ARTÍCULO ORIGINAL

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA CÁSCARA, ZUMO Y SEMILLA DE LIMA DULCE, LIMÓN RUGOSO Y LIMÓN TIPO MANDARINA

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY AND THERMAL STABILITY OF THE PEEL, JUICE AND SEED OF SWEET LIME, ROUGH LEMON AND MANDARINE LEMON

Pedro Pablo Peláez Sánchez
Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú.
Correo electrónico: pedro.pelaez@unas.edu.pe
Código ORCID: 0000-0002-6425-1074

Williams Roldan Carbajal
Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú.
Correo electrónico: williams.roldan@unas.edu.pe
Código ORCID: 0000-0002-2516-5819

Alfredo Carmona Ruiz
Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú.
Correo electrónico: alfredo.carmona@unas.edu.pe
Código ORCID: 0000-0003-1656-2318

Rosalva Charito Raza Quiroz
Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú.

***Recepción**: 10 de abril de 2019* ***Aceptado**: 15 de junio de 2019*

Resumen

El objetivo de la investigación fue evaluar la capacidad antioxidante y la estabilidad térmica en la cáscara, zumo y semilla de lima dulce, limón rugoso y limón tipo mandarina. Se determinó el contenido de fenoles totales, capacidad antioxidante en función a los radicales DPPH y ABTS, expresados como equivalentes de Trolox. El contenido de fenoles totales en cáscara, semilla y zumo, de lima dulce fue 1,08±0,00 g EAG/100mL, 0,16±0,00 g EAG/100g y 0,29±0,00 g EAG/100g; en limón rugoso fue 0,97±0,01 g EAG/100mL, 0,19±0,00 g EAG/100g y 0,09±0,00 g EAG/100g y en limón mandarina fue 0,83±0,01 g EAG/100mL, 0,15±0,01 g EAG/100g y 0,08±0,00 g EAG/100g. No se detectó la presencia de antocianinas. Se logró determinar la capacidad antioxidante en función a los radicales DPPH y ABTS, expresados como Trolox equivalente, la capacidad antioxidante en cáscaras vario desde 71,87±0,03 a 730,75±0,03 uMTEAC/100g b.s. en $DPPH^{o+}$ y de 63,73±1,22 a 78,18±0,58 uMTEAC/g b.s. en $ABTS^{o+}$; en semillas desde 200,72±0,02 a 257,45±0,06 uMTEAC/100g b.s. en $DPPH^{o+}$ y de 8,45±0,20 a 12,12±0,19 uMTEAC/g b.s. en $ABTS^{o+}$ y en zumo de 335,60±9,00 a 602,23±,08uMTEAC/mL b.s. en $DPPH^{o+}$ y de 61,35±3,66 a 301,47±39,87uMTEAC/100mL b.s. en $ABTS^{o+}$. Los fenoles totales y capacidad antioxidante como radical DPPH, en cáscara y semillas de limón rugoso y limón mandarina, permanecieron termoestables, durante el almacenamiento; la capacidad antioxidante expresada como radical ABTS, disminuyo. Los polifenoles y capacidad antioxidante expresados como radicales DPPH y ABTS, en el jugo de limón dulce, mostraron un incremento durante el almacenamiento a diversas temperaturas.

Abstract

The objective of the research was to evaluate the antioxidant capacity and the thermal stability in the peel, juice and sweet lime seed, rough lemon and lemon tangerine type. The content of total phenols, antioxidant capacity was determined according to the DPPH and ABTS radicals, expressed as Trolox equivalents. The content of total phenols in husk, seed and juice of sweet lime was 1.08 ± 0.00 g EAG / 100mL, 0.16 ± 0.00 g EAG / 100g and 0.29 ± 0.00 g EAG / 100g; in rough lemon was 0.97 ± 0.01 g EAG / 100mL, 0.19 ± 0.00 g EAG / 100g and 0.09 ± 0.00 g EAG / 100g and in mandarin lemon was 0.83 ± 0, 01 g EAG / 100mL, 0.15 ± 0.01 g EAG / 100g and 0.08 ± 0.00 g EAG / 100g. The presence of anthocyanins was not detected. The antioxidant capacity in shells varied from 71.87 ± 0.03 to 730.75 ± 0.03 uMTEAC / 100g b.s. in $DPPH^{o}$ + and from 63.73 ± 1.22 to 78.18 ± 0.58 uMTEAC / g b.s. in $ABTS^{o}$ +; in seeds from 200.72 ± 0.02 to 257.45 ± 0.06 uMTEAC / 100g b.s. in $DPPH^{o}$ + and from 8.45 ± 0.20 to 12.12 ± 0.19 uMTEAC / g b.s. in $ABTS^{o}$ + and in juice from 335.60 ± 9.00 to 602.23 ±, 08uMTEAC / mL b.s. in $DPPH^{o}$ + and from 61.35 ± 3.66 to 301.47 ± 39.87uMTEAC / 100mL b.s. in $ABTS^{o}$ +. The total phenols and antioxidant capacity as DPPH radical, in peel and seeds of rough lemon and mandarin lemon, remained thermostable, during storage. A decrease in the antioxidant capacity expressed as ABTS radical was noted. The polyphenols and antioxidant capacity expressed as DPPH and ABTS radicals, in the sweet lemon juice, showed an increase during storage at various temperatures.

Los autores©. Este artículo es publicado por la Revista Investigación y Amazonía de la Universidad Nacional Agraria de la Selva. Este es un manuscrito de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. (https://creativecommons.org/licen-ses/by-nc-sa/4.0/), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que se cite adecuadamente la obra original.

