



Valorización de la cáscara de cítricos como fuente de antioxidantes para la industria alimentaria mediante el empleo de procesos de extracción no convencionales

Gabriela Franco Arnedo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá D. C., Colombia

2019

Valorización de la cáscara de cítricos como fuente de antioxidantes para la industria alimentaria mediante el empleo de procesos de extracción no convencionales

Gabriela Franco Arnedo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería Química

Director:

Ph.D., Químico Fabián Parada Alfonso

Codirector:

Ph. D., M. Sc., Ingeniero Químico Hugo Martínez Correa

Línea de Investigación:

Biorefinerías

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Química de Alimentos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D. C., Colombia

2019

A mis padres.

Agradecimientos

A todos los integrantes del grupo de investigación en Química de Alimentos del Departamento de Química de la Universidad Nacional, profesores, estudiantes e investigadores, por su apoyo.

Al proyecto “Evaluación de tecnologías innovadoras para el manejo integral de los cultivos de mango, naranja y mandarina en zonas productoras del Departamento de Cundinamarca”, ejecutado por la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Sede Bogotá y apoyado por el Convenio Especial de Cooperación Derivado 2. Corredor Tecnológico Agroindustrial - CTA, “INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA EN EL SECTOR AGROPECUARIO Y AGROINDUSTRIAL CON EL FIN DE MEJORAR TODO EL DEPARTAMENTO, CUNDINAMARCA, CENTRO ORIENTE” con financiación de recursos del Sistema General de Regalías, de la Secretaría de Ciencia y Tecnología del Departamento de Cundinamarca, la Secretaria Distrital de Desarrollo Económico de Bogotá D.C. y contrapartidas de la Universidad Nacional de Colombia y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA, por el apoyo económico brindado y facilitar las muestras de trabajo.

Al profesor Diego Miranda Lasprilla, por la oportunidad de participar en el marco del Corredor Tecnológico Agroindustrial, así como por su asesoría.

A Rogelio Rodríguez y Luis Alfonso Acero Estrada por su apoyo logístico a lo largo del desarrollo del proyecto.

A los profesores Fabián Parada Alfonso y Hugo Martínez Correa, por compartir su experiencia y enseñanzas.

A Luis Miguel Buelvas Puello, por su compañía a lo largo de estos años.

A todos los compañeros de laboratorio, especialmente a Mónica Ospina, Mary Lucía Inampué, Paola Ortega, Diego Ballesteros, Katherine Montaña, Clara Peña, Fabio Cuéllar, Heiner Toloza y Andrés Felipe García Ocampo.

Resumen

El contenido de diferentes tipos de compuestos (fenólicos, flavanonas, carotenoides) en los epicarpios de dos cítricos (naranja tangelo-*Citrus reticulata* x *C. paradisi*, mandarina "Arrayana"-*C. reticulata*) fue determinado en extractos Soxhlet con el propósito de escoger la biomasa más promisoría. Dicha biomasa fue sometida a extracción con fluidos supercríticos (EFS), con miras a evaluar la posibilidad de obtener extractos con actividad antioxidante. El epicarpio de *C. reticulata* presentó mayor actividad antioxidante, con esta biomasa se realizó un diseño central compuesto para determinar el efecto de las variables del proceso de EFS (temperatura-T, presión-P, porcentaje de cosolvente-%EtOH) sobre las variables respuesta (contenido total de compuestos fenólicos-CTF, contenido total de flavanonas-CTFo y actividad antioxidante-AA, medida como la capacidad de atrapamiento de radicales DPPH). Al comparar la EFS contra Soxhlet se observó que EFS presentó menor rendimiento (10 vs 22%), mayores CTF (>100 vs <40 mg-eq AG/g extracto), CTFo (>3 vs <1 mg-eq naringina/g extracto) y porcentajes de inhibición (cerca de 90% vs < 30%). La temperatura fue la variable que más influyó el CTF y CTFo, los cuales correlacionaron linealmente con la AA (coeficiente de correlación 0.88). La curva cinética del extracto más activo (extracto 11, obtenido a 220 bar, 80°C, 5% EtOH) fue ajustada al modelo de transferencia de masa de Sovová, con un R^2 de 0.87.

Los extractos EFS se analizaron por cromatografía líquida (UHPLC-DAD), identificando tentativamente ocho flavonoides. Al realizar el análisis de componentes principales (ACP) no se observó efecto importante de alguno de los componentes identificados sobre el CTF, CTFo y la AA, sin embargo se confirmó que el CTF y CTFo presentan un efecto positivo e importante sobre la AA. Empleando HPLC/MS se cuantificó el contenido de hesperidina (polifenol mayoritario en mandarina) en el extracto más activo, obteniendo 0.66 mg/g extracto. Dicho extracto se probó como antioxidante en una emulsión (mayonesa), monitoreando la peroxidación lipídica por TBARS vs el tiempo de almacenamiento, logrando atenuar un 30% la peroxidación lipídica de la mayonesa almacenada a 60°C por seis días. Lo anterior permite plantear la posibilidad de obtener

extractos con actividad antioxidante a partir del epicarpio de mandarina "Arrayana" empleando EFS, dichos extractos pueden ser aprovechados por la industria de alimentos.

Palabras clave: Epicarpio de mandarina, fluidos supercríticos, oxidación lipídica, emulsión, flavonoides, UHPLC-DAD, modelo de Sovová.

Abstract

The content of different types of compounds (polyphenols, flavanones, carotenoids) in the peels of two citrus fruits (tangelo orange-*Citrus reticulata* x *C. paradisi*, mandarin var. 'Arrayana' -*C. reticulata*) was determined in Soxhlet extracts for the purpose of choosing the most promising biomass. This biomass was subjected to supercritical fluid extraction (SFE), to evaluate the possibility of obtaining extracts with antioxidant activity. The peel of *C. reticulata* presented greater antioxidant activity. With said biomass a central composite design was made to determine the effect of the SFE process variables (T-temperature, P-pressure, percentage of cosolvent-% EtOH) on the response variables (total phenol content (TPC), total flavanone content (TFC) and antioxidant activity-AA, measured as the scavenging capacity of DPPH radicals). When comparing the SFE against Soxhlet it was observed that SFE presented lower yield (10 vs 22%), higher TPC (> 100 vs <40 mg-eq AG / g extract), TFC (> 3 vs <1 mg-eq naringin / g extract) and percentages of inhibition (close to 90% vs <30%). Temperature was the variable that most influenced TPC and TFC, which correlated linearly with the AA (correlation coefficient 0.88). The kinetic curve of the most active extract (extract 11, obtained at 220 bar, 80 ° C, 5% EtOH) was adjusted to the mass transfer model of Sovová ($R^2 = 0.87$).

The SFE extracts were analyzed by liquid chromatography (UHPLC-DAD), tentatively identifying eight flavonoids. When carrying out the principal component analysis (PCA), no significant effect of any of the components identified on CTF, CTFO and AA was observed, however it was confirmed that CTF and CTFO present a positive and important effect on AA. Using HPLC / MS the content of hesperidin (major polyphenol in mandarin) in the most active extract was quantified, obtaining 0.66 mg / g extract. Said extract was tested as an antioxidant in an emulsion (mayonnaise), monitoring the lipid peroxidation by TBARS vs the storage time, achieving a 30% attenuation of the lipid peroxidation of the mayonnaise stored at 60°C for six days. This allows us to set the possibility of obtaining extracts with antioxidant activity from the 'Arrayana' mandarin peel using SFE. Said extracts can be used by the food industry.

Keywords: Mandarin peel, supercritical fluids, lipid oxidation, emulsion, flavonoids, TBARS, UHPLC-DAD, Sovová model.

Contenido

Resumen.....	IX
Introducción.....	15
1. Marco teórico.....	21
1.1 El cultivo de cítricos.....	21
1.1.1 Naranja Tangelo (<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus paradisi</i>)	22
1.1.2 Mandarina (<i>Citrus reticulata</i>).....	22
1.2 Residuos cítricos.....	23
1.2.1 Valorización de residuos cítricos.....	24
1.3 Compuestos polifenólicos.....	26
1.3.1 Extracción de compuestos polifenólicos	28
1.3.2 Métodos espectrofotométricos para cuantificación de polifenoles.....	30
1.3.3 Identificación de polifenoles en cítricos por cromatografía líquida.....	31
1.4 Carotenoides en cítricos.....	32
1.5 Determinación <i>in-vitro</i> de la capacidad antioxidante.....	33
1.5.1 Medidas indirectas.....	34
1.5.2 Medidas directas.....	34
1.6 Modelamiento de la cinética de EFS: Modelo BIC	36
1.6.1 Ecuaciones	37
1.6.2 Curva cinética y ajuste de datos	38
2. Metodología	40
2.1 Tipo de investigación y recolección de información	40
2.2 Preparación de la muestra	40
2.3 Extracción Soxhlet.....	40
2.4 Extracción con CO ₂ supercrítico y EtOH.....	41
2.5 Diseño experimental.....	42
2.6 Variables de respuesta.....	44
2.6.1 Contenido Total de Compuestos Fenólicos.....	44
2.6.2 Contenido Total de Flavanonas	44
2.6.3 Contenido Total de Carotenoides	45
2.6.4 Actividad antioxidante <i>in-vitro</i> de los extractos.....	45
2.6.5 Rendimiento	45
2.7 Análisis de superficie de respuesta	46
2.8 Adición de extracto promisorio a una mayonesa	46
2.9 Análisis estadístico.....	47
2.10 Cromatografía líquida.....	47
2.11 Ajuste de datos de curva cinética a modelo BIC.....	48
2.11.1 Función objetivo y restricciones	49
3. Análisis y discusión de resultados	52
3.1 Extracción Soxhlet.....	52
3.2 Curva de extracción	56
3.3 Extracción con fluidos supercríticos	57
3.3.1 Metodología de superficie de respuesta	61
3.4 Adición del mejor extracto a una mayonesa	63

3.4.1	Cuantificación de TBARS	63
3.5	Análisis por LC de los extractos obtenidos por EFS.....	65
3.5.1	Espectrometría de masas para extracto 11	71
3.5.2	Análisis de componentes principales para los extractos analizados	73
3.6	Modelamiento de la cinética de extracción.....	76
4.	Conclusiones y recomendaciones	79
4.1	Conclusiones	79
4.2	Recomendaciones	81
	Bibliografía.....	82
	Anexos.....	96

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Naranja tangelo (<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus paradisi</i>).....	22
Figura 1-2: Mandarina (<i>Citrus reticulata</i>) var. 'Arrayana' parcialmente pelada.....	23
Figura 1-3: Estructura general de los flavonoides.....	26
Figura 1-4: Flavanonas.....	27
Figura 1-5: Algunas polimetoxiflavonas representativas de los cítricos.....	28
Figura 1-6: Montaje equipo Soxhlet.....	28
Figura 1-7: Reacción de polifenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu.....	30
Figura 1-8: Reacción con dinitrofenilhidracina para producir una hidrazona.....	31
Figura 1-9: Formula química de los carotenoides más abundantes en cítricos.....	33
Figura 1-10: Reducción del radical DPPH en presencia de un antioxidante.....	34
Figura 1-11: Reacción de Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) con malondialdehído (MDA).....	35
Figura 1-12: Diagrama del modelo BIC.....	36
Figura 2-1: Esquema de la extracción Soxhlet con codificación de los extractos.....	41
Figura 2-2: Sistema de extracción con fluidos supercríticos.....	42
Figura 2-3: Algoritmo de cálculo para el modelo cinético de Sovová.....	51
Figura 3-1: Contenido de metabolitos en las biomasas de estudio.....	54

Figura 3-2: Rendimiento de los extractos Soxhlet.....	55
Figura 3-3: Curva de extracción de epicarpio de mandarina con CO ₂ supercrítico y EtOH como co-solvente (120 bar, 50°C, 5% de EtOH).....	56
Figura 3-4: Variables de respuesta de los extractos obtenidos por EFS.....	58
Figura 3-5: Diagrama de Pareto del efecto estandarizado para la AA.....	62
Figura 3-6: Sólido de respuesta para el diseño experimental factorial compuesto que optimiza la respuesta para la actividad antioxidante.....	62
Figura 3-7: Cuantificación de TBARS para el extracto obtenido por EFS.....	64
Figura 3-8: Cromatograma del extracto más activo (extracto EFS 11).....	66
Figura 3-9: Espectros UV de los componentes de los extractos EFS.....	69
Figura 3-10: Estructura química de los flavonoides identificados tentativamente.....	70
Figura 3-11: (A) Señal cromatográfica encontrada. (B) Señal cromatográfica del patrón hesperidina.....	72
Figura 3-12: Espectro de masas de la señal obtenida.....	72
Figura 3-13: Curva de calibración de hesperidina.....	73
Figura 3-14: Gráfica del ACP.....	74
Figura 3-15: Ajuste de los datos experimentales obtenidos con el modelo de Sovová...77	77

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Diseño experimental.....	43
Tabla 2-2: Método de elución en gradiente HPLC/MS.....	48
Tabla 2-3: Datos de entrada del modelo.....	49
Tabla 3-1: Resultados de la extracción Soxhlet.....	55
Tabla 3-2: Contenido de metabolitos y actividad antioxidante para extractos EFS.....	60
Tabla 3-3: Resultados de TBARS para el extracto obtenido por EFS.....	63
Tabla 3-4: Información de los picos cromatográficos tentativamente identificados.....	67
Tabla 3-5: Áreas de los picos de interés para los extracto EFS.....	68
Tabla 3-6: Componentes con porcentaje acumulado de varianza.....	73
Tabla 3-7: Tabla de pesos en cada componente.....	75
Tabla 3-8: Resultados de la curva cinética experimental.....	76

Introducción

Los cítricos, incluyendo naranjas, mandarinas, limones, toronjas son cultivos permanentes, susceptibles de adaptarse a diferentes climas, por lo que constituyen un cultivo importante a nivel mundial. Este cultivo se caracteriza porque su producción es permanente a través de todo el año, con épocas marcadas de concentración de la cosecha, según sea la distribución de la precipitación. Este fenómeno ocasiona sobreproducción del fruto, que conlleva a una disminución en su precio de venta y pérdidas económicas para los agricultores. De acuerdo a lo anterior, se hace necesario la exploración de alternativas que permitan aprovechar esta sobreoferta de fruta en la obtención de productos de alto valor agregado [1-3].

En Colombia, el cultivo de los cítricos también es relevante, debido a que, entre los frutales (con excepción de banano y plátano) poseen mayor participación en área cosechada (10%) [4]. Los cítricos son altamente consumidos por la población por ser una fuente de vitaminas, minerales y fibra dietaria [5]. Cundinamarca, Tolima, Santander y Valle del Cauca producen el 50% de los cítricos de Colombia. Cundinamarca produce el 18% de ese total [6]. Entre las especies que más se comercializan se encuentra el tangelo (*C. reticulata* x *C. paradisi*) en sus variedades 'Mineola' y 'Orlando', que son apetecidas naranjas de mesa por su sabor dulce y su atractiva presentación externa. Cundinamarca produjo 11175 toneladas de este fruto en 2014 [7]. Otra de las especies relevantes de cítricos en el país es la mandarina (*C. reticulata*), variedades "Oneco" y "Arrayana", la cual ha presentado un aumento creciente en su producción desde el 2009, alcanzando en el 2014 las 131541 toneladas anuales, donde Santander y Cundinamarca son los principales productores con 106303 y 10792 toneladas al año, respectivamente [7]. Debido a su relevancia para el país y a nivel mundial, se escogen estas especies del género citrus, cultivadas en Cundinamarca como objeto de estudio en la presente investigación.

Cerca de un 60% de los cítricos se consumen en el mercado de productos frescos, y aproximadamente un 40% es procesado. De los frutos cítricos que son transformados, el 81.9% corresponde a naranjas y el 6.8% a mandarinas [8]. De esta actividad se estima que cada año, de acuerdo con la producción mundial de cítricos, se estarían produciendo alrededor de 40 millones de toneladas en residuos, donde el principal producto de desecho que se genera es la cáscara, que representa aproximadamente un 50% del peso fresco de la fruta [9]. Se ha reportado que la disposición directa de estos residuos sin un procesamiento adecuado causa problemas ambientales, por lo que se hace importante darle un tratamiento adecuado en las industrias alimenticias y siguiendo esta premisa, las investigaciones actuales se han enfocado en métodos para explotar completamente los distintos desechos generados por esta industria [9, 10].

La cáscara de los cítricos, es destinada principalmente a la producción de aceites esenciales, compost, alimentación animal y gasificación [9, 11]. Por ejemplo, en el mundo, el principal aceite esencial de cítricos comercializado es el de naranja (250000 ton en 2014 [12] cuyo precio puede estar entre 0.7-3.3 USD/Kg [8]. Sin embargo, estas aplicaciones no representan una alternativa para la alta valorización de este residuo, de acuerdo con el potencial que este podría tener. Recientemente, los cítricos han sido estudiados en la búsqueda de otros componentes que si bien no hacen parte de la nutrición son metabolitos secundarios con actividad biológica, como los ácidos fenólicos, flavanonas (un tipo de flavonoides) y carotenoides, que podrían evitar el desarrollo de enfermedades crónicas, y cuyo mecanismo consiste en el atrapamiento de radicales libres, protegiendo al organismo de modificaciones en células y tejidos, asociadas a enfermedades degenerativas, como arterioesclerosis y cáncer [13].

Estas características han convertido a este tipo de metabolitos (principalmente a los de origen natural) en sustancias de demanda creciente por muchos consumidores en todo el mundo, otorgándoles un alto valor de comercialización [14]. Específicamente, los flavonoides han sido estudiados en sus actividades anti-cáncer, antiinflamatorias, antibacteriales, antioxidantes *in-vitro* e *in-vivo*, con animales [15-17] y actividad protectora contra enfermedades vasculares en humanos [18-20].

En los cítricos, los flavonoides se concentran en la cáscara, específicamente en el albedo e incluso se ha reportado que de los desechos sólidos generados en la industria de jugos, la cáscara concentra mayor cantidad de antioxidantes, comparado con la parte carnosa de la fruta [9, 16] y a las frutas peladas [21]. Así mismo, los antioxidantes presentes en extractos de cítricos han sido probados como efectivos inhibidores de la oxidación en las matrices alimenticias grasas, resultando una alternativa promisoría frente al uso de antioxidantes sintéticos.

Para la extracción de este tipo de compuestos bioactivos se han explorado distintos procesos que permitan obtener alto rendimiento y selectividad para los compuestos de interés, como los procesos de extracción con fluidos a alta presión, en reemplazo de las tecnologías clásicas que pueden degradar los polifenoles debido a la alta temperatura empleada o los largos tiempos de extracción [22].

