	0.0001
pH	360.375	1	360.375	5.78	0.0189
temperatura	6.40667	1	6.40667	0.10	0.7495
Tipo de polisacárido*tipo de flavonoide	865.268	6	144.211	2.31	0.0429
Tipo de polisacárido*pH	494.528	2	247.264	3.97	0.0234
Tipo de polisacárido*temperatura	127.906	2	63.9529	1.03	0.3638
Tipo de polisacárido*tipo de flavonoide*pH	738.27	6	123.045	1.97	0.0812
tipo de flavonoide*pH*temperatura	716.502	3	238.834	3.83	0.0134
Residuo	4300.65	69	62.3283		
Total (corregido)	10024.3	95			

18.6 Anexo 6. Análisis estadístico de las soluciones modelo

Análisis de Varianza para %I del sistema modelo de naranja agria

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	2836.03	39	72.7187	9.63	0.0000
Residuo	422.957	56	7.55281		
Total (Corr.)	3258.99	95			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
tipo de flavonoide	1092.79	2	546.397	72.34	0.0000
tipo de polisacárido	1002.64	3	334.214	44.25	0.0000
pH	1.5297	1	1.5297	0.20	0.6544
temperatura	16.1606	1	16.1606	2.14	0.1491
tipo de flavonoide*tipo de polisacárido	436.774	6	72.7957	9.64	0.0000
tipo de flavonoide*pH	42.1223	2	21.0612	2.79	0.0701
tipo de flavonoide*temperatura	0.12513	2	0.0625652	0.01	0.9918
tipo de polisacárido*pH	67.4508	3	22.4836	2.98	0.0392
tipo de polisacárido*temperatura	12.3083	3	4.10278	0.54	0.6547
pH*temperatura	43.9246	1	43.9246	5.82	0.0192