Introducción

En nuestro País existen diferentes variedades de cítricos para cubrir el mercado nacional. La evaluación de la capacidad antioxidante y la estabilidad térmica que puede tener las cáscaras, zumos y semillas de estos cítricos (limón rugoso, lima dulce y limón tipo mandarina), dependen de los tipos de suelos en que son cultivados y las condiciones climáticas. Es necesario dar a conocer las bondades antioxidantes de la lima dulce, limón rugoso y limón tipo mandarina ya que se desconocen sus propiedades desde el punto de vista científico, es por ello que se ha considerado estudiar la cáscara, semilla y zumo de estos cítricos, con el fin de contribuir e incentivar la producción agrícola en la selva y costa del Perú planteándose el objetivo de evaluar la capacidad antioxidante y la estabilidad térmica en la cáscara, zumo y semilla de lima dulce, limón rugoso y limón tipo mandarina.

Materiales y métodos

Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Análisis de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias, el Centro de Investigación para el desarrollo Biotecnológico de la Amazonia (CIDBAM) de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), ubicada en Tingo María, a 660 msnm, con una temperatura promedio de 25ºC y humedad relativa promedio 80%.

Muestras

Para el presente trabajo se usará las cáscaras,zumos y semillas de citricos (limón rugoso, lima dulce y limon tipo mandarina), proveniente del Distrito de Madre Mia.

Equipos y reactivos

- **Equipos de Laboratorios**

  Espectrofotometro GENESYS UV-V. Balanza analítica, modelo Scout Pro2001 (0.0001 gr). Equipo Micro kjeldahl para la determinación de proteína. Refractómetro: Graduado de 0 a 100% de sacarosa, marca Cral Zeiss Sena, modelo I. Equipo de extracción Soxhlet. pH metro: Con rango de medida del pH de 1 a 14, marca Fisher, tipo Accumet, modelo 800. Destilador Kjeldahl. Refrigeradora

- **Reactivos**

  Agua destilada, Hidróxido de sodio. Ácido sulfúrico. Acetona (C_3H_6O). Ácido acético glacial. Ácido metafosfórico. Ácido nítrico. Hexano (C_6H_{14}). Ácido clorhídrico. Cloroformo. Etanol (C_2H_3O) absoluto y al 96%. Peróxido de potasio. Peróxido de cobre. Acetato de plomo. Oxalato.

Métodos de análisis

Análisis físico-químico de cáscaras, zumos y semilla (limón rugoso, limón tipo mandarina y lima dulce

- pH, método 11.032(1).
- Sólidos solubles, método refractómetro 934.14© (1).
- Acidez titulable, método 942.15(1).
- Sólidos totales, por diferencia de porcentaje de humedades anteriores 2).
- Azucares reductores, método 37.1.52 (inversión) (Ofic.925.36) (1).

Evaluación de la actividad antioxidante

- **Inhibición del radical 1,1 diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH),** método de inhibición del radical DPPH, descrito por Brand-Williams *et al.* (3).
- **Capacidad de inhibir el catión 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline – 6 ácido sulfónico) ($ABTS^{o+}$),** método descrito por Pelligrini *et al.* (4).

Metodología experimental

Caracterización fisicoquímica de las cáscaras, zumo y semillas

Se realizó el análisis fisicoquímico de las cáscaras, zumo y semillas de (limón rugoso, limón tipo mandarina y lima dulce), teniendo en cuenta la madurez del fruto seleccionada, siguiendo los métodos ya descritos en el ítem métodos de análisis (5.4.2).

Preparación de los extractos hidro alcohólicos de las cáscaras, zumo y semillas

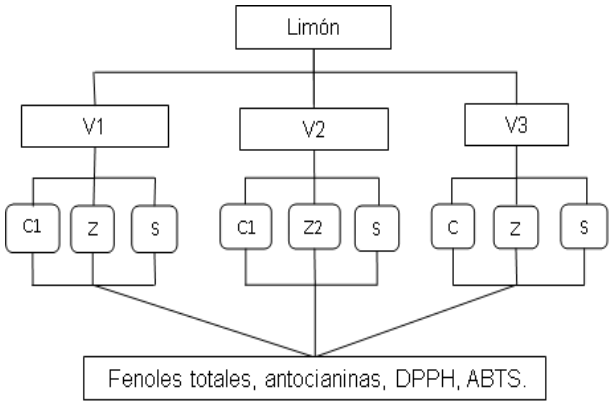
Se realizó la preparación del extracto hidro alcohólicos, una vez obtenida las cáscaras, zumo y semilla de (limón rugoso, limón tipo mandarina y lima dulce), el laboratorio, estas fueron lavadas y separadas de acuerdo a la variedad de cáscaras y semillas se secará en una estufa con sistema de ventilación, para ser molidos con la finalidad de obtener una mejor extracción.

Determinación de estabilidad térmica de la capacidad antioxidante del fruto (cítricos)

Se realizó el análisis de la capacidad antioxidantes de los frutos de la (limón rugoso, limón tipo mandarina y lima dulce), siguiendo los métodos Inhibición del radical 1,1 diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) y Capacidad de inhibir el catión 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline – 6 ácido sulfónico) (ABTS) y vitamina C, se determinará la estabilidad térmica de la capacidad antioxidante.

Diseño experimental

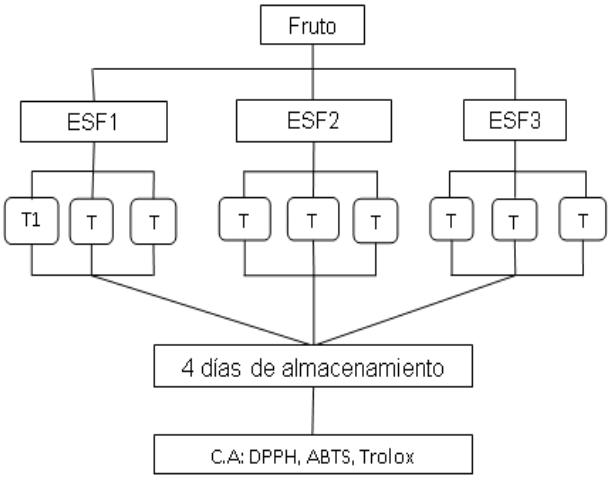
Durante el estudio se emplearon los diseños experimentales para la determinación de fenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de la cáscara, zumo y semillas, frente al radical DPPH y ABTS (Figura1) y evaluación de la estabilidad (Figura 2).