En la extracción con fluidos supercríticos se lleva el disolvente a temperaturas y presiones superiores a su punto crítico, con lo cual se puede tener el alto poder de solvatación de los líquidos y la alta difusividad de los gases, permitiendo una mayor interacción con la matriz del soluto y favoreciendo selectivamente, de acuerdo a ciertas condiciones de presión y temperatura, la extracción de los analitos de interés. El fluido supercrítico más utilizado es el CO₂ dado que presenta condiciones críticas fáciles de alcanzar (72.8 bar y 304 K), es económico, no tóxico, ni inflamable. No obstante, el CO₂ es un disolvente lipofílico, lo que limita su aplicación a la extracción de moléculas de baja polaridad. Es por esto que, en algunas ocasiones, se adicionan pequeñas cantidades de modificadores (<10%), con el fin de incrementar ligeramente la polaridad del CO₂ [23]. Para aplicaciones en alimentos se hace necesario utilizar modificadores GRAS (por sus siglas en inglés, Generally Recognized As Safe), es decir, que sean aptos para el consumo humano, como el etanol o el agua. En cítricos, previamente se ha reportado la extracción con CO₂, a partir de cáscaras de *Citrus junos*, utilizando mezclas de agua/etanol como co-solvente, favoreciéndose la extracción de hesperidina con una proporción agua/etanol de 20:80 y a una temperatura de 120 °C, puesto que a 160 °C ocurriría una degradación de los flavonoides [24]. En otro trabajo se reporta extracción de flavanonas con cáscaras de *Citrus genkou* con CO₂ supercrítico, en donde se obtuvo que el rendimiento de extracción de hesperidina se incrementa significativamente a presiones de 300 bar [25].

Además de las variables temperatura y la presión, se encuentra el tiempo óptimo de extracción, el cual determina el punto en el cual el solvente agota el analito presente en la matriz y que puede reducirse o ampliarse al cambiar la temperatura y la presión. Esta relación rendimiento vs. tiempo puede modelarse a través de un estudio de la cinética de difusión entre el analito, la matriz y el solvente presurizado. Dichos modelos resultan útiles al realizar la simulación de un proceso para su escalamiento o para la aplicación de una metodología de optimización con el fin de encontrar las variables o el diseño óptimo que convierte un proceso en una alternativa rentable [26]. A pesar de que en la literatura existe una cantidad importante de modelos desarrollados, de acuerdo a lo expuesto en el artículo de revisión realizado por Huang et al. [26], no se han encontrado datos experimentales que permitan ajustar la difusividad efectiva del soluto, ni reportes sobre el modelamiento de la cinética de extracción de flavanonas, lo que no hace posible actualmente evaluar si alguno de los modelos ya desarrollados permiten predecir el comportamiento de la cinética de estos procesos de extracción.

1. Marco teórico

1.1 El cultivo de cítricos

Los cítricos son originarios de Asia y el archipiélago malayo y pertenecen a la familia de las Rutáceas. Solo tres géneros poseen importancia comercial: *Poncirus*, *Fortunella* y *Citrus* [27].

El género *Citrus*, incluye algunas de las frutas más importantes a nivel mundial. En general, los cítricos son el tercer cultivo frutal más importante del mundo después de la manzana y el banano [28], con una producción a nivel mundial de cerca de 92 millones de toneladas anuales (incluyendo los cultivos de naranja, mandarina, limones, limas y pomelo), donde Brasil, China y Estados Unidos se destacan como los principales productores [29].

Son cultivos permanentes, con una vida entre 30 y 40 años. Éstos requieren de lluvias repartidas durante todo el año, en caso contrario es necesario recurrir al riego, y tienen escasa resistencia al frío. Normalmente, crecen entre los 0 m y los 1600 m de altitud, a temperaturas medias de 23°C a 34°C, pluviosidades acumuladas anuales de 900 mm a 1200 mm y luminosidad mayor a 1900 horas de brillo solar anual, especialmente en los procesos de floración y fructificación [8, 30].

Colombia, debido a su variedad de pisos térmicos, presenta las condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo de este cultivo, por lo que el cultivo de los cítricos es relevante, debido a que, entre los frutales (con excepción de banano y plátano) es el que posee mayor participación en el área cosechada, con un 5.6% [31].

1.1.1 Naranja Tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*)

La naranja tangelo (*C. reticulata* x *C. paradisi*) es un híbrido entre mandarina y toronja o pomelo. Los primeros cruces fueron hechos por W.T. Swingle en Florida-1897 y por H.J. Webber en California-1898. Su tamaño varía desde el de una naranja dulce hasta el de una toronja. El fruto, achatado a redondo, tiene una cáscara que se remueve fácilmente; la pulpa es normalmente colorida, dulce y jugosa. Por lo general no posee semillas (Figura 1-1) [32], por lo que es muy apetecida. Las variedades más comercializadas en Colombia son “Orlando” y “Minneola” [8]; la primera es resultado de polinizar toronja “Bowen” con mandarina “Dancy” (actividad realizada por primera vez por el Dr. Swingle-1911), la segunda es un híbrido entre pomelo “Duncan” y mandarina “Dancy” [32].

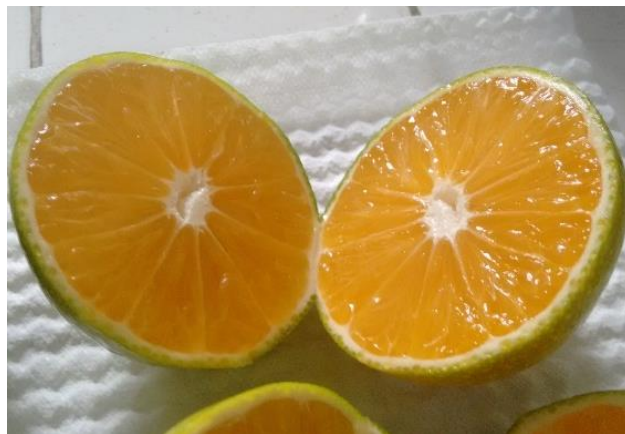


Figura 1-1: Naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*).

1.1.2 Mandarina (*Citrus reticulata*)

La mandarina fue descrita por Francisco M. Blanco en 1837, por lo que en ocasiones se refiere a la especie como *Citrus reticulata* blanco [33]. En la región central de nuestro país se cultiva y consume la mandarina ‘Arrayana’, la cual aún no es considerada una variedad por la comunidad científica [34]. La mandarina es un fruto redondo, algo achatado, originario presuntamente del sur de Asia [35]. Su piel es delgada con glándulas aceitosas y se caracteriza por su fácil pelado (Figura 1-2), por lo cual se consume en fresco principalmente [8], aunque algunas agroindustrias en Colombia la procesan para la producción de zumos. La pulpa está conformada por segmentos de fácil separación de color salmón a rojizo [36]. En la Figura 1-2 se muestra la biomasa sometida al presente

estudio (mandarina 'Arrayana'). En la literatura especializada no se encuentran estudios sobre el aprovechamiento de subproductos en mandarina 'Arrayana', sin embargo hay trabajos en los cultivares 'Ponkan' o 'Clementina' [37–41].



Figura 1-2: Mandarina (*Citrus reticulata*) var. 'Arrayana' parcialmente pelada.

1.2 Residuos cítricos

Desde la década de los 20s, la industria procesadora de cítricos ha venido en crecimiento. Con el desarrollo de concentrado congelado de jugo en 1945, se ha logrado un procesamiento creciente del 70% de naranja y 50% de toronja en Florida, Estados Unidos. En consecuencia, esto ha traído un incremento gradual de los residuos, representados principalmente en cáscara, pulpa (constituida por los sacos a los cuales se les ha extraído el jugo) y semillas [42], que en la actualidad asciende a 15 millones de toneladas por año aproximadamente; es de aclarar que la industria de cítricos no solo abarca la producción de jugos, sino también de mermeladas, mandarina en cascós, frutos deshidratados y aceites esenciales, por parte de la industria química [43].

La pulpa principalmente y el resto de los residuos cítricos, por su alto contenido de azúcares es altamente fermentable, representando su disposición un problema ambiental. Además, existe un límite de materia orgánica que puede ser adicionada al suelo, ya que podría verse afectada su microflora natural, por lo que ésta no constituye una alternativa de disposición completa. Lo que normalmente se hace es compostaje,

incineración, termólisis, gasificación o destinarlos a alimentación animal como método de generar el menor impacto ambiental posible [9].

Por otra parte, el cultivo de cítricos, por su carácter estacional debido a la concentración de las lluvias en ciertas épocas del año, sufre de fluctuaciones de precio y en ocasiones cuando la oferta es muy alta, resulta más rentable para los agricultores dejar perder el fruto por los costos asociados a su cosecha [44].

Debido a los aspectos mencionados anteriormente se han desarrollado, a lo largo de los años, alternativas para el aprovechamiento de estos residuos que permitan su valorización, puesto que se han demostrado que son ricos en fibra, pectina, azúcares, polifenoles, vitaminas, entre otros [45,46].

1.2.1 Valorización de residuos cítricos

Los subproductos de los frutos cítricos pueden ser aprovechados en la alimentación de animales, o en la obtención de fibra y de otras sustancias. A continuación, se mencionan algunas de dichas opciones:

- **Alimento animal**

Se han estudiado métodos de obtención de alimento animal a través de la pulpa residual, en el cual tratamientos alcalinos con óxido de calcio (CaO) o enzimáticos (con Citrozima LS) son aplicados a la biomasa, facilitando el prensado y ayudan a que el material pueda ser secado, ya que éste se obtiene originalmente con un exceso de agua de 85%, la cual no puede ser retirada por métodos normales de secado. Esta pulpa seca mostró alta digestibilidad *in-vitro* (88.6%) y su contenido en proteína (7.7%) es comparable con la de muchos otros residuos agroindustriales actualmente utilizados como alimento animal [45].

- **Fibra dietaria**

La fibra dietaria se compone de fibra soluble y insoluble. La última está conformada principalmente por celulosa y lignina. El residuo cítrico contiene 13-17% de fibra insoluble, la cual facilita el paso de los alimentos por el sistema digestivo [47].

La fibra soluble en los residuos cítricos se presenta como pectina y mucílago. Las pectinas son polisacáridos, útiles como suplementos dietarios y para industrias farmacéuticas y cosméticas por sus propiedades gelificantes y estabilizantes. Los mucílagos también son polisacáridos pero con una composición diferente en ácidos urónicos y azúcares. Tienen los mismos usos que la pectina e incluso se ha reportado que el mucílago de limón posee propiedades antiinflamatorias. El desecho seco de procesamiento de cítricos contiene entre 15-25% de pectina [45], por lo que es una alternativa ampliamente utilizada para el aprovechamiento de los mismos. En las cáscaras se puede alcanzar rendimientos entre 15-32%, dependiendo del fruto y del método de extracción [48–50].

- **Obtención de compuestos**

Por vías enzimáticas o bioquímicas es posible transformar los residuos cítricos en materiales con valor agregado de importancia para la industria.

A través de la fermentación de melaza (líquido viscoso oscuro con alto contenido en azúcares, obtenido del prensado de la pulpa) puede obtenerse riboflavina y ácido cítrico [51]; de la fermentación de la cáscara se obtiene ácido láctico [52]; a través de hidrólisis enzimática puede obtenerse limoneno por filtración del residuo [53] por citar algunos ejemplos. En general, hay muchas rutas de bioconversión hacia productos químicos de valor agregado [54].

- **Flavonoides**

Los flavonoides son compuestos polifenólicos (ver sección 1.3) que poseen una estructura de fenil benzopirona, representando dos anillos bencénicos, unidos entre sí por una cadena lineal de tres carbonos. Estos compuestos se presentan naturalmente en frutas y ciertas partes de las plantas, incluyendo los cítricos [55]. Aunque los flavonoides, como la mayoría de los compuestos polifenólicos, no son considerados como agentes nutritivos, son metabolitos clave en la prevención de muchas enfermedades crónicas. Es por esto que se han desarrollado varias investigaciones alrededor de técnicas para su extracción y aislamiento [49-52], así como de estudios de sus efectos benéficos sobre la salud humana [15, 53, 54].

1.3 Compuestos polifenólicos

El término 'polifenol' puede ser definido químicamente como una sustancia que posee un anillo aromático acompañado por un sustituyente hidroxilo, incluyendo derivados funcionales como ésteres, metil ésteres y glicósidos, entre otros. El fenol por sí mismo es un producto natural, pero la mayoría de los polifenoles poseen dos o más grupos hidroxilos y más de un anillo aromático con estas características [62]. Debido al grupo hidroxilo que los acompaña, estos compuestos resultan buenos captadores de radicales libres y han sido estudiados en las últimas décadas por sus efectos benéficos sobre la salud, principalmente sobre el sistema cardiovascular, siendo las enfermedades asociadas a éste una de las principales causas de muerte en el mundo [56, 57].

Los compuestos polifenólicos son producto del metabolismo secundario de las plantas, contribuyendo a su pigmentación, proveyendo resistencia a patógenos y predadores por la síntesis de fitoalexinas o incrementando su astringencia, haciendo a la planta de mal sabor a sus predadores; protegiendo a los cultivos de las plagas, entre otros. Se han identificado más de 8000 estructuras fenólicas [63].

Los polifenoles han sido clasificados de acuerdo a Bravo [63] en diez grandes grupos según el tamaño de su estructura química, desde los fenoles simples hasta los taninos condensados. Entre estos, los más importantes son los flavonoides por su abundancia en la naturaleza (más de 5000 compuestos identificados a 1990). Se encuentran constituidos por dos anillos fenólicos A y B, unidos por un anillo heterocíclico (Figura 1-3).

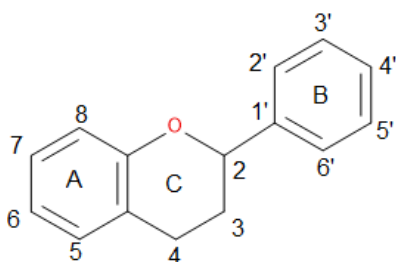


Figura 1-3: Estructura general de los flavonoides.

En el epicarpio de cítricos se ha encontrado compuestos tipo flavonoide (Figura 1-3), principalmente flavanonas y polimetoxiflavanonas.

- **Flavanonas:** Éstas presentan un carbonilo en el carbono 4 (Figura 1-4a) y muchas veces se encuentran naturalmente glicosidadas (Figura 1-4b y Figura 1-4c). Entre las flavanonas, las formas glicosidadas de la naringina y hesperetina: naringina y hesperidina, respectivamente resultan particularmente importantes por su abundancia en los frutos cítricos [16]. En general las flavanonas son las responsables del sabor amargo de la cáscara y pulpa de los cítricos [65].

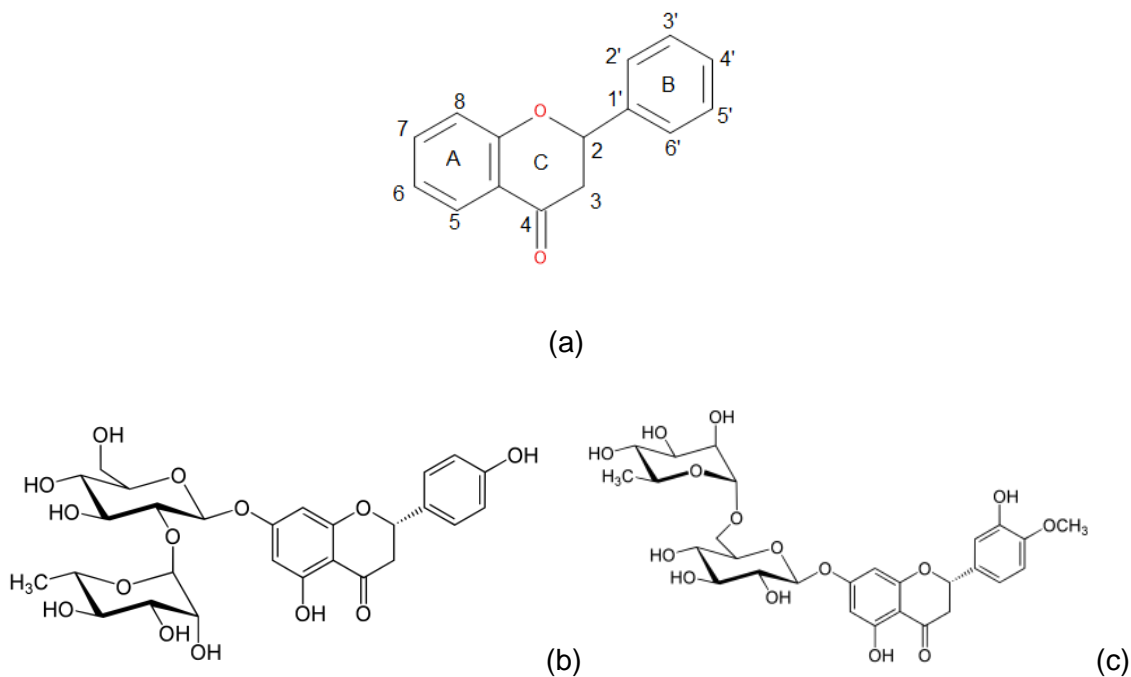


Figura 1-4: Flavanonas.

(a) Estructura general de las flavanonas. Estructura química de (b) naringina (c) hesperidina [16].

- **Polimetoxiflavonas:** Este tipo de compuestos (Figura 1-5) son exclusivos de los cítricos, especialmente en los epicarpios de estas frutas. Las polimetoxiflavonas (PMF) es un término general para flavonas que poseen uno o más grupos metoxilo en la estructura básica de un flavonoide (C₆-C₃-C₆) (Figura 1-3) con un grupo carbonilo en el carbono C₄. Las PMF se han utilizado en la medicina tradicional para aliviar malestares estomacales, inflamaciones de la piel y para disminuir la presión arterial [66].

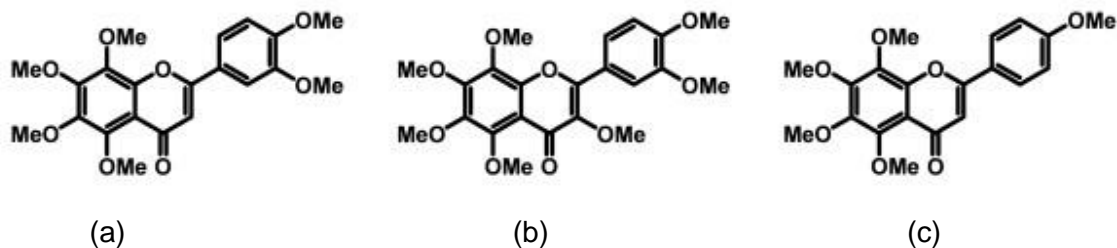


Figura 1-5: Algunas polimetoxiflavonas representativas de los cítricos.

(a) Nobiletina (b) Heptamtoxiflavona (c) Tangeretina [67].

1.3.1 Extracción de compuestos polifenólicos

Los componentes polifenólicos pueden ser extraídos mediante técnicas de extracción convencionales o emergentes.

Entre las técnicas convencionales se encuentran la maceración y el Soxhlet con solventes de mediana y alta polaridad para extraer polifenoles. El Soxhlet es una de las técnicas más utilizadas, debido a que es una metodología que permite agotar en su mayor parte la muestra a extraer, dejando la biomasa libre de analitos, debido a que hay un reflujo constante de solvente.

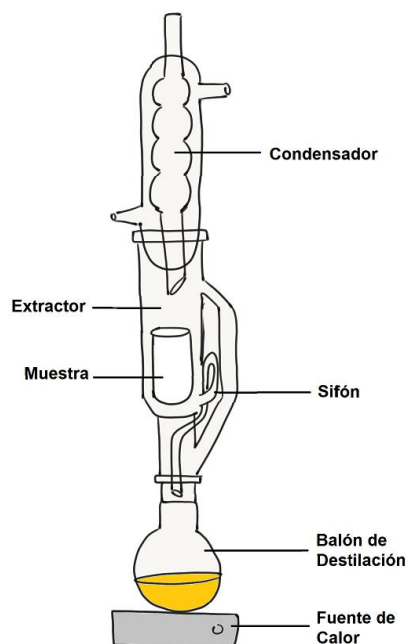


Figura 1-6. Montaje de extracción Soxhlet.

La extracción Soxhlet es un método semi-continuo de extracción sólido-líquido en el que el solvente cae continuamente a gotas sobre un dedal con la muestra sólida de la que se necesitan extraer analitos, los cuales se solubilizan lentamente en el solvente (montaje en la Figura 1-6). Este tipo de extracción también puede realizarse a presión de vacío, disminuyendo el punto de ebullición del solvente y garantizando la conservación de posibles analitos termolábiles [68,69]. No obstante, esta técnica utiliza gran cantidad de disolvente y tiempos de extracción prolongados, lo que incide sobre los costos, y no es fácilmente automatizable [70].

Los fluidos supercríticos han sido explorados en las últimas décadas como solventes verdes para extracción debido a que poseen características únicas como su alta densidad, otorgándoles alto poder de solvatación. Así mismo podrían presentar una alta selectividad para los analitos de interés, puesto que, con la variación de la presión, temperatura y co-solventes añadidos en pequeñas cantidades es posible modificar en cierta medida la naturaleza del disolvente haciéndolo afín con ciertos analitos. Adicionalmente, los fluidos supercríticos presentan bajas viscosidades y alta difusividad, lo que permite alta velocidad de extracción. El etano, propano, dióxido de carbono, entre otros pueden ser utilizados como fluidos supercríticos, sin embargo, este último se prefiere ya que a pesar de que todos tienen puntos críticos relativamente bajos, el CO₂ es un gas no inflamable, no tóxico (se puede encontrar en grado alimenticio), tiene un bajo costo, puede retirarse del extracto sin dejar residuos y su baja temperatura crítica (304 K) permite ser aplicado a extracción de analitos termolábiles [71]. El dióxido de carbono es un solvente relativamente apolar. Aumentar la presión de extracción, aumenta la polaridad del solvente y la posibilidad de extraer compuestos de mayor peso molecular [72]. No obstante, pequeñas cantidades de etanol-EtOH puede mejorar la solubilidad de compuestos con mayor polaridad y disminuir la presión de trabajo necesaria para obtener la solubilidad deseada, que en ocasiones hace la operación de los equipos muy costosa. De esta manera, se hace la tecnología aplicable a la extracción de un amplio espectro de compuestos [71].

La extracción con fluidos supercríticos se ha estudiado desde la década de los 70s. Los ejemplos clásicos de extracción supercrítica son para la descafeinación de café y para obtener extracto de lúpulo para saborizar la cerveza. Actualmente toda la extracción de lúpulo para industria cervecera es hecha con EFS utilizando CO₂ supercrítico, mientras que la descafeinación compite con otros procesos de extracción. Es así, que esta

extracción se puede utilizar para extraer compuestos deseados como para eliminar compuestos indeseados [73]. Actualmente existen varias empresas que utilizan la tecnología de extracción a alta presión. Por citar algunos ejemplos, Valensa en Estados Unidos, produce actualmente nutraceuticos como espirulina, astaxantina utilizando extracción a ultra-alta presión [74]. Natex, es una empresa austriaca que desde 1985 se dedica a la EFS de aditivos para la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética. Se reconoce como la primera planta de descafeinado de té a nivel mundial [75].

1.3.2 Métodos espectrofotométricos para cuantificación de polifenoles

El contenido total de compuestos fenólicos (CTF) se mide por espectrofotometría UV-Vis, empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C), un complejo formado a partir de una mezcla de tungstato de sodio, molibdato de sodio y sulfato de litio (el cual aporta un color amarillo intenso a la solución) (Figura 1-7). Los compuestos polifenólicos reaccionan con el reactivo de F-C únicamente bajo condiciones básicas (por lo que la reacción se da en presencia de carbonato de sodio) y cuantifica la capacidad de una sustancia o conjunto de sustancias para reducir dicho complejo. Esta reducción genera una coloración azul, medible a 750 nm, la cual es comparada con la capacidad de reducción del polifenol ácido gálico, por lo que los resultados son expresados en equivalentes de ácido gálico por cantidad de extracto o de muestra, mediante una curva de calibración [76].

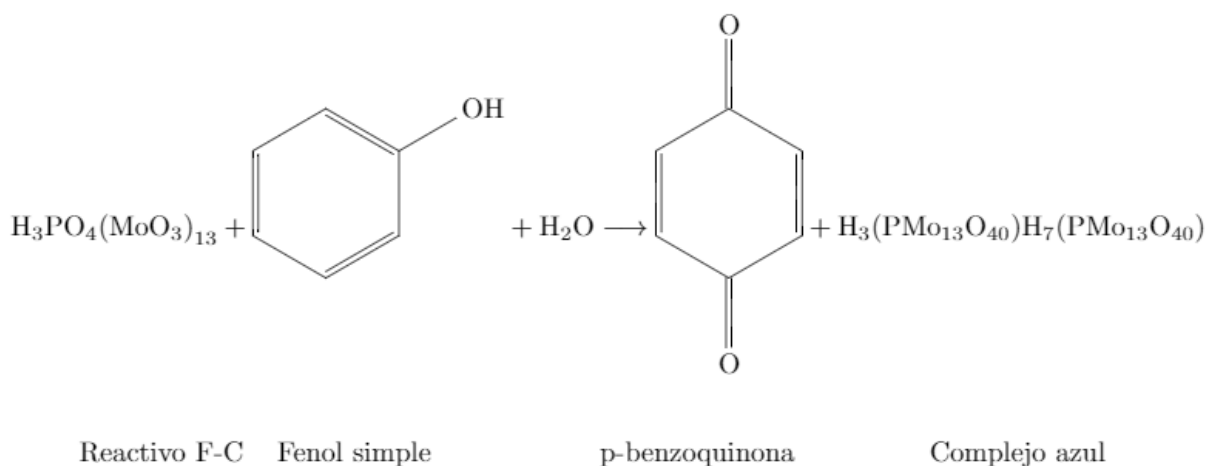


Figura 1-7: Reacción de polifenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Por otra parte, el contenido total de flavanonas (CTFo) es un método que emplea la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH, por sus siglas en inglés), la cual reacciona con el grupo carbonilo de las flavanonas y dihidroflavonoles, formando dinitrofenilhidrazonas (Figura 1-8) que presentan un máximo de absorbancia a 495 nm. La reacción se ve favorecida por la ausencia del doble enlace en los carbonos 2-3. Por otro lado, las flavonas, flavonoles e isoflavonas, al poseer un doble enlace en esta posición, se produce una resonancia electrónica que aleja parte de la carga positiva del grupo carbonilo. Esto hace al carbono que posee el grupo carbonilo menos electrofílico, así que el ataque nucleofílico de la DNPH se ve menos favorecido [77].

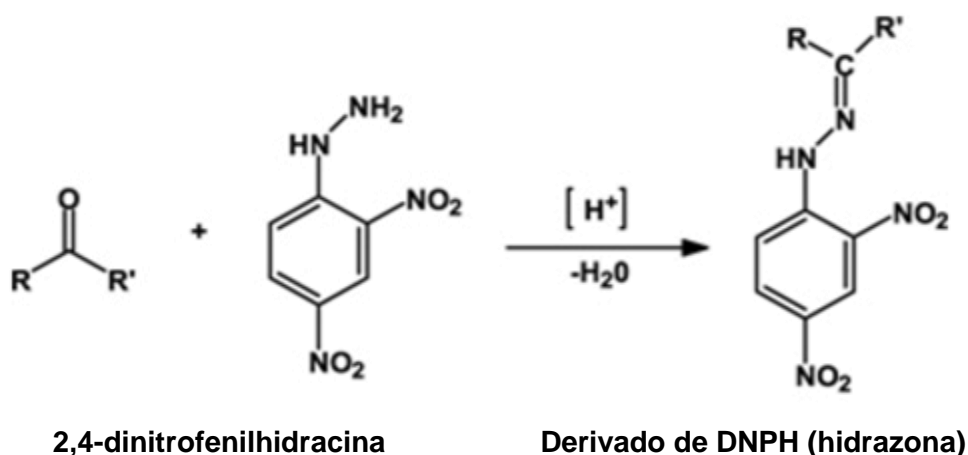


Figura 1-8: Reacción con dinitrofenilhidracina para producir una hidrazona.

1.3.3 Identificación de polifenoles en cítricos por cromatografía líquida

El uso de cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UHPLC) ha sido usada ampliamente en muestras de alimentos para la identificación rápida y tentativa de polifenoles. Esta metodología permite la separación e identificación de compuestos en matrices complejas, logrando una buena resolución [78].

Específicamente los polifenoles son separados utilizando fase reversa C18. El orden de elución en fases estacionarias no polares es consistente con el número de grupos hidroxilo de la molécula, el grado de metoxilación y la cantidad de moléculas de azúcares en la estructura [78].

En los cítricos se han logrado identificar y cuantificar flavanonas como narirutina, naringina, hesperidina y neohesperidina; en menor cantidad, polimetoxiflavonas como sinensetina, nobiletina, tangeretina, tetrametil-o-scutellareina, heptametoxiflavona, entre otros. Adicionalmente se han identificado variedad de derivados de ácido hidroxicinámico como ácido cafeico, ferúlico, entre otros [22,79].

Generalmente esta cromatografía emplea un detector de arreglo de diodos - DAD. Éste requiere un haz de luz continua que atraviesa la celda. La radiación es descompuesta en sus longitudes de onda constitutivas que son detectadas individualmente mediante el DAD. Estos detectores adquieren los datos de absorbancia sobre el intervalo total UV-Vis y proveen la absorbancia en las longitudes de onda seleccionadas y los espectros UV-Vis de los componentes eluidos [80].

Sin embargo, esta técnica posee sus limitaciones, ya que no brinda información sobre estructura química. Los espectros UV, aunque son característicos de cada sustancia, pueden resultar muy similares para ciertos compuestos, por lo que es necesario realizar una revisión cuidadosa de literatura científica y el uso de sustancias patrón para su adecuada identificación y cuantificación. Adicionalmente, hay un alto riesgo de co-elución de analitos. Actualmente la espectrometría de masas es una de las técnicas más efectivas para el análisis de compuestos polifenólicos puesto que posee bajos límites de detección, mejorando su separación de compuestos. Es por esto que esta técnica se utilizada acoplada a la cromatografía líquida para lograr una identificación y cuantificación más confiable [78].

1.4 Carotenoides en cítricos

Los carotenoides son pigmentos naturales presentes en distintas frutas como los cítricos y éstos pueden ser fuentes de colorantes naturales para la industria alimentaria reemplazando pigmentos sintéticos. Los carotenoides más abundantes en el epicarpio de cítricos son α -caroteno, β -caroteno, luteína, zeaxantina y β -criptoxantina (Figura 1-9)[81].

Debido a que los carotenoides son compuestos coloreados su contenido en las frutas puede cuantificarse espectrofotométricamente extrayéndolos de la muestra utilizando un solvente de baja polaridad como el hexano o acetato de etilo [82]. Los contenidos de carotenoides de los epicarpios de frutos cítricos oscilan entre 11-204 mg/100 g cáscara

seca utilizando el método anteriormente descrito. Estos valores dependen de la variedad frutal, donde la mandarina contiene los mayores valores y el limón los menores [81].

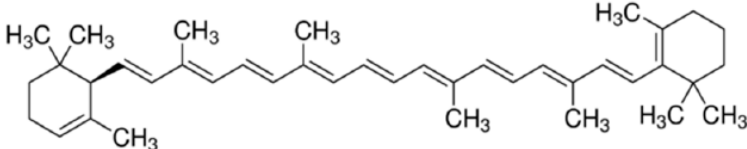
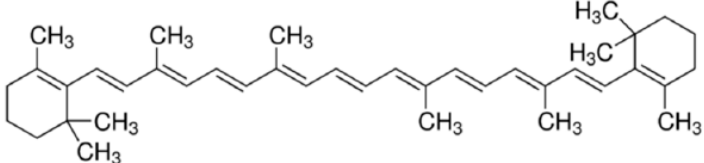
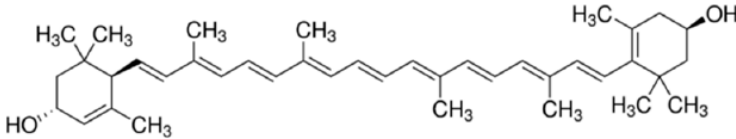
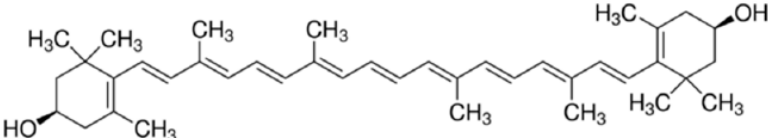
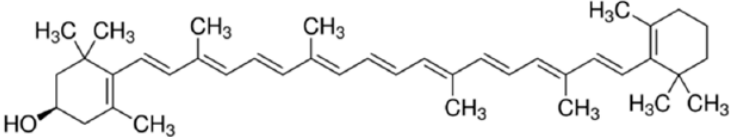
Tipo	Estructura básica
α - Caroteno	
β - Caroteno	
Luteína	
Zeaxantina	
β - Criptoxantina	

Figura 1-9: Formula química de los carotenoides más abundantes en cítricos [81].

1.5 Determinación *in-vitro* de la capacidad antioxidante

Para la determinación de la capacidad antioxidante de un extracto o molécula pura se pueden utilizar métodos *in-vitro* e *in-vivo*. En muchos casos las metodologías *in-vitro* se prefieren ya que son análisis sencillos, rápidos y económicos de efectuar. Aunque no son una reproducción exacta de la realidad sí dan una aproximación a ella y permiten hacer “tamizajes” cuando se tienen gran cantidad de muestras por analizar [76]. Los ensayos *in-vitro* podrían clasificarse en medidas directas o indirectas.

1.5.1 Medidas indirectas

Los ensayos indirectos son aquellos que no se realizan directamente sobre la matriz de aplicación en la que se quiere probar los extractos o moléculas purificadas y pueden ser utilizados como método de tamizaje preliminar. Por lo general, se utilizan metodologías basadas en transferencia de electrones usando como sustrato radicales cromóforos sintéticos. El más utilizado de ellos es el ensayo de captación de radicales 2,2 difenil 1-picrilhidracilo (DPPH).

- **Ensayo de captación de radicales libres DPPH**

El ensayo se basa en la decoloración del radical DPPH de violeta a amarillo a causa de su reducción por parte de la sustancia antioxidante a analizar por transferencia de electrones (Figura 1-10). Sin embargo, este ensayo no es específico para compuestos antioxidantes; el ensayo puede tener interferentes como el glutatión (principalmente presente en muestras biológicas), α -tocoferol aminas aromáticas, entre otros; no reacciona con fenoles monohidroxilados, azúcares simples, purinas, pirimidinas y precipita las proteínas [83].

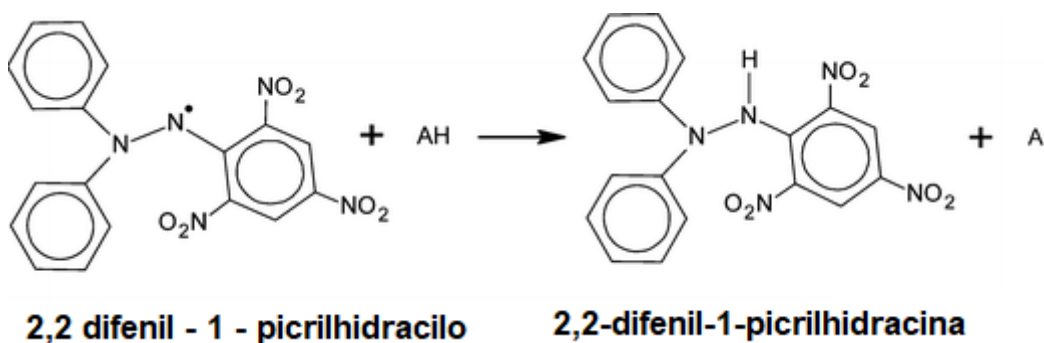


Figura 1-10: Reducción del radical DPPH en presencia de un antioxidante.

1.5.2 Medidas directas

Los ensayos o medidas directas, a diferencia de los anteriores, se realizan directamente con la matriz a analizar y el antioxidante adicionado. La importancia de probar antioxidantes en matrices lipídicas se debe a que la mayoría de los alimentos o formulaciones alimenticias presentan en su contenido grasas y aceites. Esta medida

representaría una aproximación más cercana a la realidad puesto que se está adicionando sobre el producto final.

Las emulsiones son productos ampliamente utilizados en mayonesas y salsas. Según la paradoja polar [84] los antioxidantes, normalmente de carácter hidrofílico, actúan mejor en situaciones de interfase por lo que resulta importante evaluar su comportamiento en este tipo de sistemas.

La oxidación se puede determinar a través de la cuantificación por espectrofotometría de los productos secundarios de la oxidación en el tiempo, por medio del ensayo de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés).