V1, V2 y V3: variedades de limón. C1, Z1 y S3: Cáscara, zumo y semilla C.A.: Capacidad antioxidante con DPPH, ABTS, expresado como equivalentes de Trolox.

Figura 1. Diseño experimental para la determinar la parte del fruto con mayor capacidad antioxidante de (limón rugoso, limón tipo mandarina y lima dulce)

Determinación de la estabilidad térmica de la capacidad antioxidante de limón rugoso, limón tipo mandarina y lima dulce.



ESF1, ESF2 y ESF3: Extractos seleccionados de cada fruto. T1, T2 Y T3: Diferentes temperaturas T1=50, T2=60 y T3=70. C.A= Capacidad antioxidante (DPPH, ABTS, expresados como equivalentes de Trolox).

Figura 2. Diseño experimental para evaluar la estabilidad térmica de la capacidad antioxidante de variedad de fruto de (limón rugoso, limón tipo mandarina y lima dulce)

Análisis estadístico

Determinación del fruto con mayor capacidad antioxidante Se empleará un arreglo factorial 3A x 3B (Figura 1) para determinar la capacidad antioxidante de la cascará, zumo y semilla, con tres repeticiones (DE MENDIBURU, 2007).

$$\mathbf{Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + A * B_{ij} + E_{ij}}$$

Dónde:

Y_{ij} : Es la observación (*i, j*) – esimo: capacidad antioxidante (DPPH, ABTS)
μ : Medio Poblacional
A_i : efecto i - ésimo: variedades de cítricos
B_j : efecto j – ésimo: cáscara, zumo y semillas.
A_ixB_j : Interacción de los factores
E_{ij} : Error experimental.

Los resultados del diseño experimental (Figura 2) para evaluar la estabilidad térmica de la capacidad antioxidante del fruto (cítricos), serán analizados mediante el diseño completo al azar con arreglo factorial (DCA) 3A, 3B, 5C con tres repeticiones (5).

$$\mathbf{Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + A * B_{ij} + E_{ij}}$$

Dónde:

$\boldsymbol{Y_{ij}}$ **:** Es la observación (*i, j*) – esimo: capacidad antioxidante (DPPH, ABTS Y VITAMINA C).

μ : Medio Poblacional
A_i : efecto i - ésimo: diferentes frutos (cítricos).
B_j : efecto j – ésimo: diferentes temperaturas.
A_ixB_j : Interacción de los factores
E_{ij} **:** Error experimental.

Resultados

Recolección, acondicionamiento de las cáscara, semilla y zumo de lima dulce, limón rugoso y limón mandarina

Recolección de la muestra

Se recolectaron 26 unidades de cada variedad entre las 7 a 8 a.m. en el caserío de Meseta, distrito de Shunte provincia de Tocache departamento San Martin cuya coordenada geográfica fue -8,264543-76,643234, luego fueron trasladadas en cajas, hasta el Laboratorio del Centro de Investigación para el Desarrollo Biotecnológico de la Amazonia, para su acondicionamiento y preparación. Las semillas y cáscaras, fueron picadas, secadas, y molidas según Castro-Vázquez *et al*. (6).

Acondicionamiento y preparación de cáscara y semilla de limón rugoso, lima dulce y limón mandarina

Las muestras fueron seleccionadas, lavadas y secadas con papel absorbente. La obtención de las cáscaras y semillas se realizó de forma manual. Las cáscaras fueron cortadas entre 0,4 x 0,4cm, mientras que las semillas se fueron mantenidas intactas para luego ser secadas a 60 °C (estufa-Tomos, USA) hasta obtener un peso constante, posteriormente las muestras fueron pulverizadas y envasadas en bolsas de propileno de alta densidad a temperatura ambiente (6).

Obtención del zumo de limón mandarina, lima dulce y limón rugoso

Los limones pelados y partidos fueron exprimidos de manera manual utilizando un colador para retener partículas extrañas. El jugo obtenido fue llenado en envases de vidrio de color ámbar. La preparación del zumo se detalla en la Figura 3, para cada una de las variedades de cítricos.

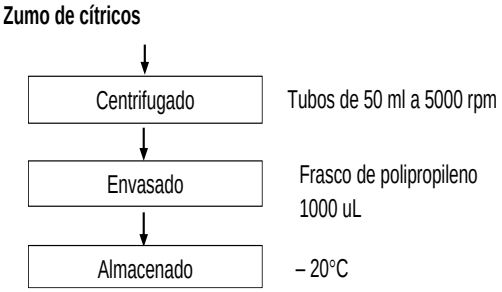


Figura 3. Preparación del zumo de cítricos

Centrifugado: Los zumos de los cítricos se descongelaron y se pusieron en tubos de vidrio de 50 ml el cual fue centrifugado a 5000 rpm por 10 min.

Envasado y almacenado: El zumo sobrenadante fue envasado en frascos de polipropileno y almacenados a -20 ºC, hasta su posterior análisis.

Preparación de los extractos

Preparación del extracto hidroalcohólico de las cáscaras y semillas de limón mandarina, lima dulce y limón rugoso

Se preparó los extractos hidroalcohólicos de las muestras secas y molidas el cual se detalla en la Figura 4.

Extracción hidroalcohólica: Se pesó 1 g de muestra (cáscara y semilla de limón rugoso, lima dulce y limón mandarina) la cual fue colocado en una probeta de 20 mL, luego se adiciono 10 mL de alcohol, 10 mL de agua destilada, solución hidroalcohólica (50/50 v/v), haciendo una concentración de 50 mg/mL. Luego se agito hasta que se homogenizo y se colocó en tubos plásticos de 100 mL, se dejó en agitación en el shaker durante 24 horas.