- **Sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)**

El test del ácido tiobarbitúrico (TBA), actualmente, es uno de los más utilizados para detectar el deterioro producto de la oxidación en matrices grasas [84].

Durante la oxidación lipídica, el ácido tiobarbitúrico reacciona principalmente con malondialdehído (MDA), el cual es un producto de descomposición de endoperóxidos formado durante la peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados que poseen tres o más dobles enlaces, es decir, el ensayo muestra la capacidad de una sustancia de inhibir compuestos secundarios de la oxidación lipídica. En aceites comestibles el MDA se cree ser derivado principalmente de ácido linolénico. El TBA es usado como un indicador del proceso de oxidación, ya que al reaccionar con el MDA se forma un complejo MDA-TBA (ver Figura 1-11) de color rosado que es medido espectrofotométricamente entre 530 y 535 nm.

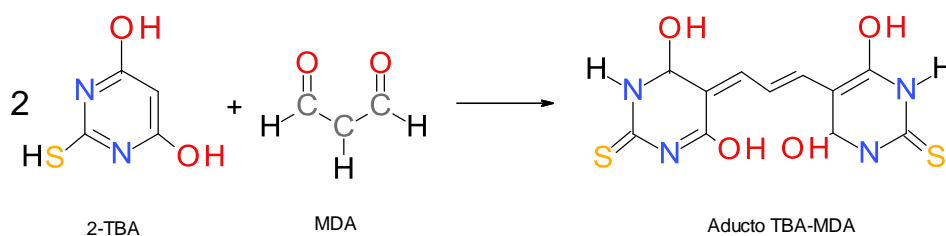


Figura 1-11: Reacción de Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) con malondialdehído (MDA).

1.6 Modelamiento de la cinética de EFS: Modelo BIC

El modelo de células rotas e intactas (modelo BIC, por sus siglas en inglés) fue propuesto por H. Sovová en 1994. Fue utilizado inicialmente para modelar la extracción de aceite de semillas oleaginosas. Éste se basa en la existencia de células rotas y células intactas dentro de la matriz debido al proceso de molienda al que normalmente se somete una muestra antes de extraer (Figura 1-12). Esto da lugar a que durante la extracción una cierta cantidad de soluto esté disponible para ser extraído rápidamente durante una primera etapa del proceso, seguido de una velocidad de transferencia de masa más lenta proveniente del soluto dentro de las células intactas [85]. La existencia de células rotas ha sido identificada por microscopía en la superficie del lecho [86].

Derivado de esto se pueden diferenciar tres periodos en la extracción: *periodo de velocidad de extracción constante* (CER, por sus siglas en inglés) gobernado por el fenómeno de convección; *periodo de velocidad de extracción decayente* (FER, por sus siglas en inglés), donde interviene el fenómeno de difusión combinado con convección y por último, el *periodo controlado por difusión*, donde el soluto en las células rotas ha desaparecido y solamente el soluto en las células intactas se difunde lentamente en el lecho hacia el disolvente [26].

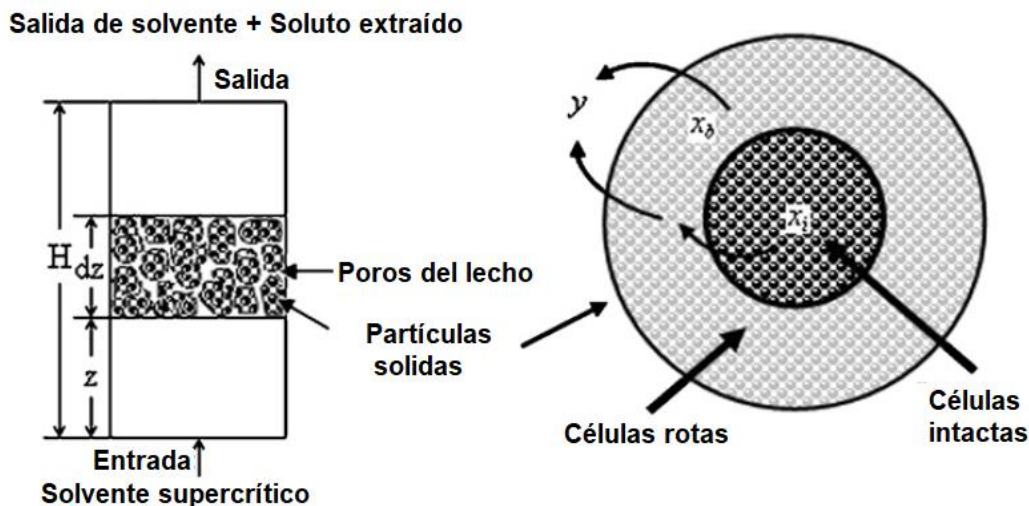


Figura 1-12: Diagrama del modelo BIC [26].

En el modelo BIC se asume lo siguiente [26]:

1. El sistema de extracción es isotérmico e isobárico.
2. Las propiedades físicas del fluido supercrítico son constantes durante la extracción.
3. La concentración inicial de soluto y la distribución de tamaño de partícula son uniformes en el lecho empacado.
4. La fracción porosa del lecho es constante durante la extracción en el lecho empacado.
5. La acumulación de soluto en el solvente es despreciable.
6. El fluido supercrítico está libre de soluto a la entrada del lecho.
7. El fenómeno de transferencia de masa de todos los extractos es similar.
8. La dispersión axial es despreciable debido a que se asume un flujo pistón.

1.6.1 Ecuaciones

La solución analítica de las ecuaciones de transferencia de masa del modelo BIC está dado por las siguientes fórmulas [87]:

$$y(t) = Q_{CO_2} Y^* [1 - \exp(-Z)] t, \quad \text{si } 0 \leq t \leq t_{CER} \quad (1-1)$$

$$y(t) = Q_{CO_2} Y^* [t - t_{CER} * \exp(Z_w(t) - Z)], \text{ si } t_{CER} \leq t \leq t_{FER} \quad (1-2)$$

$$y(t) = m_{SI} \left[X_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp \left(\frac{W X_0}{Y^*} \right) - 1 \right] * \exp \left[\frac{W Q_{CO_2}}{m_{SI}} (t_{CER} - t) \right] \left(\frac{X_k}{X_0} \right) \right\} \right],$$

$$\text{si } t \geq t_{FER} \quad (1-3)$$

Donde $Z_w(t)$ es una función definida por:

$$Z_w(t) = \frac{Z Y^*}{W X_0} \ln \left\{ \frac{X_0 \exp \left[W Q_{CO_2} * \frac{t - t_{CER}}{m_{SI}} \right] - X_k}{X_0 - X_k} \right\} \quad (1-4)$$

X_p representa la fracción de material fácilmente extraíble (presente en las células rotas) y se define como:

$$X_p = \frac{t_{CER} Y^* Z Q_{CO_2}}{m_{SI}} \quad (1-5)$$

$$X_k = X_0 - X_p \quad (1-6)$$

t_{FER} se calcula con la ecuación:

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_{SI}}{WQ_{CO2}} \ln \left[\frac{X_k + X_p \exp\left(\frac{WX_0}{Y^*}\right)}{X_0} \right] \quad (1 - 7)$$

Convenciones:

y : masa de extracto calculada con el modelo (kg)

Q_{CO2} : Flujo másico de solvente (kg/s)

Y^* : solubilidad del extracto en el solvente a una presión y temperatura $\left(\frac{kg}{kg}\right)$.

Calculada como la pendiente del periodo de extracción constante

Z : Parámetro del modelo relacionado con la convección en la fase fluido del lecho

t_{CER} : Fin del primer periodo de extracción (s)

t_{FER} : Fin del segundo periodo de extracción (s)

t : tiempo de extracción (s)

Z_w : Parámetro del segundo periodo de extracción

m_{SI} : masa de material no extraíble (libre de extracto)(kg)

X_0 : masa inicial de material extraíble, relativo a la masa de material no extraíble (kg/kg)

X_k : masa inicial de material extraíble en las células intactas, relativo a la masa de material no extraíble (kg/kg)

X_p : masa inicial de material extraíble en las células rotas, relativo a la masa de material no extraíble (kg/kg)

W : Parámetro del modelo relacionado con la difusión en la fase sólida del lecho

1.6.2 Curva cinética y ajuste de datos

La solución de las ecuaciones de Sovová dan como resultado la relación de cantidad de extracto obtenido respecto a la cantidad de matriz sólida en el tiempo, así como los tiempos t_{CER} y t_{FER} . Esto nos permite identificar los tres momentos de la extracción y saber

cuándo detenerla (que se recomienda hacerlo al final del periodo de velocidad de extracción constante) [71]. Así mismo, nos permite obtener información por medio de la regresión con los datos experimentales los coeficientes de transferencia de masa, los cuales se pueden aplicar a la extracción a escala laboratorio y a escala industrial [26].

Puesto que cada parte de la curva de extracción depende de un parámetro diferente, los parámetros pueden ser ajustados manualmente. Para un mayor refinamiento en los parámetros del modelo se puede utilizar un método de optimización numérica [85].

Debido a la no linealidad que las ecuaciones poseen se puede utilizar la optimización global, evitando mínimos locales. El problema normalmente se plantea minimizando el error de los datos experimentales respecto a los calculados por el modelo [87].

Con el panorama anterior, a continuación, se describe la metodología empleada en el presente trabajo.

2. Metodología

2.1 Tipo de investigación y recolección de información

La investigación que se desarrolló fue de tipo aplicada, cuantitativa y exploratoria, tomando como fuentes de información principalmente los datos experimentales obtenidos de los distintos ensayos realizados y artículos publicados en revistas indexadas en bases de datos como Science Direct, Springer, Wiley, entre otras.

2.2 Preparación de la muestra

Las muestras de tangelo (*C. reticulata* x *C. paradisi*) y de mandarina (*C. reticulata*) fueron obtenidas en la cosecha de marzo-abril, de una Parcela de Investigación Participativa Agropecuaria (PIPA) establecida por el proyecto, en Anapoima-Cundinamarca. La muestra fue lavada y desinfectada para su posterior uso.

Los epicarpios de los frutos fueron separados y secados hasta peso constante (secador de flujo de aire constante de 140 cfm-60 °C). Posteriormente fueron molidos y tamizados a un tamaño de partícula de 0.3-0.6 mm, según otros autores [75, 76]. Cada biomasa se sometió a extracción Soxhlet.

2.3 Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet se realizó sobre 5.0 g de cada muestra siguiendo el esquema de la Figura 2-1, obteniendo tres extractos por cada biomasa, cada uno por triplicado. La extracción se realizó durante 8 h a presión reducida (-575 mbar). En los extractos se determinó el rendimiento, contenido total de compuestos fenólicos-CTF, el contenido total de flavanonas-CTFo, el contenido total de carotenoides-CTC y la actividad antioxidante

por DPPH, con el fin de seleccionar la biomasa más promisoría, la cual se sometió a extracción con fluidos supercríticos-EFS.

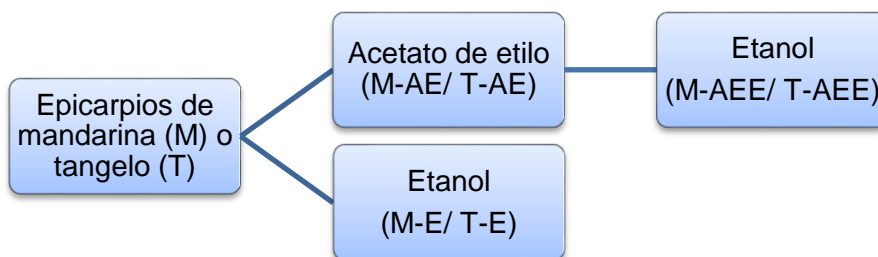


Figura 2-1: Esquema de la extracción Soxhlet con codificación de los extractos.

Las letras AE, AEE y E indican el procedimiento realizado en la extracción Soxhlet. AE: Soxhlet con AcOEt.

AEE: Soxhlet con EtOH sobre la biomasa previamente extraída con AcOEt. E: Soxhlet con EtOH.

2.4 Extracción con CO₂ supercrítico y EtOH

Se ensambló un equipo para la EFS como se muestra en la Figura 2-2. El equipo consta de una celda de extracción de 10 mL aprox. en acero inoxidable 316S, con reservorios para CO₂ (impulsado por una bomba de diafragma (Nova Swiss, Suiza) conectada a un regulador de frecuencia) y para EtOH, impulsado por una bomba de HPLC (Beckman modelo 140A). Las dos corrientes se unen en un punto de mezcla que va hacia la celda con chaqueta de calentamiento conectada a un controlador de temperatura tipo PID. Adicionalmente, el equipo cuenta con una válvula reguladora de caída de presión – BPR (Pressuretech, Reino Unido) que puede controlar la presión manteniendo un flujo constante y una celda de separación de 50 mL de capacidad con chaqueta de calentamiento, en la que se hace una despresurización inicial para que la diferencia de presión no congele las tuberías. Finalmente, el extracto se colecta en un recipiente de acero inoxidable, acoplado a un medidor de flujo (Dwyer, EUA).

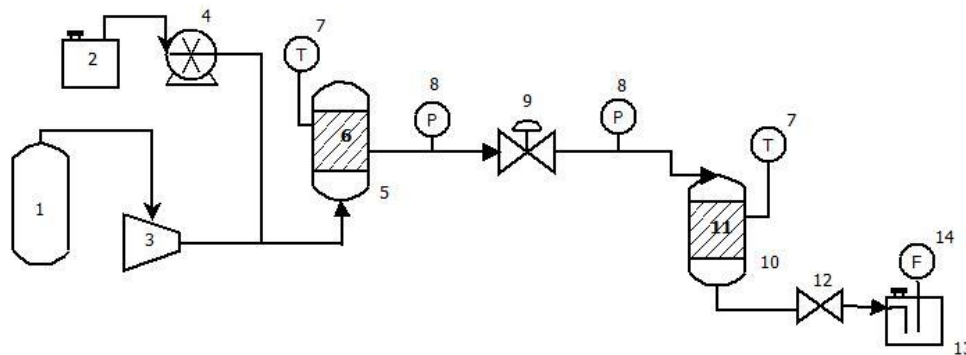


Figura 2-2: Sistema de extracción con fluidos supercríticos.

1. Depósito de CO₂, 2. Depósito de etanol, 3. Compresor de diafragma, 4. Bomba de HPLC, 5. Celda de extracción; 6,11. Chaquetas calefactoras eléctricas, 7. Controladores de temperatura, 8. Indicadores de presión (manómetros), 9. Regulador de caída de presión (BPR), 10. Celda de despresurización, 12. Válvula de flujo, 13. Colector de extracto de acero inoxidable, 14. Flujómetro de CO₂.

2.5 Diseño experimental

Para probar la eficacia del método de extracción, así como unas condiciones adecuadas para la realización de la misma, se desarrolló un diseño experimental central compuesto, variando temperatura, presión y porcentaje de co-solvente (etanol) en dos niveles (bajo y alto), entre 50-80 °C, 120-220 bar y 5-15% de etanol, respectivamente, junto con 5 réplicas en el punto central, para un total de 19 experimentos (Tabla 2-1). Las franjas del diseño experimental se escogen de acuerdo a recomendaciones de la literatura y capacidad de los equipos [24,25].

Tabla 2-1: Diseño experimental.

Ensayo	P [bar]	T [°C]	% co-solvente
1	120 (-1)	50 (-1)	5 (-1)
2	170 (0)	65 (0)	10 (0)
3	120 (-1)	80 (+1)	15 (+1)
4	255 (+1.44)	65 (0)	10 (0)
5	170 (0)	90 (+1.44)	10 (0)
6	85 (-1.44)	65 (0)	10 (0)
7	170 (0)	65 (0)	10 (0)
8	170 (0)	65 (0)	18,4 (+1.44)
9	220 (+1)	50 (-1)	5 (-1)
10	220 (+1)	50 (-1)	15 (+1)
11	220 (+1)	80 (+1)	5 (-1)
12	170 (0)	40 (-1.44)	10 (0)
13	120 (-1)	50 (-1)	15 (+1)
14	170 (0)	65 (0)	10 (0)
15	220 (+1)	80 (+1)	15 (+1)
16	170 (0)	65 (0)	1,6 (-1.44)
17	170 (0)	65 (0)	10 (0)
18	170 (0)	65 (0)	10 (0)
19	120 (-1)	80 (+1)	5 (-1)

En rojo se muestra la codificación de cada variable: -1: nivel bajo, 0: nivel medio, +1: nivel alto, -1.44: punto estrella inferior, +1.44: punto estrella superior.

La extracción se llevó a cabo en modo continuo, con un flujo de CO₂ de 5 L/min. Se cargaron aproximadamente 5 g de muestra en cada punto experimental. Para determinar el tiempo de extracción se realizó una curva de extracción para observar el tiempo de agotamiento de la matriz.

Para realizar la curva de extracción se tomó 5 g de muestra seca y se sometió a extracción a las condiciones más bajas del diseño experimental (120 bar, 50 °C, 5% de co-solvente), debido a que en este punto el CO₂ posee su menor densidad, por lo que toma las propiedades de un gas y por tanto presenta menor poder de solvatación. Así mismo, la baja temperatura disminuye la difusividad. Debido a esto se asume que en estas condiciones se obtendrá el tiempo más largo de agotamiento de la matriz [23]. Se realizó una extracción durante 5 horas, recolectando extracto cada 10 min. Los recipientes fueron pesados y se determinó el rendimiento de extracto en cada punto. Se realizó una gráfica de rendimiento acumulado vs tiempo de extracción para observar el

comportamiento asintótico que indica el agotamiento de los componentes extraíbles de la muestra.

2.6 Variables de respuesta

Tanto para la extracción Soxhlet con disolventes de diferente polaridad, como para el diseño experimental de la EFS se midieron como variables de respuesta el contenido total de fenoles, contenido total de flavanonas, actividad antioxidante por DPPH y rendimiento. Adicionalmente, se midió el contenido total de carotenoides a los extractos Soxhlet, para la caracterización de los residuos.

2.6.1 Contenido Total de Compuestos Fenólicos

Se determinó el contenido total de compuestos fenólicos-CTF utilizando el método de Folin-Ciocalteu. En breve, se adicionaron 20 μL de extracto reconstituido a 8 mg/mL en un recipiente eppendorf. Posteriormente se adicionaron 1580 μL de agua destilada y 100 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se dejó reposar durante ocho minutos y se adicionaron 300 μL de carbonato sódico al 20%. Se dejó incubar por dos horas y se leyó la absorbancia del color azul a 765 nm. Los resultados fueron expresados como mg-equivalentes de ácido gálico utilizando una curva de calibración (Anexo A) [90].