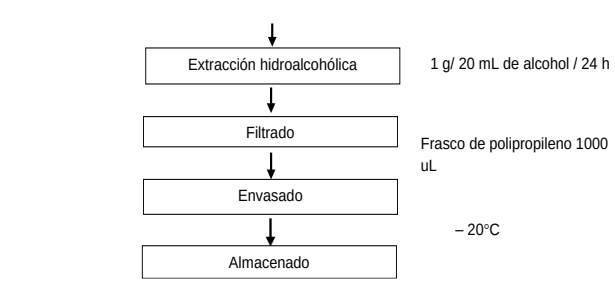


Figura 4. Preparación del extracto hidroalcohólico (50:50).

Filtrado: Se realizó con papel filtro de pasada rápida (whatman) con la finalidad de separar las trazas de las cáscaras y semillas para así obtener un extracto limpio.

Envasado y almacenado: Las muestras de los extractos obtenidos fueron envasadas en frascos de polipropileno de 1 mL. Los frascos fueron almacenados a -20 ºC, hasta su posterior análisis.

Determinación del contenido de fenoles totales

Se desarrolló mediante el método de espectrofotometría de absorción molecular desarrollado por Folin y Ciocalteau *et al*. (7)., reportado por Lagha-Benamrouche *et al*., (8).

Curva estándar de fenoles totales

Para determinar la curva estándar se preparó una solución stock de 10 mL de ácido gálico a una concentración de 100 ug/mL, a partir de esta solución stock se prepararon concentraciones de 10; 25; 50; 75; 100 ug/mL, cada dilución y se hizo la lectura a 740 nm. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 1 y la Figura 4.

Cuadro 1. Datos para determinar la curva estándar de fenoles totales (ug AG/ml)

Concentraciones (ug/ml)	Absorbancia (740 nm)
10	0,068
25	0,198
50	0,397
75	0,613
100	0,814

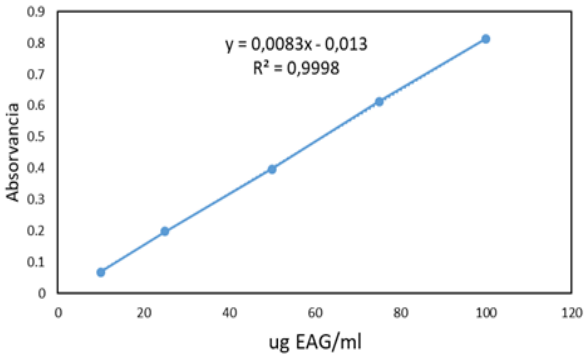


Figura 5. Curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales

Cuantificación de fenoles totales en cáscara, semilla y zumo de lima dulce, limón rugoso y limón mandarina

La cuantificación de fenoles totales en las cáscaras, semillas y zumos de tres variedades de cítricos se realizó partiendo de los extractos hidroalcohólicos y del zumo de estos. A partir de ello se realizó las diluciones de trabajo con 3 repeticiones para cada una de las muestras (cáscara, semilla y zumo de limón rugoso, lima dulce y limón mandarina). Para ello se tomó 100 uL de la muestra, 500 uL de Folin-Ciocalteau diluido 1/10 y finalmente 400 uL de carbonato de sodio al 7,5%. se incubo por 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad, y luego se hizo la lectura en el espectrofotómetro UV/VISIBLE a una longitud de onda de 740 nm. Las absorbancias obtenidas se reemplazaron en la ecuación de la curva estándar y expresadas en (gEAG/100g muestra y gEAG/100 mL muestra). En el Cuadro 2 y Figura 5 se muestran los resultados de la cuantificación de fenoles totales en cáscara,

semilla y zumo de limón rugoso, lima dulce y limón mandarina.

Cuadro 2. Resultados de Fenoles totales del zumo, semilla y cáscara de limón rugoso, lima dulce y limón mandarina

Variedades	Fenoles totales		
	Zumo (g EAG/100mL)	Semilla (g EAG/100g)	Cáscara (g EAG/100g)
Limón mandarina	0,01±0,00	0,31±0,02	0,83±0,01
Lima dulce	0,03±0,00	0,33±0,00	1,08±0,00
Limón rugoso	0,01±0,00	0,19±0,00	0,97±0,01

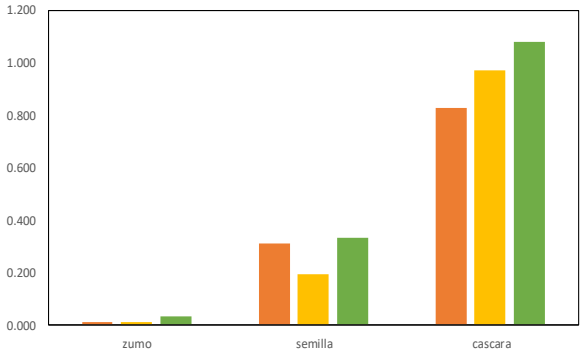


Figura 6. Contenido de fenoles totales en zumo, semilla y cáscara de lima dulce limón rugoso y limón mandarina

Determinación del contenido de Antocianinas

La concentración de antocianina se determinó por el método de pH-diferencial Zapata *et al.* (9). Para ello se tomó una alícuota de los extractos de antocianina y se mezclará con tampón a pH 1,0 de cloruro de potasio 0,025 M (ajustado con ácido clorhídrico) y otra con tampón a pH 4,5 de acetato de sodio 0,4 M (ajustado con ácido acético). La lectura se realizó con una longitud de onda de máxima absorción (510 nm), proporcional al contenido de antocianinas, posteriormente con el propósito de efectuar la corrección de la medida debida a la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes, se midió la absorbancia a 700 nm. contra un blanco de agua ultra pura. La concentración de las antocianinas se expresó como mg cianidina-3-glucósido/100mL muestra seca.

$$A = (A_{510nm} - A_{700\ nm})_{pH1} - (A_{510nm} - A_{700\ nm})_{pH4.5}$$

Para el cálculo la concentración antocianinas, se empleó la formula siguiente:

$$\boldsymbol{PMA}\left(\frac{\boldsymbol{mg}}{\boldsymbol{L}}\right) = \frac{\boldsymbol{A} * \boldsymbol{PM} * \boldsymbol{FD} * \mathbf{1000}}{€ * \mathbf{1}}$$

PMA = Pigmentos monoméricos de antocianinas
PM = peso molecular cianidin 3 glucosido
FD = factor dilucion
€ = absortividad molar (26,900)

A continuación, en el Cuadro 3 se muestran los resultados del contenido de antocianinas en las muestras evaluadas. En el cuadro 3, se observa los resultados del contenido de antocianinas en cáscara, zumo y semilla de lima dulce, limón mandarina y limón rugoso en el que no se detectó la presencia de antocianinas, resultados que concuerdan con Gironés-Vilaplana *et al*. (10).

Cuadro 3. Resultados del contenido de antocianinas totales del zumo, semilla y cáscara de limón rugoso, lima dulce y limón mandarina

Variedades de cítrico	Contenido de Antocianinas equivalentes cianidin- 3glucosido (mg/100g o mL)		
	Zumo	Semilla	Cáscara
Limón mandarina	ND	ND	ND
Lima dulce	ND	ND	ND
Limón rugoso	ND	ND	ND

Determinación de la capacidad antioxidante

Capacidad de Inhibir el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH^{o}+)

Para determinar la capacidad antioxidante se siguió el método de inhibición del radical DPPH^{o+}(1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH^{o+}), descrito por Brand-Williams *et al.*, (11), se preparó 100 ml de solución stock de DPPH^{o+} a 1 mM (0,0394 g de DPPH^{o+} en 100ml etanol al 96%) y se almacenó a 4 ºC protegido de la luz, a partir de este stock, se preparó una solución de trabajo de DPPH^{o+}, (100 uM) que sirvió para hacer reaccionar con las muestras.

La inhibición del radical DPPH^{o+}, partió del extracto hidroalcoholico en el caso de cáscara, semilla y del zumo de los cítricos para el cual se tomó de 25 µl de cada extracto y 975 µl de la solución stock del radical DPPH^{o+}, (100 µM), inmediatamente se procedió a realizar las lecturas de absorbancia a 515 nm cada 30 s por 10 min. La concentración de DPPH^{o+}, en el medio de reacción se calculó a partir de una curva de calibración obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresaron en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox. El antioxidante sintético de referencia Trolox, a concentraciones de 15;10;5; 1; y 0 uM en disolución de agua destilada, se ensaya en las mismas condiciones, expresándose los resultados en TEAC.

Para le determinación de la curva estándar en equivalentes de Trolox se utilizó las siguientes concentraciones que se muestran en el Cuadro 4, datos que se expresan gráficamente en la Figura 7.

Cuadro 4. Datos para determinar la curva estándar de DPPHº+ (uMTEAC/mL)

Concentración uM	Absorbancia residual	Absorbancia inhibida
15	0,321	0,586
10	0,483	0,424
5	0,633	0,274
1	0,865	0,042
0	0,936	-0,029

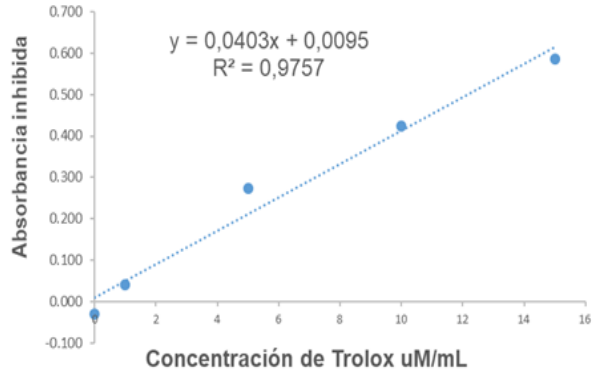


Figura 7. Curva estándar DPPH

El extracto utilizado para el análisis de la cáscara y semilla correspondió a 50 mg/mL, a partir del cual se prepararon diluciones de trabajo de acuerdo a las variedades de cítricos, para el zumo de los cítricos no se hizo extracto se trabajó con muestra fresca centrifugada. En el Cuadro 5 se presentan los resultados de la actividad antioxidante DPPH^{o+}, en función a Trolox.

Cuadro 5. Resultados de la actividad antioxidante DPPHº

variedades de cítricos	Actividad antioxidante		
	Zumo (uMTEAC/mL)	Semilla (uMTEAC/100g)	Cáscara (uMTEAC/100g)
Limón mandarina	432,53 ±39,77	221,89±0,01	714,87±0,03
Lima dulce	602,23±,08	200,72±0,02	730,75±0,03
Limón rugoso	335,60±9,00	257,45±0,06	720,16±0,06

Capacidad de inhibir el radical 2,2-Azinobis (3-etilbenzo-thiazolino-6-ácido sulfónico (ABTSº+)

Se preparó 10 mL de peroxodisulfato de potasio 122,5 mM y 10 ml de una solución de ABTS (7 mM) con agua destilada desionizada, en la solución preparada de ABTS, se agregó 200 uL de solución peroxodisulfato de Potasio e incubados a temperatura ambiente (±25ºC) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{o+}, se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 (±0,1) a 734 nm (longitud de onda de máxima absorción). La inhibición de los radicales ABTS^{o+} es determinado por la decoloración del verde a amarillo, el cual es medido por espectrofotometría a 734 nm. Para el cual se partió del extracto hidroalcoholico y del zumo. En una cubeta de poliestireno se hizo reaccionar 10 uL de muestra con 990 uL de radical ABTS^{o+}, la lectura se realizó en un espectrofotómetro UV/VIS a 734 nm cada 30s por 10 minutos. Método desarrollado por Pellegrini *et al.* (4).

La concentración de ABTSº+, en el medio de reacción se calculó a partir de una curva de calibración obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresaron en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox. El antioxidante sintético de referencia Trolox, a concentraciones de 15; 10; 5; 1 y 0 uM en disolución de agua destilada y se ensaya en las mismas condiciones, expresándose los resultados en TEAC.