2.6.2 Contenido Total de Flavanonas

El contenido total de flavanonas-CTFo se determinó utilizando la metodología propuesta por Chang et al. [77]. 100 μL de extracto a 8 mg/mL se mezclaron con 200 μL de solución de 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) al 1% en metanol/ácido sulfúrico y 400 μL de metanol. La solución de DNPH fue preparada con 1 g de DNPH, 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y se ajustó a 100 mL con metanol. La mezcla fue incubada a 50 °C por 50 minutos. Posteriormente se enfrió y se adicionó 500 μL de una solución de hidróxido de potasio al 10% en metanol al 70%. Se incubó a temperatura ambiente por dos minutos. Se centrifugaron los tubos a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se tomaron 80 μL del sobrenadante y se les adicionaron 1920 μL de metanol y se midió la absorbancia a 495 nm. El blanco utilizado fue metanol. Los resultados fueron expresados como mg-equivalentes de naringina utilizando una curva de calibración (Anexo A).

2.6.3 Contenido Total de Carotenoides

El contenido total de carotenoides–CTC se realizó únicamente en los extractos Soxhlet a modo de caracterización de la biomasa. Se siguió el método de Lee y Castle [91] con algunas modificaciones. Para esto se tomó 200 μL de los extractos a 8 mg/mL, los cuales fueron llevados a un concentrador centrífugo con vacío, SpeedVac, a 25 °C. A los pellets obtenidos les fue adicionado 1.5 mL de n-hexano. La extracción se realizó en un agitador Eppendorf a 2000 rpm por 10 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 6500 rpm por 5 min a 5 °C y se recuperó el sobrenadante de color naranja. El proceso se repitió varias veces hasta obtener un pellet incoloro. Reunidos los sobrenadantes, se llevó a un volumen final de 10 mL con hexano. Finalmente se midió la absorbancia (A) a 450 nm, con un paso óptico (l) de 1 cm. Para expresar los resultados en términos de concentración (c , mol/L), mediante la ley de Lambert-Beer (Ecuación 2-1), se utilizó la absorptividad molar (ϵ) del β -caroteno en hexano, 139500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [92].

$$A = \epsilon * l * c \quad (2 - 1)$$

2.6.4 Actividad antioxidante *in-vitro* de los extractos

En la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH [83] se preparó inicialmente una solución de DPPH 100 μM , a la cual se le midió su absorbancia inicial. Se tomaron 950 μl de la solución de DPPH y se le adicionaron 50 μL de los extractos, tanto Soxhlet como supercríticos reconstituidos a 8 mg/mL. Se incubaron por 1 hora y se midió su absorbancia a 515 nm, expresando los resultados como porcentaje de inhibición utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición [\%]} = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{t=60 \text{ min}}}{Abs_{t=0}} * 100 \quad (2 - 2)$$

2.6.5 Rendimiento

El rendimiento fue calculado como el porcentaje del peso del extracto respecto a la masa seca de biomasa sometida a extracción (Ecuación 2-3).

$$\text{Rendimiento [\%]} = \frac{\text{masa de extracto}}{\text{masa biomasa seca}} * 100 \quad (2 - 3)$$

2.7 Análisis de superficie de respuesta

El diseño experimental fue sometido a una optimización con el análisis de superficie de respuesta utilizando el software Statgraphics Centurion XVI para encontrar los factores (presión, temperatura y % de cosolvente) que tenían mayor influencia sobre la actividad antioxidante.

2.8 Adición de extracto promisorio a una mayonesa

La mayonesa se preparó de acuerdo con una formulación sugerida, que contiene 60% de aceite de girasol, 30% de agua, 6% huevo en polvo, 3% vinagre y 1% de sal [93]. Para cada extracto o patrón se preparó 10 g de mayonesa. El extracto con mayor capacidad antioxidante (extracto 11: 220 bar, 80 °C, 5% de EtOH) se dosificó en la mayonesa a tres concentraciones diferentes (250, 500 y 1000 ppm) con el fin de observar si tenía efecto protector sobre la oxidación de la emulsión. Para incorporarlos a la mezcla, el volumen de extracto en EtOH equivalente a la concentración requerida fue secado en rotaevaporador y solubilizado en el agua a adicionar a la mayonesa. Los controles positivos, es decir, los antioxidantes sintéticos BHA y TBHQ, fueron adicionados a 140 y 200 ppm, respectivamente, de acuerdo a recomendaciones del Codex Alimentarius [94]. Éstos fueron solubilizados en el aceite que se adicionó a la mayonesa. El control negativo fue una mayonesa preparada sin ningún tipo de antioxidante.

Para monitorear la oxidación de la mayonesa se desarrolló un método de oxidación acelerada, conservando los recipientes con la emulsión a 60 °C en un horno, midiendo cada dos días, durante seis días la formación de TBARS.

Para la cuantificación de TBARS, se tomó una muestra de 250 mg de mayonesa y se le adicionó 1.5 mL de terbutil hidroquinona (TBHQ) para detener el proceso de oxidación y 1.25 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), que reacciona con los compuestos secundarios de oxidación, calentando los tubos a 95 °C en baño termostático. Luego del calentamiento, fueron llevados a enfriamiento rápido utilizando agua fría. Se adicionó 2 mL de cloroformo, se centrifugó 10 min a 3000 rpm y se midió en la fase acuosa la absorbancia del complejo rosado formado a 532 nm [95]. Los resultados fueron

expresados en mg MDA/g mayonesa, utilizando la absorptividad molar del MDA ($154000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [96].

2.9 Análisis estadístico

Los análisis anteriormente descritos se realizaron por triplicado, reportando el promedio junto con su desviación estándar. Para determinar diferencias significativas en los resultados se realizó un análisis de Tukey y para observar correlaciones entre las variables de respuesta estudiadas en EFS se realizó un análisis de correlación por medio de un ANOVA simple.

2.10 Cromatografía líquida

Los extractos EFS se analizaron por UHPLC/DAD inyectando $5.0 \mu\text{L}$ de muestra en una columna de Hypersil gold RP-C18 ($150 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm} \times 1.9 \mu\text{m}$, Thermo Scientific), con precolumna ($10 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$, Thermo Scientific). Se empleó dos mezclas de disolventes como fase móvil -disolvente A agua/acetonitrilo/ác. acético (99:1:0.1, v/v/v); disolvente B acetonitrilo/ác. acético (100:0.1, v/v). La elución de los analitos se realizó a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ aplicando el siguiente programa: condiciones isocráticas a 0% de B durante 5 min, gradiente lineal de 0 a 60% de B en 18 min y de 60-100% de B en 1 min, condiciones isocráticas al 100% de B por 3 min, gradiente lineal de 100-0% de B en 1 minuto, acondicionamiento en condiciones de inicio al 0% B por 7 min; caudal de la fase móvil de $400 \mu\text{L}/\text{min}$; detección a 280 nm [97].

Adicionalmente, el extracto más activo (mayor capacidad antioxidante) se analizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS) para la cuantificación de hesperidina (610.56 g/mol). Para esto se empleó un equipo de cromatografía líquida Accela (Thermo Electron Corporation, San José, CA, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo TSQ Quantum (Thermo Scientific). Se utilizó una columna Phenomenex NX-C18 $150 \times 2 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$. El equipo cromatográfico se encuentra acoplado al detector de masas mediante una interfase de ionización por electrospray. Las fases móviles y el gradiente utilizados en la separación se describen en la Tabla 2-2. La temperatura de la columna se mantuvo a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, se utilizó un flujo de $0.3 \text{ mL}/\text{min}$.

Se buscó la señal cromatográfica que tuviera como ión padre en modo positivo $[M+H]^+$ de 611.2 y transiciones (m/z) de 303.0 (energía de colisión-EC, 31V) y 153.1 (EC, 67V), de acuerdo a la literatura [98].

Tabla 2-2: Método de elución en gradiente HPLC/MS

(A) 0.1% ácido fórmico en agua (v/v); (B) 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (v/v).

	Tiempo (min)					
	0	1	12	15	15.50	17
%(A)	95	95	100	100	95	95

2.11 Ajuste de datos de curva cinética a modelo BIC

Para realizar el ajuste del modelo se realizó una curva de extracción a las condiciones del extracto más activo, el extracto 11 (220 bar, 80 °C, 5% de EtOH), por duplicado, muestreando los primeros 30 min cada 5 min, los 30 min restantes cada 10 min, la segunda hora cada 20 min, y la tercera hasta la quinta hora cada 30 min, obteniendo 18 puntos experimentales.

Para plantear el problema de optimización, donde el objetivo era minimizar la función error (Ecuación 2-4), se utilizaron como recurso las ecuaciones y metodología propuestas por Martínez y Martínez [87], con algunas modificaciones, sin embargo, el modelo fue programado y construido en el software Matlab por los autores.

Como datos de entrada para el modelo se necesita:

- Flujo másico de solvente (Q_{CO_2}): Fijado en 5 L/min, que posteriormente fue convertido a flujo másico y es expresado en kg/s.
- Solubilidad del extracto en el solvente (Y^*): Determinado como la pendiente de los primeros 30 minutos de extracción, en kg/kg.
- La masa de material no extraíble (m_{SI}): Expresado como la resta entre la masa de la muestra y la masa de extracto obtenida al final de la extracción, en kg
- La masa inicial de material extraíble relativa a la masa de material no extraíble (X_0): Definida como la división entre la masa de extracto total y m_{SI} , en kg/kg.
- La curva experimental, de donde se obtiene y_{obs} (cantidad de extracto acumulado, en kg) y t (tiempo de extracción, en segundos).

Los valores para los datos de entrada del modelo se resumen en la Tabla 2-3.

Tabla 2-3: Datos de entrada del modelo.

Variable	Valor
Q_{CO2}	1.53×10^{-4} kg/s
Masa de la muestra	6.9427×10^{-3} kg
Masa de extracto	2.311×10^{-4} kg
m_{SI}	6.7116×10^{-3} kg
X_0	0.034
Y^*	2.1607×10^{-4} kg/kg
Número de puntos experimentales (n)	18

2.11.1 Función objetivo y restricciones

La función objetivo del problema de optimización es la minimización de la sumatoria del error relativo, de acuerdo a Martínez et al. [87]:

$$\text{Minimizar: } Error(y(t_{CER}, Z, t_{FER}), y_{obs}) \quad (2 - 4)$$

$$Error = \sum_{i=1}^n \frac{|y(t_i) - y_{obs}(t_i)|}{y_{obs}(t_i)} \quad (2 - 5)$$

Las restricciones son funciones definidas para evitar soluciones matemática y/o fenomenológicamente improbables.

Dado que Z es un parámetro asociado al efecto de convección de la primera etapa, el caso $Z=0$ solo debería ser considerado si $t_{CER}=0$, dado que en este caso la extracción únicamente estaría gobernada por la difusión (tercer periodo), es por esto que $Z=0$ y $t_{CER}>0$ es físicamente imposible. Para evitar que esta combinación suceda se colocan límites superiores arbitrarios para Z y t_{CER} : $Z \geq Z_{\min} > 0$ y $t_{CER} \geq t_{CER\min} > 0$, respectivamente. De esta forma, estos números pueden tomar valores muy pequeños, pero no cero.

En una simulación realista la fracción de material extraíble de las células rotas debe ser menor a la fracción total de material extraíble ($X_p \leq X_0$), por lo que de acuerdo con la ecuación (1-5) y (1-6) se debe cumplir que:

$$Z \leq \frac{m_{SI} X_0}{t_{CER} Y^* Q_{CO2}} \quad (2 - 6)$$

A través de la ecuación (1-7) se puede ver que existe una relación entre W y t_{FER} , es decir, al dar una estimación de la una se obtiene la otra; no es necesario estimar ambas. Sin embargo, se prefiere estimar t_{FER} puesto que tiene un significado físico. Al realizar los límites de t_{FER} cuando tiene a cero y a infinito se obtiene que:

$$\lim_{W \rightarrow 0} t_{FER}(W) = t_{CER} + \frac{m_{SI}X_p}{Q_{CO2}Y^*} = t_{CER}(1 + Z) \quad (2 - 7)$$

$$\lim_{W \rightarrow \infty} t_{FER}(W) = t_{CER} + \frac{m_{SI}X_0}{Q_{CO2}Y^*} \quad (2 - 8)$$

Teniendo en cuenta todo lo anterior, las restricciones serían las siguientes:

$$t_{CER}^{min} \leq t_{CER} \leq t_n \quad (2 - 9)$$

$$Z^{min} \leq Z \leq \frac{m_{SI}X_0}{t_{CER}Y^*Q_{CO2}} \quad (2 - 10)$$

$$t_{CER}(1 + Z) \leq t_{FER} \leq t_{CER} + \frac{m_{SI}X_0}{Q_{CO2}Y^*} \quad (2 - 11)$$

Se asumieron los valores de t_{FER} , t_{CER} y Z , los cuales serían las variables de optimización siguiendo el algoritmo de cálculo descrito en la Figura 2-3.

Para encontrar los valores de las variables asumidas, se optimizó manualmente, explorando inicialmente distintas regiones de la función objetivo y contrastando visualmente con el ajuste gráfico de la curva. No fue posible realizar una optimización por medio del complemento de optimización del software Matlab dado que éste calcula el primer valor de la función objetivo sin tener en cuenta las restricciones, y al tomar valores inviables la optimización se detiene (para código de Matlab ver Anexo D).

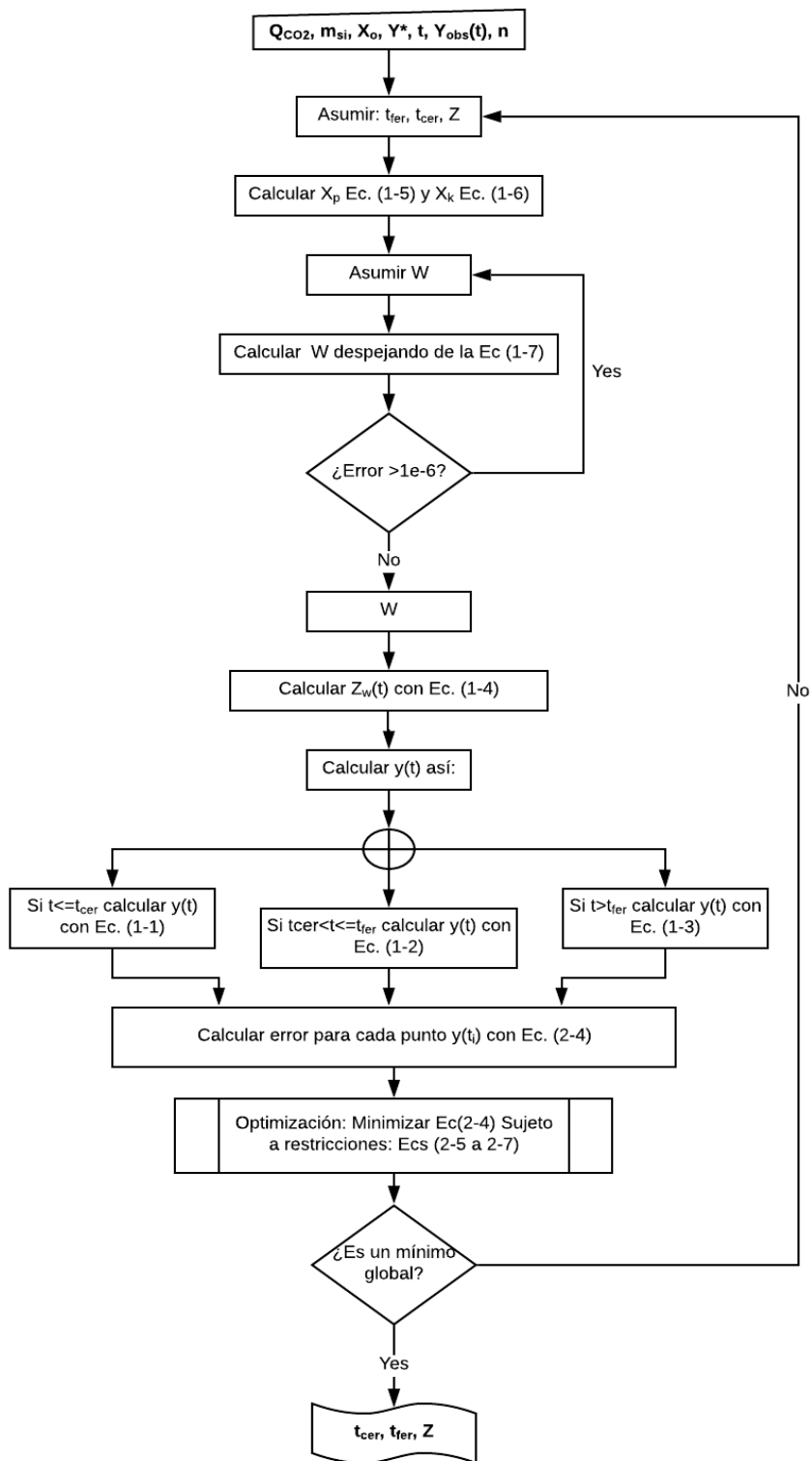


Figura 2-3: Algoritmo de cálculo para el modelo cinético de Sovová.

3. Análisis y discusión de resultados

3.1 Extracción Soxhlet

El contenido de los metabolitos obtenidos por extracción Soxhlet de los epicarpios de naranja tangelo y mandarina 'Arrayana' se observa en la Figura 3-1 y el rendimiento en la Figura 3-2. De forma general, el epicarpio de mandarina presentó más de 800 mg-eq de AG/100 g de muestra seca (CTF) y más de 7 mg-eq β -caroteno/100 g de muestra seca (CTC); por su parte el CTFo fue superior en el epicarpio de tangelo (superó los 10 mg-eq de naringina/100 g de muestra seca).

Los CTF reportados en epicarpio de mandarina son muy variados: Se encuentra en la variedad 'Ponkan' valores de 2800-3100 mg-eq AG/100 g de muestra seca (ms), extractos con agua caliente [37] y 1956 mg-eq AG/100 g ms, extrayendo con metanol al 70% [38]; para variedad 'Ellendale' extraída con etanol al 70% se encontró 605.7 mg-eq AG/100 g ms [99], siendo este valor cercano a los obtenidos en el presente estudio (Tabla 3-1). Para tangelo se reporta 2.29 mg-eq AG/ 100 g ms [100], y 633 y 720 mg-eq AG/100 g de epicarpio fresco para flavedo y albedo, respectivamente [101], lo cual difiere de los resultados obtenidos (875 mg AG/100 g ms para Soxhlet de etanol). Las variaciones en estos datos normalmente están asociadas con el tipo de disolvente, la metodología de extracción empleados, así como por la variedad del fruto. Se resalta que para la mandarina 'Arrayana' no se han encontrado reportes.