Para le determinación de la curva estándar en equivalentes de Trolox se utilizó las siguientes concentraciones que se muestran en el Cuadro 6, datos que se expresan gráficamente en la figura 8.

Cuadro 6. Datos para determinar la curva estándar de ABTSº+ (uMTEAC/mL)

Concentración (uMTEAC/mL)	Absorbancia(734nm)
15	0,463
10	0,326
5	0,155
1	0,033
0	-0,009

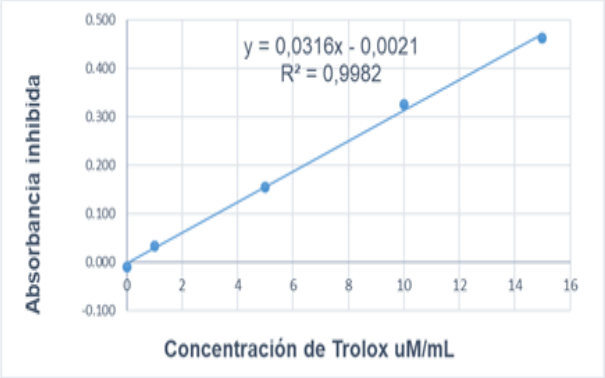


Figura 8. Curva estándar ABTS

El extracto utilizado para el análisis de la cáscara y semilla correspondió a 50 mg/mL, a partir del cual se prepararon diluciones de trabajo de acuerdo a las variedades de cítricos, para el zumo de los cítricos no se hizo extracto se trabajó con muestra fresca centrifugada. En el Cuadro 7 se presentan los resultados de la actividad antioxidante ABTS^{o+}, en función a Trolox.

Cuadro 7. Resultados de la actividad antioxidante ABTSº+

Variedades de cítricos	Actividad antioxidante ABTS^{o+}		
	Zumo uMTEAC/100mL	Semilla uMTEAC/g	Cáscara uMTEAC/g
limón mandarina	72,97±65,03	11,74±0,24	63,73±1,22
lima dulce	301,47±39,87	8,45±0,20	78,18±0,58
limón rugoso	61,35±3,66	12,12±0,19	72,97±0,80

Estabilidad térmica de la capacidad antioxidante de la cáscara, zumo y semilla de cítricos

En los cuadros 8, 9 y 10 se muestran los resultados de la estabilidad térmica de la capacidad antioxidante de los extractos de cáscara, zumo y semilla de las partes de los limones seleccionados.

Cuadro 8. Estabilidad térmica de la capacidad antioxidante de extractos de cáscara de limón rugoso

Temperatura	Tiempo (Días)	Polifenoles Totales g EAG/100 g	DPPH mM TEAC/100 g	ABTS mM TEAC/100 g
60 °C	0	0,932	1,155	6,276
	1	1,004	0,904	12,473
	2	0,745	0,913	7,710
	3	0,677	0,795	6,820
	4	0,814	0,971	9,045
	5	0,952	0,883	7,908
70 °C	0	0,932	1,155	6,276
	1	1,170	1,130	10,940
	2	1,055	0,923	6,309
	3	0,842	0,939	6,869
	4	0,886	1,157	8,254
	5	0,986	1,345	6,902
80 °C	0	0,932	1,155	6,276
	1	0,785	0,225	7,743
	2	0,993	1,252	5,402
	3	0,915	1,143	8,122
	4	0,889	1,839	9,523
	5	1,001	1,054	5,765

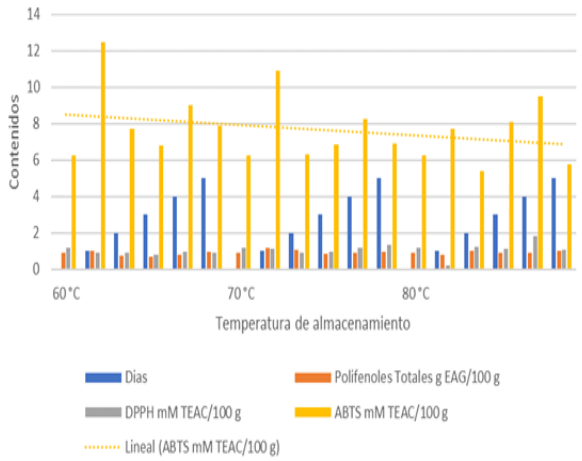


Figura 9. Polifenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH, ABTS), efecto de la temperatura y días de almacenamiento en extractos de cáscara de limón rugoso

Cuadro 9. Estabilidad térmica de la capacidad antioxidante de semilla de limón mandarina (LM)

Temperatura	Tiempo (Días)	Polifenoles Totales g EAG/100 g	DPPH mM TEAC/100 g	ABTS mM TEAC/100 g
60 °C	0	0,147	0,311	1,274
	1	0,154	0,032	1,486
	2	0,142	0,184	1,378
	3	0,131	0,211	1,785
	4	0,147	0,188	1,260
	5	0,157	0,216	0,859
70 °C	0	0,147	0,311	1,274
	1	0,195	0,041	1,823
	2	0,176	0,318	2,689
	3	0,140	0,244	1,076
	4	0,148	0,121	1,282
	5	0,164	0,238	1,057
80 °C	0	0,147	0,311	1,274
	1	0,212	0,056	2,112
	2	0,173	0,188	1,431
	3	0,144	0,095	1,247
	4	0,138	0,127	0,793
	5	0,171	0,224	1,098

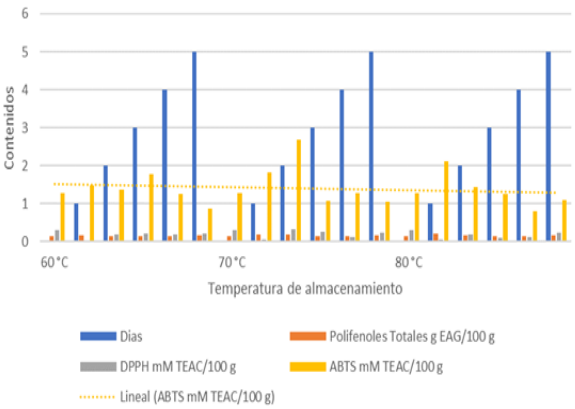


Figura 10. Polifenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH, ABTS), efecto de temperatura y días de almacenamiento en extractos de semilla de LM.