El CTFo fue ligeramente superior en tangelo, probablemente por la mayor cantidad de albedo que contiene esta fruta, donde se concentran dichos metabolitos [57]. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Peterson et al. [55], donde la mandarina se clasifica con bajo contenido de flavanonas, mientras que el tangelo se clasifica con

contenido moderado de las mismas. El contenido de estos metabolitos determinados por cromatografía para las biomásas de estudio se encuentran entre 8-100 mg flavanonas/g ms, dependiendo del solvente con el cual fueron extraídas [37,40,100,102,103]. Los datos obtenidos se encuentran muy por debajo de estos valores (1-12 mg-eq naringina (N)/100 g ms), por lo que se puede afirmar que la concentración de flavanonas en las biomásas de estudio es baja, respecto a la información encontrada en literatura para otros cultivares.

Sin embargo, los resultados observados para otras biomásas que utilizan la determinación espectrofotométrica con DNPH indican una relación de proporción entre contenido total de fenoles y flavanonas similar a las obtenidas (aproximadamente 2% en peso de flavanonas respecto a fenoles totales, ver Tabla 3-1) [93-96]. Por ejemplo, para extracto metanólico de la fruta *Carissa carandas*, se obtuvo una concentración de polifenoles de 1580 mg-eq AG/100 g ms y una de flavanonas de 34.6 mg-eq N/100 g ms [106]; para extracto hidro-alcohólico de *Opuntia elatior* se obtuvo una concentración de fenoles de 44.0 mg-eq AG/ g extracto y de flavanonas de 1.05 mg-eq N/g extracto [105].

Respecto al contenido total de carotenoides, éstos resultaron mayores en mandarina que en tangelo (7.6 vs 2.1 mg de beta-caroteno/100 g ms); resultado esperado debido al color naranja del epicarpio de la mandarina. En la literatura se reporta el CTC para mandarina 'Ponkan' de 2.04 mg de beta-caroteno/100 g ms [39], lo cual se encuentra en el mismo orden de magnitud que los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos en literatura para rendimiento son diversos; los rendimientos obtenidos con etanol por maceración de compuestos fenólicos van del 11 al 46% en base seca [22], lo cual depende del tiempo de extracción, la cantidad de solvente, la temperatura, entre otras variables. Distintos autores afirman que los mejores rendimientos se obtienen con metanol, seguido de etanol y acetato de etilo, lo que concuerda con el presente trabajo, sin embargo, no se recomienda el uso del metanol debido a su toxicidad [22]. Por su parte, el alto rendimiento de los extractos etanólicos no podría ser atribuido con certeza a una mayor extracción de polifenoles. Los mayores rendimientos son obtenidos con etanol (Figura 3-2, Tabla 3-1), sin embargo, esto no posee una relación directa con el contenido de compuestos fenólicos en el extracto (Tabla 3-1), puesto que éste no sigue la misma tendencia que el rendimiento.

Probablemente, el aumento se debe a que los azúcares presentes en la muestra son afines con el etanol por la presencia de múltiples grupos OH.

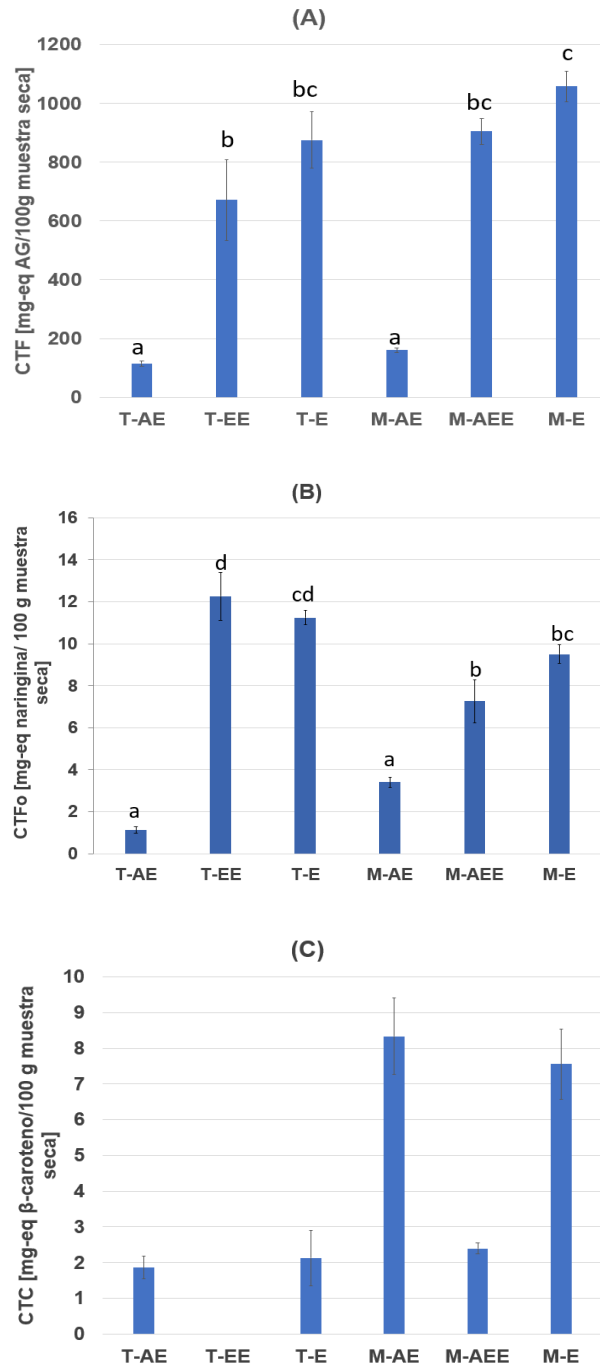


Figura 3-1: Contenido de metabolitos en las biomazas de estudio.

(A) CTF. (B) CTFo. (C) CTC. Las letras “M” y “T” corresponden al tipo de biomasa. Las letras AE, EE y E indican el tipo de extracto Soxhlet. Las letras sobre las barras corresponden al análisis de Tukey con resultados significativamente diferentes para $p < 0.05$, barras de error con $n=3$.

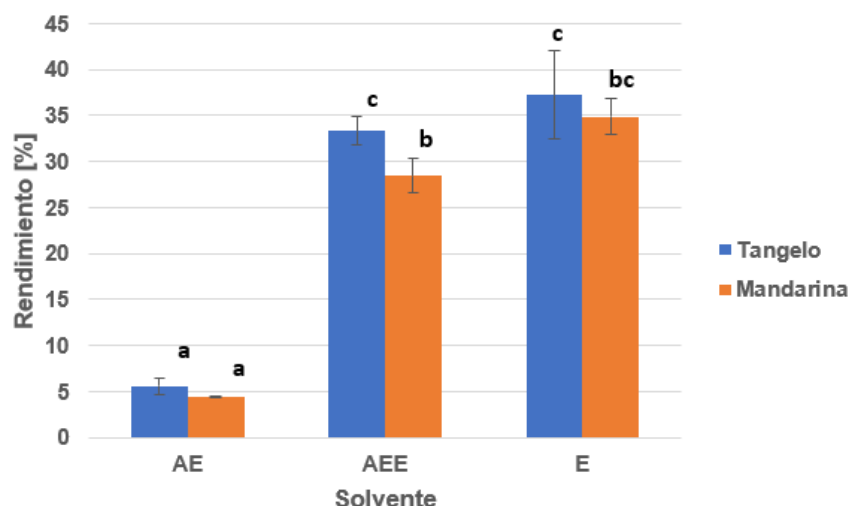


Figura 3-2: Rendimiento de los extractos Soxhlet.

Las letras sobre las barras corresponden al análisis de Tukey con resultados significativamente diferentes para $p < 0.05$, barras de error con $n=3$.

Tabla 3-1: Resultados de la extracción Soxhlet: Rendimiento, contenido de compuestos fenólicos, flavanonas, carotenoides y porcentaje de inhibición de radical DPPH.

Extracto	Rendimiento	CTF (mg-eq AG)		CTFo (mg-eq N)		CTC (mg-eq B-caroteno)		Inhibición %
		Por g de extracto	Por 100 g ms	Por g de extracto	Por 100 g ms	Por g de extracto	Por 100 g ms	
T-AE	5.61±0.90 ^a	20.70±1.78 ^a	115.10±8.33 ^a	0.20±0.04 ^a	1.13±0.14 ^a	0.34±0.08 ^b	1.86±0.31 ^a	18.75±2.68 ^a
T-EE	33.33±1.52 ^c	20.04±3.15 ^a	671.03±137.51 ^b	0.37±0.01 ^d	12.26±1.13 ^d	N.D.	N.D.	24.84±2.29 ^{ab}
T-E	37.24±4.81 ^c	23.68±3.15 ^a	874.92±96.24 ^{bc}	0.30±0.03 ^c	11.24±0.33 ^{cd}	0.06±0.01 ^a	2.13±0.78 ^a	27.77±0.75 ^b
M-AE	4.49±0.08 ^a	35.71±1.54 ^c	160.23±8.20 ^a	0.76±0.06 ^e	3.41±0.23 ^a	1.86±0.25 ^c	8.34±1.07 ^b	25.52±2.80 ^{ab}
M-AEE	28.43±1.87 ^b	31.89±1.83 ^b	904.87±43.39 ^{bc}	0.25±0.01 ^{ab}	7.26±1.01 ^b	0.08±0.00 ^a	2.39±0.15 ^a	27.21±4.19 ^b
M-E	34.85±1.97 ^{bc}	30.38±1.43 ^b	1057.50±51.11 ^c	0.27±0.02 ^{bc}	9.51±0.44 ^{bc}	0.22±0.02 ^b	7.56±0.98 ^b	24.02±1.09 ^{ab}

Las letras sobre las barras corresponden al análisis de Tukey con resultados significativamente diferentes para $p < 0.05$, desviación estándar con $n=3$. N.D: No detectado. ms: muestra seca

Considerando los resultados obtenidos por extracción Soxhlet, la caracterización de estos residuos permite direccionar el potencial que tienen para generar productos con valor agregado. Por otra parte, se observó que la mandarina Arrayana posee contenidos de metabolitos ligeramente mayores a la naranja tangelo. Por tanto, el epicarpio de este fruto se escogió para continuar con el presente estudio.

3.2 Curva de extracción

Al realizar la curva de extracción sobre la biomasa escogida, se observó que en 5 h se agotó la torta de extracción, presentándose el comportamiento asintótico característico de una curva de extracción (Figura 3-3). Sin embargo, se tomó el tiempo en el que se logró el 70% del rendimiento. Esto debido a que, en términos económicos la experiencia indica que en muchas ocasiones no resulta práctico extender el tiempo de operación hasta agotar 100% la torta. Además, es más conveniente detener la extracción cerca al fin del periodo de velocidad de extracción constante para obtener los mejores costos de manufactura [71].

Por otra parte, al disminuir la presión y el porcentaje de co-solvente la densidad del CO₂ baja, lo que a su vez, disminuye el poder de solvatación. Adicionalmente, la difusividad de CO₂ disminuye al bajar la temperatura [23,108]. Por ende, escoger el tiempo de extracción a estas condiciones, con poco poder de solvatación y baja velocidad de transferencia de masa, asegura que para las condiciones más favorables (con mayor densidad de solvente y mayor temperatura) se logre un mayor agotamiento de la muestra.

Teniendo en cuenta lo anterior, el tiempo escogido fue de 210 min, el cual se aplicó a todos los puntos del diseño experimental para hacer comparables las respuestas entre sí.

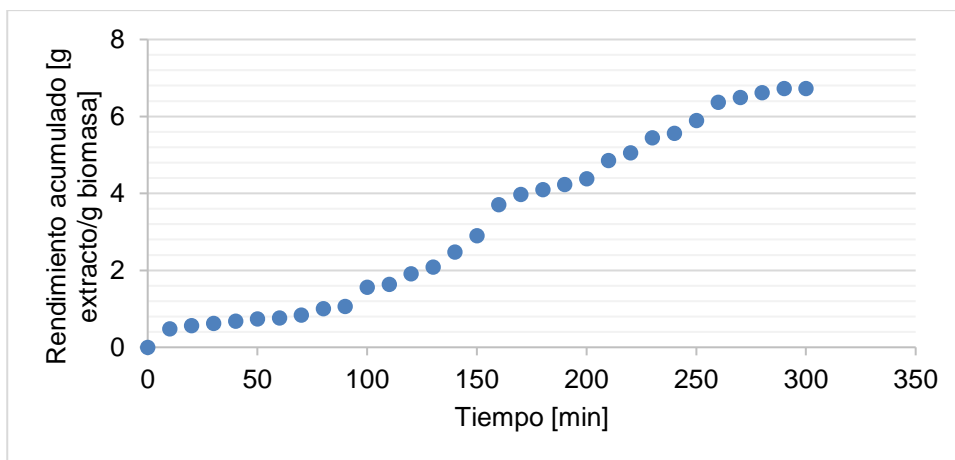


Figura 3-3: Curva de extracción de epicarpio de mandarina con CO₂ supercrítico y EtOH como co-solvente (120 bar, 50 °C, 5% de EtOH).

3.3 Extracción con fluidos supercríticos

En la Figura 3-4 se observa que, con la EFS a partir de epicarpio de mandarina, se obtiene, en general, mayores contenidos de metabolitos y actividad antioxidante-AA que con la extracción Soxhlet a pesar de que esta última presenta mayores rendimientos. Una posible explicación para la mayor actividad biológica de los extractos EFS es que dicha técnica presenta mayor selectividad para la extracción de compuestos con AA, la cual puede atribuirse a los polifenoles [63]. Esto último se confirma al observar que el CTF, el CTFo y la AA se encuentran relacionados entre sí de forma lineal (coeficiente de correlación superior al 85%) según el análisis de correlación de Pearson (ver Anexo B), siendo probablemente estas moléculas las responsables de la AA *in vitro*.

Se observa que los extractos 5 y 11 son los que tienen mayor AA, reduciendo casi en su totalidad el radical DPPH. Estos extractos fueron extraídos en condiciones de alta presión y temperatura, encontrándose preliminarmente un efecto positivo de estas variables sobre la actividad, probablemente debido al mejoramiento de la difusividad del solvente en la matriz, tal como se reporta para cáscaras de *Citrus junos* [24]. Esto es confirmado por el análisis del diagrama de Pareto (Figura 3-5), el cual evalúa el efecto de las variables sobre la AA. Adicionalmente, se observa un efecto negativo del aumento del porcentaje de EtOH sobre la actividad antioxidante, probablemente por la pérdida de selectividad al perder el estado supercrítico, ya que se cree que el punto crítico cambia al modificar el co-solvente [109] y al aumentarlo considerablemente, es probable que se esté extrayendo a condiciones sub-críticas [110]. En la Tabla 3-2 se muestra el estado en el cual se cree se encuentra la mezcla de solventes para cada combinación de P, T y % EtOH, de acuerdo a los puntos críticos calculados a través del método de Heidemann-Khalil, el cual calcula los puntos críticos de una mezcla a partir de los puntos críticos de las sustancias puras [111].

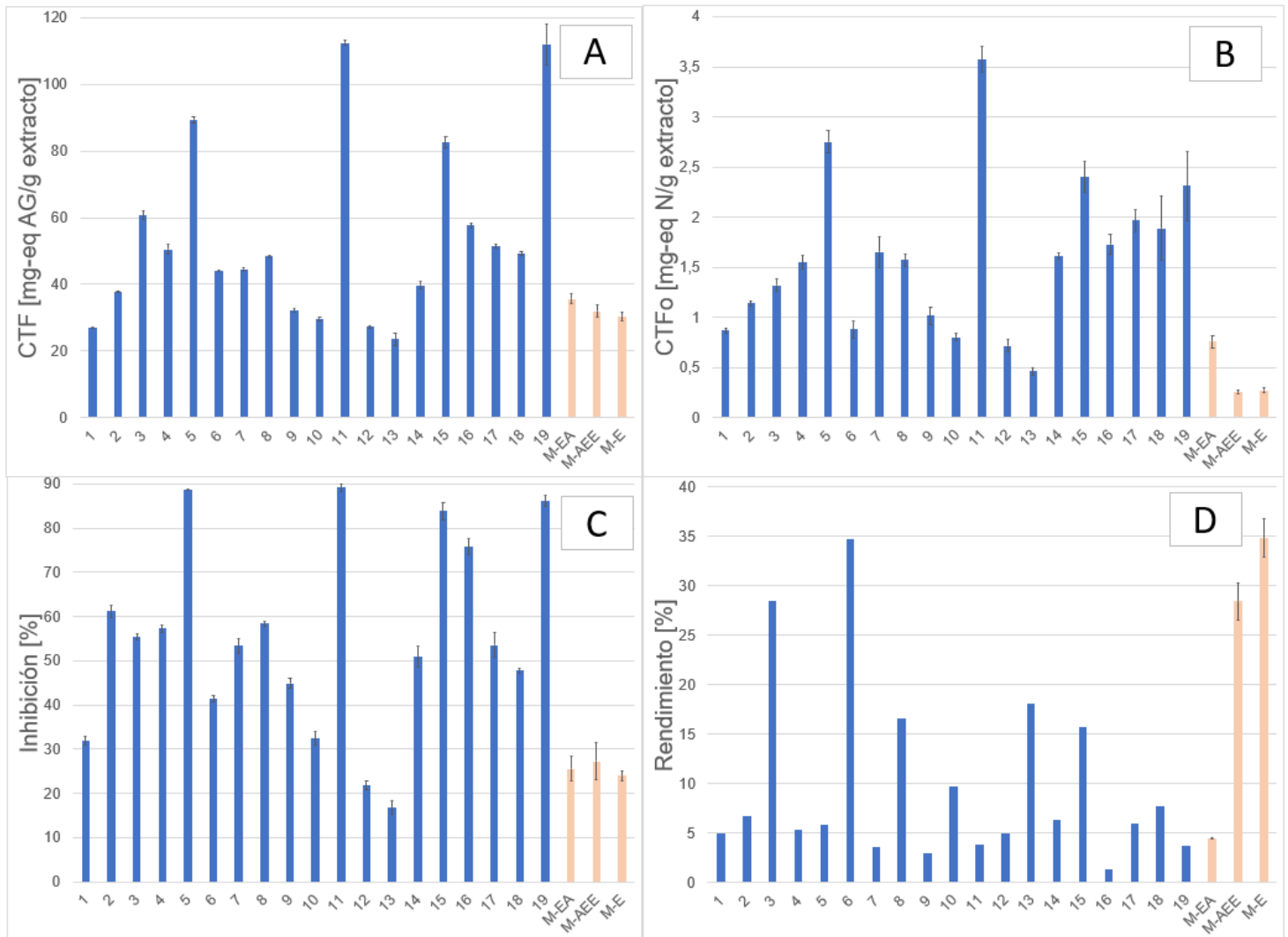


Figura 3-4: Variables de respuesta de los extractos obtenidos por EFS: **A.** CTF, **B.** CTfo, **C.** Actividad captadora de radicales DPPH, **D.** Rendimiento de extracción.