Cuadro 10. Resultados de estabilidad térmica de la capacidad antioxidante del jugo de limón dulce

Temperatura	Tiempo (Días/10)	Polifenoles Totales g EAG/100 g	DPPH mM TEAC/100 g	ABTS mM TEAC/100 g
60 °C	0,0	0,034	0,055	0,270
	0,1	0,021	0,028	0,108
	0,2	0,015	0,005	0,044
	0,3	0,016	0,006	0,132
	0,4	0,016	0,003	0,180
	0,5	0,015	0,002	0,194
70 °C	0,0	0,034	0,055	0,270
	0,1	0,021	0,020	0,051
	0,2	0,032	0,050	0,197
	0,3	0,033	0,084	0,563
	0,4	0,037	0,080	0,380
	0,5	0,039	0,080	0,194
80 °C	0,0	0,034	0,055	0,270
	0,1	0,021	0,018	0,232
	0,2	0,030	0,036	0,182
	0,3	0,033	0,083	0,544
	0,4	0,036	0,083	0,636
	0,5	0,039	0,080	0,424

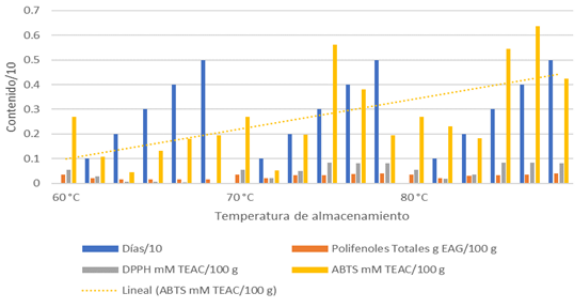


Figura 11. Polifenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH, ABTS), efecto de la temperatura y días de almacenamiento en el jugo de limón dulce

Discusión

Cuantificación de fenoles totales en cáscara, semilla y zumo de lima dulce, limón rugoso y limón mandarina

Los resultados que se muestran en el Cuadro 2, indican el contenido de fenoles en el zumo de limón

mandarina, lima dulce y limón rugoso con 0,01±0,00; 0,03±0,00; 0,01±0,00 gEAG/100ml de muestra respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por XUN *et al*. (2017), 535 mgEAG/L en naranja navel 115 mgEAG / L, clementina 482 mgEAG/ L. Sin embargo, se informó que los híbridos de mandarina cultivados en China tenían niveles más altos de fenoles que variaban entre 0,0775-0,156 gAGE/100ml (12).

El contenido de fenoles totales en semilla de limón mandarina *fue* 0,31±0,02 gAGE/100g muestra, lima dulce con 0,33±0,00 gAGE/100 g muestra, mientras que limón rugoso fue de 0,19±0,00 g AGE/100g muestra. Todos estos resultados fueron mucho más bajos a los obtenidos con la cáscara y el zumo, por (XU *et al*., 2008), pero el contenido de fenoles en la cáscara de lima dulce, limón mandarina y limón rugoso fue de 1,08±0,00; 0,83±0,01 y 0,97±0,01 g AGE/100g muestra respectivamente; los cuales concuerdan con las investigaciones realizadas por Ordoñez-Gómez *et al*. (13).

Determinación de la capacidad antioxidante

En el cuadro 5, se muestran los resultados de capacidad antioxidante de zumo de limón mandarina, lima dulce y limón rugoso con 432,53 ±39,77; 602,23±,08; 335,60±9,00uMTEAC/mL de muestra respectivamente. Los cuales son más altos a los cítricos clementine mandarin, navel Orange y satsuma mandarin con 212 ± 71,8; 313 ± 41,8; 366 ± 47,7uMTEAC/mL de muestra identificados por (HUNLUN, *et al*., 2017). La capacidad antioxidante en semillas de limón mandarina, lima dulce y limón rugoso fueron de 221,89±0,01; 200,72±0,02; 257,45±0,06 uMTEAC/100g de muestra seca y en cáscaras fueron 714,87±0,03; 730,75±0,03; 720,16±0,06 uMTEAC/100g de muestra seca sucesivamente las cuales fueron similares a los resultados encontrados por (BARROS *et al*., 2012) con resultados de (456,7 ± 15,7 uM de trolox equivalente / 100 g de m.s,) hasta (825,4 uM de trolox equivalente / 100 g de m.s. para DPPH).

La capacidad antioxidante en función trolox mediante el ABTS $^{\circ+}$ fue mayor que el DPPH $^{\circ+}$ obteniendo como resultados en zumo, semilla y cáscara de limón mandarina, lima dulce y limón rugoso los siguientes datos zumo (72,97±65,03; 301,47±39,87; 61,35±3,66 uMTEAC/100mL de zumo), semilla (11,74±0,24; 8,45±0,20; 12,12±0,19 uMTEAC/g de muestra seca) y cáscara (63,73±1,22; 78,18±0,58; 72,97±0,80 uMTEAC/g de muestra seca); estos resultados fueron similares a los obtenidos por Barreca *et al.* (14).

Estabilidad térmica de la capacidad antioxidante de la cáscara, zumo y semilla de cítricos

Los resultados del Cuadro 8, representados en la Figura 8, nos muestran que los contenidos de polifenoles totales y la capacidad antioxidante expresada como radical DPPH, presentaron estabilidad térmica frente al efecto de las temperaturas de 60, 70 y 80 ºC, durante los cinco días de almacenamiento. Se apreció también que la capacidad antioxidante expresada como radical ABTS, mostró una tendencia a disminuir frente al efecto de la temperatura y los días de almacenamiento. Estos resultados fueron coincidentes con lo reportado por Santander *et al*. (15), quienes determinaron que en una bebida mixta de leche UHT descremada con pulpa de tomate de árbol, los contenidos de polifenoles, antocianinas, disminuyeron durante el almacenamiento, disminuyendo la capacidad antioxidante de la bebida en un rango de 3,450±0,041 a 1,581±0,025 mM/L de Trolox.

Los resultados del Cuadro 9, representados en la Figura 9, nos muestran que los contenidos de polifenoles totales y la capacidad antioxidante expresada como radical DPPH, presentaron estabilidad térmica frente al efecto de las temperaturas de 60, 70 y 80 ºC, durante los cinco días de almacenamiento. Se apreció también que la capacidad antioxidante expresada como radical ABTS, mostró una tendencia a disminuir frente al efecto de la temperatura y los días de almacenamiento. Este comportamiento de disminución de la capacidad antioxidante con el radical ABTS, no coincide con lo reportado por Flores- Aguilar y Flores-Rivera.(16), quienes investigaron bebidas de maíz morado (*Zea mays* L.) y uña de gato (*Uncaria tomentosa sp*), y determinaron que los fenoles totales y capacidad antioxidante mostraron estabilidad con respecto al tiempo en el periodo evaluado, independientemente de la temperatura de almacenamiento; esto se debe posiblemente a que los compuestos químicos responsables, fueron diferentes ya que fueron muestras diferentes.

Los resultados del Cuadro 10, representados en la Figura 10, muestran que el contenido de polifenoles totales, presentó estabilidad térmica frente al efecto de las temperaturas de 60, 70 y 80 ºC, durante los cinco días de almacenamiento; con una tendencia a incrementarse conforme transcurrían los días. La capacidad antioxidante expresada como Trolox equivalente de los radical DPPH y ABTS, presentaron una tendencia a incrementarse durante los días de almacenamiento. Rekha *et al*. (17) encontraron que la capacidad antioxidante de los zumos de fruta estaba directamente relacionada con el contenido de fenólicos totales y vitamina C en algunas especies de Cítricos. La capacidad antioxidante total de los extractos de plantas está influenciada por su composición química y el contenido de antioxidantes. Diferentes componentes en extractos de plantas contribuyen de manera desigual a su capacidad antioxidante total (18). En tal sentido, existe la posibilidad de sinergia y la existencia de precursores de compuestos antioxidantes.

Referencias bibliográficas

1. AOAC. Official Methods of analysis of AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International; Agricultural Chemicals, Foods, Contaminants and Drugs. V1 y V2 Arlington: A.O.A.C. Inc. 1997.
2. Hart F, Fischer H. Análisis moderno de los alimentos. España: Zaragoza: Ed. Acribia; 1977.
3. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT Food Sci Technol. 1195; 28(1): 25-30.
4. Pelligrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans, C. Screening of Dietary Carotenoides and Carotenoid-Rich Fruit Extracts of Antioxidant Activities Applying 2,2-Azinobis (3-Ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) Radical Cation Decolorization Assay. Methods in Enzymology. 1999; 299: 379 – 391.
5. De Mendiburu F. Notas sobre el curso: Estadística Aplicada a la FORESTERÍA II. Universidad Nacional Agraria la Molina. 2007.
6. Castro-Vázquez L, Alañón M, Rodríguez-Robledo V, Pérez-Coello M, Hermosín-Gutierrez I, Díaz-Maroto M, Jordán J, Galindo M, Arroyo-Jiménez M. Bioactive flavonoids, antioxidant behaviour and cytoprotective effects of dried grapefruit peels (*Citrus paradisi* Macf.). Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016; 1: 1-12.
7. Folinn C, Ciocalteau V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins.J. Biol. Chem**.** 1927; 73: 627-650.
8. Lagha-Benamrouche S, Madani K. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*C. sinensis* L. and *C. aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. Industrial Crops and Products. 2013; 50: 723-730.
9. Zapata L, Heredia A, Quinteros C, Malleret A, Clemente G, Cárcel J. Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. Ciencia, docencia y tecnología. 2014; 49: 166-192.
10. Gironés-Vilaplana A, Mena P, García-Viguera C, Moreno D. A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (Aristotelia chilensis) and lemon juice. LWT - Food Science and Technology .2012; 47(2): 279-286.
11. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, LebensmittelWissenchaft und Technologie. 1995; 28(1), 25-30.
12. Xu G, Chen J, Liu D, Zhang Y, Jiang P, Ye, X. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. Journal of Food Science. 2008; 73(1): 11-18.
13. Ordoñez-Gómez E, Reátegui-Díaz D, Villanueva-Tiburcio J. Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Scientia Agropecuaria*. 2018; 9(1), 113-121.
14. Barreca D, Bellocco E, Caristi C, Leuzzi U, Gattuso G. Distribution of C- and O-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl) glycosyl flavanones and furocoumarins in *Citrus aurantium L*. juice. *Food Chemistry*, 2011; 124, 576-582.
15. Santander M, Osorio O, Mejía-España D. Evaluación de propiedades antioxidantes y fisicoquímicas de una bebida mixta durante almacenamiento refrigerado. Rev. Cienc. Agr. 2017; 34(1):84 - 97. http://dx.doi.org/10.22267/rcia.173401.65.
16. Flores-Aguilar E, Flores-Rivera E. Estabilidad de Antocianinas, Fenoles totales y Capacidad Antioxidante de Bebidas de Maíz Morado (*Zea mays L*.) y Uña de Gato (*Uncaria tomentosa* sp). *Información tecnológica*. 2018. *29*(2): 175-184. https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642018000200175.
17. Rekha C, Poornima G, Manasa M, Abhipsa V, Devi J, Kumar H, Kekuda T. Ascorbic Acid, Total Phenol Content and Antioxidant Activity of Fresh Juices of Four Ripe and Unripe Citrus Fruits. Chemical Science Transactions. 2012; 1(2): 303–310. doi:10.7598/cst2012.182.
18. Zou Z, Xi W, Hu Y, Nie C, Zhou Z. Antioxidant activity of Citrus fruits. Food Chemistry, 2016; 196: 885–896.