CTF: expresado en mg-eq de ácido gálico (AG) por gramo de extracto. CTfo: en mg-eq naringina/g de extracto. Actividad captadora de radicales DPPH expresada como porcentaje de inhibición de oxidación.

Rendimiento expresado en porcentaje (g de extracto/100 g de muestra seca). Las barras naranjas corresponden a los extractos Soxhlet. Las barras de error indican la desviación estándar para n=3.

Al comparar contra literatura, se observa una tendencia similar: al aumentar presión y temperatura se aumenta la cantidad de flavonoides extraídos, hasta cierto punto. Por ejemplo, en el estudio realizado en *C. depressa*, se observó un aumento en la extracción de nobiletina y tangeretina al pasar de 20 a 30 MPa debido al aumento de densidad del solvente, pero una disminución en el intervalo de 30 a 40 MPa [112], explicado tal vez por

un cambio de polaridad del solvente, lo cual afecta la solubilidad del soluto [108] Adicionalmente, según Díaz-Reinoso et al., mayores incrementos de presión pueden representar un aumento en la viscosidad, lo cual reduce los coeficientes de difusión [72]. En el estudio en *C. depressa*, se observó un incremento en el contenido de metabolitos al aumentar la temperatura [112], tal como se observó en el presente estudio. Dicho comportamiento puede deberse al aumento de la presión de vapor de los solutos (lo cual le permite vaporizarse hacia el disolvente) y al aumento en la difusividad. Esto contrarresta el efecto de disminución de la densidad asociado al aumento de temperatura.

Tabla 3-2: Contenido de metabolitos y actividad antioxidante para extractos EFS.

N°	Presión [bar]	Temp [°C]	% co solvente	Estado [P/SC]	Rend [%]	CTF [mg-eq AG/g extracto]	CTFo [mg-eq N/g extracto]	% inhibición
1	120	50	5	P	5.01	26.88±0.16 ^{bc}	0.87±0.02 ^{bc}	31.92±1.04 ^c
2	170	65	10	SC	6.79	37.70±0.06 ^d	1.14±0.02 ^{cd}	61.17±1.48 ⁱ
3	120	80	15	P	28.47	60.74±1.22 ⁱ	1.32±0.06 ^{de}	55.31±0.70 ^{hi}
4	254	65	10	SC	5.38	50.54±1.61 ^h	1.55±0.06 ^{ef}	57.35±0.87 ^{hij}
5	170	90	10	SC	5.88	89.33±0.98 ^k	2.75±0.10 ^j	88.58±0.14 ^m
6	86	65	10	P	34.76	43.92±0.98 ^{ef}	1.65±0.15 ^{bc}	41.43±0.74 ^d
7	170	65	10	SC	3.67	44.51±0.63 ^{efg}	2.47±0.14 ^{efg}	53.36±1.60 ^{gh}
8	170	65	18.4	P	16.60	48.37±0.38 ^{fgh}	1.58±0.06 ^{efg}	58.45±0.60 ^{ij}
9	220	50	5	P	3.04	32.07±0.50 ^c	1.02±0.08 ^{bcd}	44.92±1.17 ^{de}
10	220	50	15	P	9.74	29.68±0.54 ^{bc}	0.81±0.03 ^{abc}	32.49±1.57 ^c
11	220	80	5	SC	3.90	112.42±0.79 ^l	3.57±0.13 ^k	89.22±0.88 ^m
12	170	40	10	P	5.00	27.29±0.39 ^{abc}	0.72±0.05 ^{ab}	21.85±1.08 ^b
13	120	50	15	P	18.12	23.53±1.72 ^a	0.46±0.03 ^a	16.81±1.47 ^a
14	170	65	10	SC	6.31	39.72±1.21 ^{de}	1.61±0.02 ^{efg}	50.92±2.41 ^{fg}
15	220	80	15	P	15.78	82.56±1.67 ^j	2.40±0.15 ^{ij}	83.83±1.96 ^l
16	170	65	1.6	SC	1.42	57.65±0.68 ⁱ	1.73±0.10 ^{fg}	75.80±1.82 ^k
17	170	65	10	SC	5.97	51.35±0.58 ^h	1.97±0.10 ^{gh}	53.60±2.82 ^{gh}
18	170	65	10	SC	7.73	49.25±0.67 ^{gh}	1.89±0.31 ^{fg}	47.76±0.63 ^{ef}
19	120	80	5	SC	3.71	111.92±5.99 ^l	2.31±0.34 ^{hi}	86.16±1.34 ^{lm}

La columna 'Estado' indica la fase en que se encuentra la mezcla de disolvente (Presurizado-P, supercrítico-SC), calculado por el método Heidemann y Khalil [113]. Los datos se presentan con promedios y desviación estándar (n=3). Los superíndices indican resultados significativamente diferentes (p<0.05), análisis de Tukey.

En resumen, la EFS resultó ser más efectiva que la extracción Soxhlet, aumentando considerablemente el contenido de metabolitos y la AA, a pesar del menor rendimiento. Al obtener extractos con alta concentración de polifenoles, en comparación con los extractos Soxhlet, se puede afirmar que existe un cierto grado de selectividad de la EFS hacia los compuestos de interés. El mejor extracto en términos de CTF y CTFo fue el extracto 11 (220 bar, 80°C y 5% de EtOH), 112.42 mg-eq AG/g extracto y 3.57 mg-eq N/g extracto, respectivamente, el cual redujo en mayor medida el radical DPPH (89%).

3.3.1 Metodología de superficie de respuesta

El modelo matemático que representa la actividad antioxidante (AA) de los extractos de epicarpio de mandarina como una función de la presión (P), temperatura (T) y porcentaje de co-solvente (%EtOH) en de la región ensayada corresponde a la Ecuación 3-1.

$$AA = -0,4394 + 0,00266478*P + 0,0166439*T - 0,0599443*(\% EtOH) - 0,00000916038*P^2 + 0,00000486667*P*T + 0,0001408*P*(\% EtOH) - 0,0000103294*T^2 - 0,000145333*T*(\% EtOH) + 0,00159207*(\% EtOH)^2 \quad (3-1)$$

Generalmente la optimización de una superficie de respuesta puede arrojar resultados engañosos a menos que el modelo posea un buen ajuste. El coeficiente R^2 es una medida del grado de ajuste, indicando un mejor ajuste cuando se aproxima a la unidad [108]. Por el análisis de varianza este valor fue determinado como 0.964324 (ver Anexo B), por lo que se puede decir que el modelo de regresión representó bien el comportamiento real del sistema.

El sólido de respuesta obtenido muestra una correlación directa entre la presión y la temperatura con la AA (Figura 3-6). Esto se aprecia en el diagrama de Pareto (Figura 3-5), donde el efecto principal sobre la actividad antioxidante es ejercido por la temperatura, seguido por el porcentaje de etanol, que ejerce un efecto negativo sobre la AA. Al respecto, al aumentar el porcentaje de etanol se requiere mayor temperatura y presión para alcanzar el punto crítico de la mezcla [71]. Se pudo verificar que para el nivel alto de co-solvente (15%), la mezcla se podría encontrar en estado subcrítico, al calcular el punto crítico de la mezcla utilizando el método de Heidemann y Khalil [111] (código de Matlab en Anexo D), teniendo en cuenta que el uso de este modelo es una aproximación a la realidad. Este cambio de estado pudo afectar el poder de solvatación del solvente o su afinidad por los analitos de interés.

Las condiciones óptimas para este diseño experimental se encuentran en 192 bar, 90 °C y 1.6% de EtOH. Dos de los valores óptimos de las variables se encuentran en los puntos estrellas, por lo que esta optimización, seguramente, representa un mínimo local. Si se desea encontrar el óptimo global, se deben expandir los límites de la temperatura y el porcentaje de cosolvente del diseño experimental original.

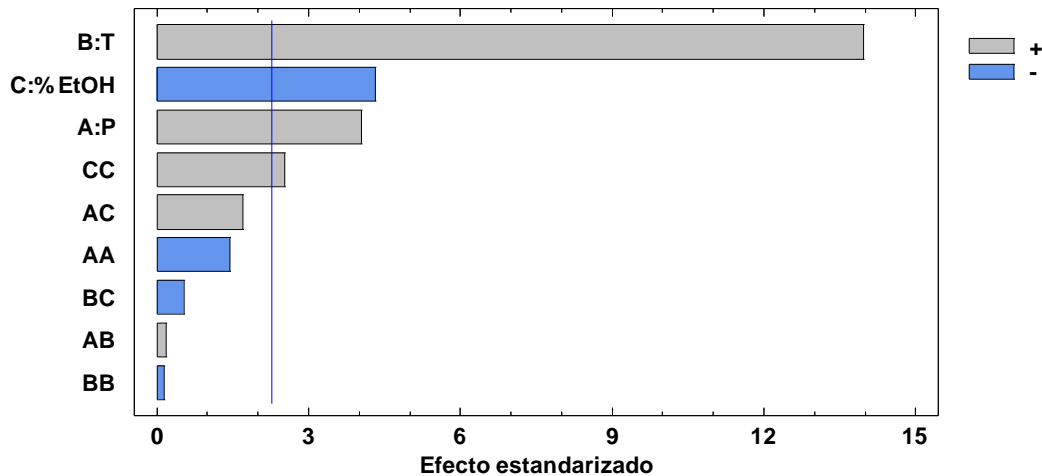


Figura 3-5: Diagrama de Pareto de efecto estandarizado para la AA.

Las barras grises indican que la variable tiene un efecto positivo sobre la respuesta y las azules un efecto negativo.

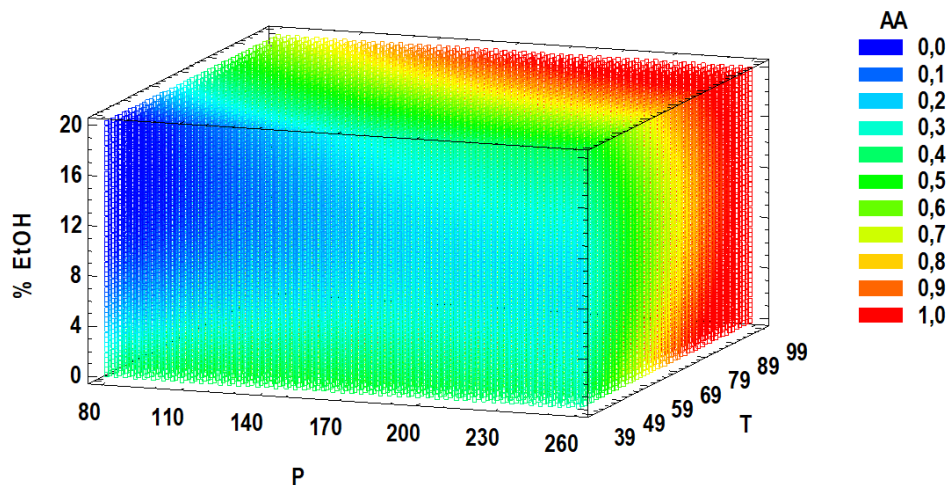


Figura 3-6: Sólido de respuesta para el diseño experimental factorial compuesto que optimiza la respuesta para la actividad antioxidante.

La metodología de superficie de respuesta es una herramienta que permite analizar estadísticamente el efecto de las variables sobre respuesta de un diseño experimental. En este caso se pudo establecer que la temperatura poseía el efecto más significativo sobre la actividad antioxidante, lo cual es útil para encontrar condiciones óptimas de operación y permitir el escalamiento de este tipo de procesos de extracción que han demostrado ser eficaces para la extracción de analitos de alto valor agregado.

3.4 Adición del mejor extracto a una mayonesa

De acuerdo con los resultados obtenidos en la sección anterior, el extracto 11 se probó como antioxidante en una mayonesa, para observar si en la interfase agua/aceite el antioxidante podría actuar y proteger al aceite de la oxidación.

3.4.1 Cuantificación de TBARS

Es evidente que el extracto protege de la oxidación a la mayonesa según el ensayo acelerado de oxidación (Tabla 3-3), siendo estadísticamente diferentes del control negativo (mayonesa sin antioxidantes). Con respecto a la concentración, se observa una diferencia significativa en el día 4 del extracto a 1000 ppm con respecto a los extractos a concentración menor. Al final del se observa que el extracto adicionado en menor concentración tiene una mayor protección contra la oxidación de la emulsión, con una concentración de TBARS similar al BHA (Figura 3-7), demostrando la eficacia de dicho extracto contra la oxidación de la mayonesa.

Tabla 3-3: Resultados de TBARS para el extracto obtenido por EFS.

Las letras corresponden al análisis de Tukey con resultados significativamente diferentes para $p < 0.05$, desviación estándar con $n=3$.

Extractos	Concentración de TBARS por día [$\mu\text{g MDA/g mayonesa}$]			
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6
250 ppm	0.277 \pm 0.009 ^a	0.345 \pm 0.036 ^b	0.528 \pm 0.031 ^c	0.789 \pm 0.031 ^b
500 ppm	0.277 \pm 0.009 ^a	0.311 \pm 0.026 ^b	0.537 \pm 0.027 ^c	0.851 \pm 0.021 ^b
1000 ppm	0.277 \pm 0.009 ^a	0.342 \pm 0.006 ^b	0.623 \pm 0.044 ^b	0.828 \pm 0.007 ^b
TBHQ 200ppm	0.178 \pm 0.037 ^b	0.169 \pm 0.000 ^c	0.249 \pm 0.006 ^d	0.279 \pm 0.020 ^c
BHA 140ppm	0.176 \pm 0.008 ^b	0.321 \pm 0.012 ^b	0.621 \pm 0.030 ^b	0.798 \pm 0.068 ^b
Control	0.277 \pm 0.009 ^a	0.437 \pm 0.042 ^a	0.765 \pm 0.030 ^a	1.077 \pm 0.039 ^a

La concentración de TBARS al final del ensayo es aproximadamente 4 veces mayor para la muestra control. Esto es similar con lo reportado por Raikos et al. [93], donde el valor es 3.5 veces mayor para la mayonesa elaborada con aceite de canola después de 4 semanas de almacenamiento a 4°C. En estas condiciones, el ensayo de TBARS para una mayonesa adicionada con remolacha reportó valores que se encuentran 50% por debajo del control sin antioxidantes.

Aunque el TBHQ presenta un mejor desempeño que el BHA, se observó que a partir del cuarto día la mayonesa con TBHQ tomaba un color rojizo, probablemente debido a una reacción adversa con éste. El Codex Alimentarius no reporta el TBHQ como un antioxidante utilizado en mayonesa, probablemente debido a este comportamiento.

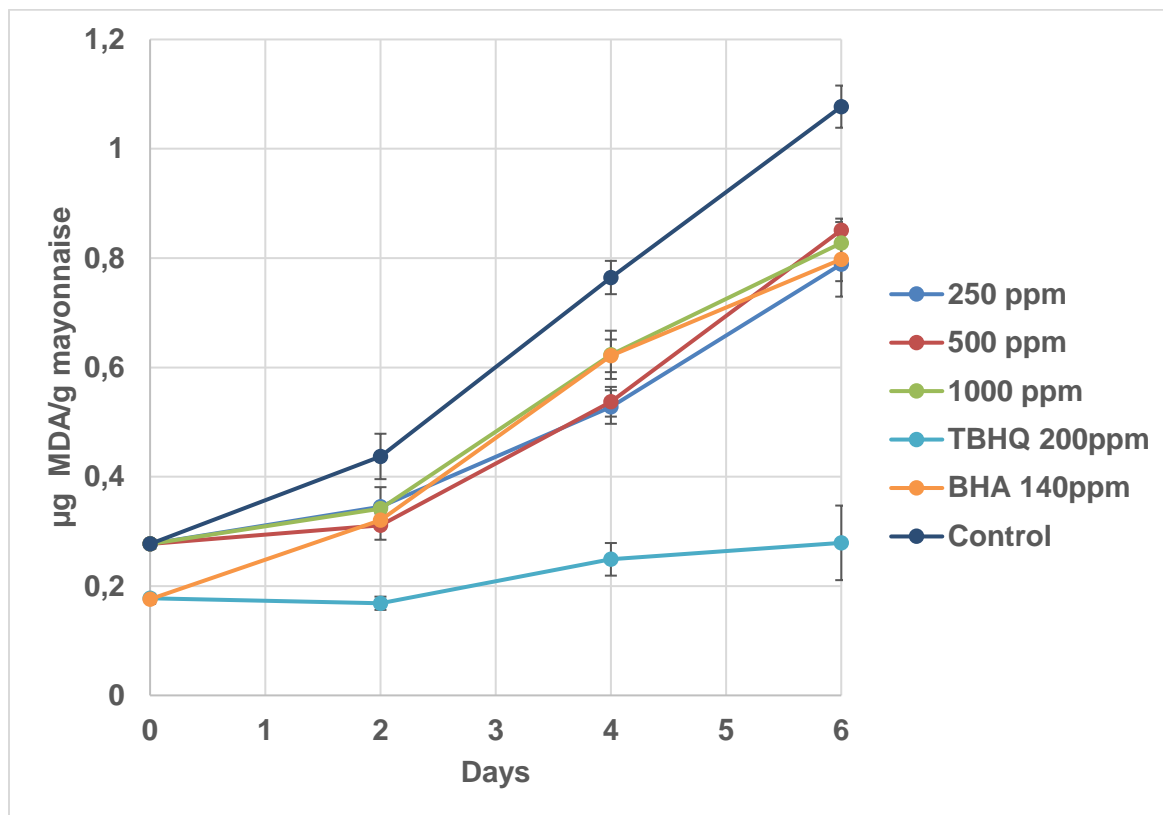


Figura 3-7: Cuantificación de TBARS para el extracto obtenido por EFS.

Control negativo: mayonesa sin antioxidantes. Controles positivos: BHA y TBHQ.

En la presente investigación el extracto 11, adicionado a 250 ppm-almacenado por 6 días a 60°C, disminuyó en un 30% los TBARS generados, comportamiento similar al BHA, antioxidante empleado en la industria alimentaria. Cabe señalar que un extracto obtenido de hojas de marañón por ultrasonido con EtOH, adicionado a 200 ppm, logró un 35% de protección respecto a la mayonesa control, dicho valor resultó similar al del antioxidante sintético BHT adicionado a 200 ppm al día 30 de almacenamiento a 30°C [114].

Previamente ha sido reportado el uso de extractos metanólicos de cáscara de cítricos para la conservación en aceite de maíz, con comportamientos parecidos a los

antioxidantes BHA y BHT [115], e incluso se ha estudiado el epicarpio de tangelo para la conservación de aceite de sacha inchi [100], logrando mejorar el tiempo de vida útil del aceite sin adición de antioxidantes. Aunque el uso de extractos cítricos para la conservación de mayonesa no ha sido ampliamente reportado, el haber empleado el antioxidante sintético como control positivo permitió establecer un mejor punto de referencia para determinar la efectividad de los extractos empleados.

El empleo de este tipo de ensayos para la determinación de la actividad antioxidante de un extracto representa una aproximación más cercana a la realidad, ya que se realiza directamente sobre la matriz que se quiere proteger, a diferencia de los métodos espectrofotométricos que utilizan sustratos sintéticos o que pueden tener falsos positivos al determinar los contenidos de compuestos antioxidantes pero que bien se pueden utilizar a modo de *screening* fitoquímico cuando se tienen gran cantidad de muestras.

A partir de los resultados obtenidos se puede afirmar que el extracto de cáscara de mandarina obtenido con EFS inhibe la oxidación de un alimento emulsionado como la mayonesa al adicionarlo a 250 ppm, logrando con esto un efecto similar al del antioxidante sintético BHA.

3.5 Análisis por LC de los extractos obtenidos por EFS

Con el fin de identificar polifenoles de tipo flavonoide normalmente encontrados en cítricos, a los cuales pudiera atribuírsele la AA, los extractos obtenidos por EFS se sometieron a análisis por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (Figura 3-8). Para ver los cromatogramas de todos los extractos ver Anexo C.

Como muestra de lo importante de determinar la identidad de los componentes de los extractos; en la prevención de la lipoperoxidación en microsomas de hígado se afirma que la hesperetina, nobiletina y tangeretina son más activas que la diosmina, hesperidina y neohesperidina. Es probable que alguno(s) de estos compuestos sean los responsables de la protección de la emulsión. Los autores explican que la actividad antioxidante en matrices lipídicas disminuye con las glicosilaciones y se mejora con la presencia de grupos hidroxilo en el anillo, con doble enlace en C2-C3 [58].

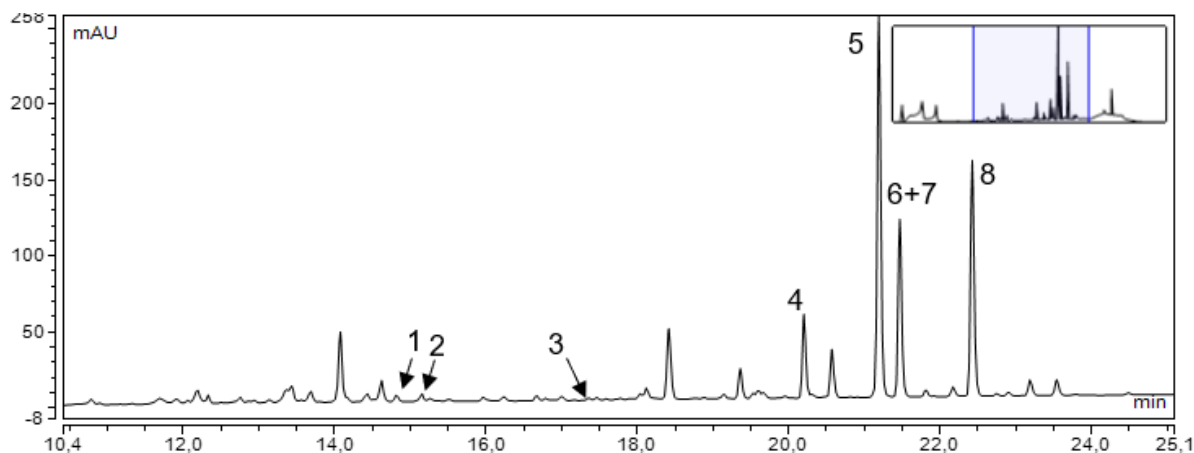


Figura 3-8: Cromatograma del extracto más activo (extracto EFS 11).

Se muestran los picos de los ocho compuestos identificados a 280 nm.

En todos los extractos fue posible identificar ocho señales correspondientes a flavonoides (Tabla 3-4) a través de la comparación de los espectros UV obtenidos (Figura 3-9) y el orden de elución, con aquellos encontrados en la literatura para las flavanonas y flavonas que son normalmente encontradas en cítricos [116]. Las áreas de dichas señales se registran en la Tabla 3-5.

Las flavanonas poseen un espectro UV característico, que consta de una Banda II con un máximo de absorción fuerte entre 270 y 295 nm y un hombro para la Banda I entre 326-327 nm [117]. El compuesto 1 fue identificado como naringina, contra estándar (ver Anexo C). El compuesto 2 tuvo mucha similitud al espectro UV reportado en trabajos previos [118,119], por lo que se identificó como hesperidina, y se considera el polifenol mayoritario en mandarina [58]. En el caso de la identificación de la naringina (compuesto 1) y naringenina (compuesto 3), éstos poseen un espectro UV muy parecido [118], pero se diferencian por el tiempo de retención, puesto que la naringina, al ser glicosidada tiene mayor polaridad y eluye primero que la naringenina. En general las flavanonas se encuentran principalmente en los frutos cítricos y están asociadas a múltiples beneficios en la salud debido a su capacidad de atrapar radicales libres [65].

Comparando los espectros UV con los encontrados en la literatura, así como compuestos reportados para mandarina, se clasificaron tentativamente los compuestos 4-8 como de la familia de las flavonas, por su parecido con el espectro UV típico [120]. La Banda I

presenta máximos entre 320–385 nm, que representa la absorción del anillo B mientras que la Banda II (250–285 nm) corresponde a la absorción del anillo A [117].

El compuesto 4 se identificó como sinensetina debido al espectro reportado por Wang, 2007 [121]. Se identificaron tentativamente los compuestos 5 y 8 como nobiletina y tangeretina, respectivamente. Éstas son flavonas polimetoxiladas, de acuerdo a los espectros UV reportados por Sun, 2010 [122].

El compuesto 6 se identificó tentativamente como tetrametil-o-scullareteina, debido a su similaridad con el espectro reportado por Wang, 2007[121]. En el mismo tiempo de retención se ubicó el compuesto 7, el cual ha sido tentativamente identificado como heptametoxiflavona (HMF) [121]. Es de aclarar que se presentó una co-elución de los compuestos 6 y 7, debido que en algunos extractos se presentaba el mismo tiempo de retención para dos espectros diferentes. En el caso que se observó la elución del compuesto 6 (en la mayoría de los extractos) es muy probable que esté co-eluyendo el compuesto 7, debido a que la intensidad de las bandas es mayor en éste. La HMF ha sido reportada en cáscaras de mandarina verde [121] y se ha estudiado como sustancia retardante de envejecimiento inducido por rayos UV [123]. Por su parte la tetrametil-o-scullareteina ha sido estudiada por sus propiedades anti-inflamatorias [124]. En general, la cáscara de los cítricos es conocida por ser rica en flavanonas polimetoxiladas como tangeretina, nobiletina y sinensetina [65]. Las fórmulas químicas de los compuestos anteriormente mencionados se muestran en la Figura 3-10.

Tabla 3-4: Información de los picos cromatográficos tentativamente identificados.

Pico	Tiempo de retención [min]	λ_{max} (nm)	Identidad tentativa	Referencias
1	14.81	214, 284, 328	Naringina	-
2	15.27	285, 326	Hesperidina	[118,119,122]
3	17.16	224, 285, 324	Naringenina	[118]
4	20.2	241, 329	Sinensetina	[121]
5	21.19	250, 333	Nobiletina	[122,125,126]
6	21.47	268, 321	Tetrametil-o-scullareteina	[121,125,126]
7	21.47	276, 320	Heptametoxiflavona (HMF)	[121,125,126]
8	22.42	273, 323	Tangeretina	[122,125,126]

Las referencias indican la fuente de donde se compararon los datos obtenidos para realizar la identificación.

Tabla 3-5: Áreas de los picos de interés para los extractos de EFS.

Extracto	Área [mUA*min]						
	Naringina	Hesperidina	Naringenina	Sinensetina	Nobiletina	Tetrametil-o-scullareteina + HMF	Tangeretina
1	0.0520	0.1850	0.0340	3.6900	15.5090	7.5730	9.7400
2	0.0710	0.4570	0.0440	2.051	7.3880	21.6970	4.3140
3	0.4031	4.5628	0.3285	0.7100	2.3705	19.4046	1.3953
4	0.1164	0.9737	0.0751	2.8202	10.6129	22.8923	6.3884
5	0.2228	0.3475	0.0386	1.8803	7.6719	21.3236	4.6231
6	0.3660	3.9779	0.1676	0.5717	1.8423	0.9778	1.0785
7	0.1610	0.6244	0.0387	3.3820	15.0603	7.1024	9.6477
8	0.1424	1.0044	0.0980	1.1529	4.0657	2.1033	2.3646
9	0.0410	0.3883	0.0233	4.6278	18.109	9.1468	11.2373
10	0.1217	0.8774	0.0746	1.8577	6.4389	3.3531	3.8297
11	0.2736	0.1598	0.0296	2.9916	13.9093	6.5330	8.7762
12	0.0614	0.2819	0.0364	2.9051	10.9596	5.7327	6.6681
13	0.1243	0.8781	0.0568	0.9580	3.2281	1.7034	1.8950
14	0.0598	0.1792	0.0274	2.576	9.4138	4.8211	5.4727
15	0.2097	0.8690	0.0977	1.1555	4.1253	2.1430	2.3928
16	0.1216	1.2967	0.0465	3.3244	21.3128	8.4761	15.9984
17	0.1035	0.5117	0.0358	2.7506	10.8087	5.3493	6.4764
18	0.0997	0.2271	0.0356	2.2875	8.5034	4.3127	4.9820
19	0.4032	0.1697	0.0467	1.8475	10.0268	4.1494	6.7371

Los resultados anteriores permitieron identificar tentativamente flavonoides de dos tipos: cuatro flavanonas y cuatro polimetoxiflavonas, sin embargo, el método cromatográfico podría ser mejorado para elucidar compuestos como las polimetoxiflavonas que probablemente estén co-eluyendo y proponer a alguno de estos compuestos u otros diferentes como responsables de la actividad antioxidante de los extractos estudiados.

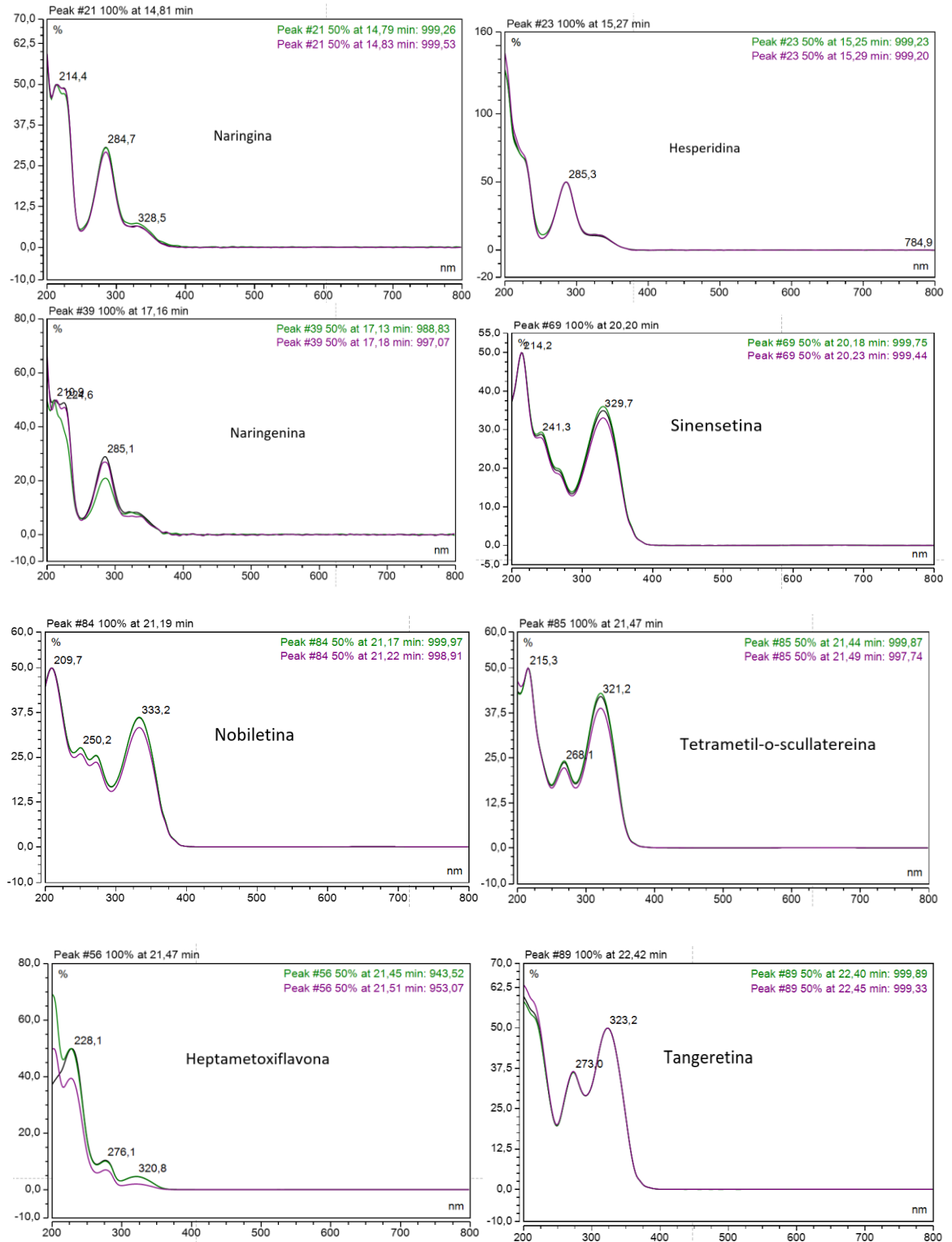
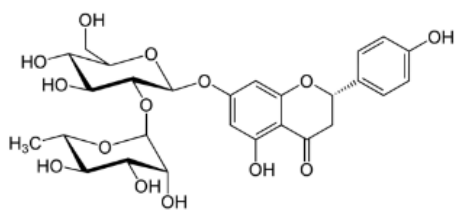
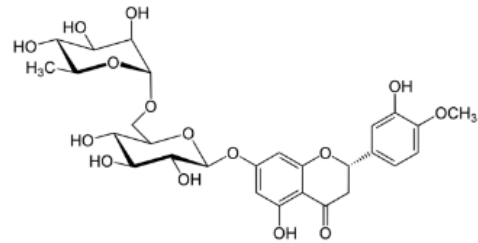


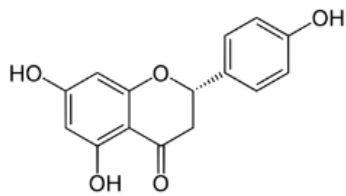
Figura 3-9: Espectros UV de los componentes de los extractos EFS.



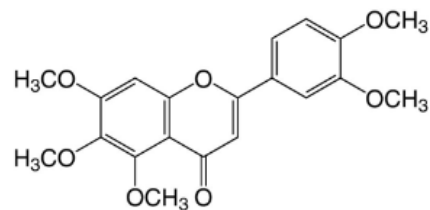
Naringina



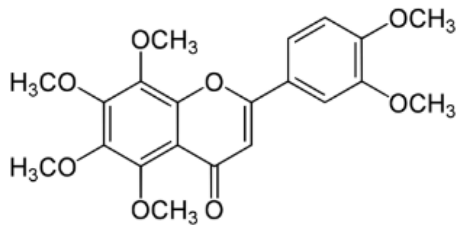
Hesperidina



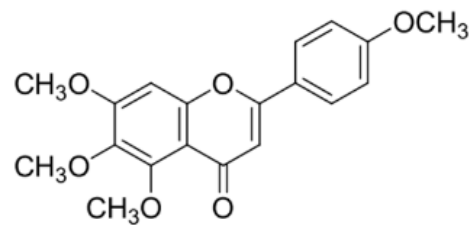
Naringenina



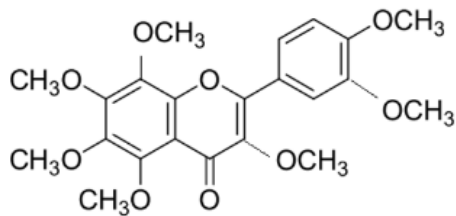
Sinensetina



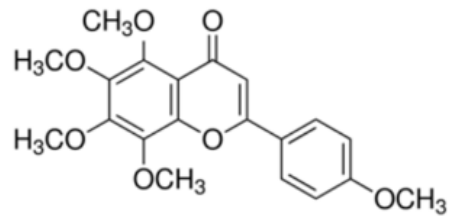
Nobiletina



Tetrametil-o-scutellareina



Heptametoxiflavona



Tangeretina

Figura 3-10. Estructura química de los flavonoides identificados tentativamente.

3.5.1 Espectrometría de masas para extracto 11

La hesperidina es un compuesto con una amplia gama de actividades biológicas como antiinflamatoria, antibacterial, anticarcinogénica y antioxidante [127]. Adicionalmente, ha sido reportado como el polifenol mayoritario en mandarina [55,79,122]. Mediante espectrometría de masas se cuantificó el contenido de este polifenol en el epicarpio de mandarina (Figura 3-11A, tiempo de retención de 5.50 min; Figura 3-12, espectro de masas), comparando con el patrón (Figura 3-11B). A partir de la curva de calibración (Figura 3-13) se pudo cuantificar el contenido de hesperidina en 0.66 mg hesperidina/g extracto. Al comparar este dato contra literatura se encontraron resultados diversos según la variedad de *C. reticulata*, para *C. reticulata* blanco y var. 'Erythrosa' 0.42 mg y 74 mg/g de extracto, respectivamente [128]. Para mandarina Satsuma y Clementina se reportó 0.42 y 0.47 mg/g de extracto, respectivamente [40]. Nuevamente se observa que los contenidos de estos metabolitos varían dependiendo de la variedad y del método de extracción. Hasta donde se tiene conocimiento, en mandarina 'Arrayana' no se había cuantificado dicho compuesto.

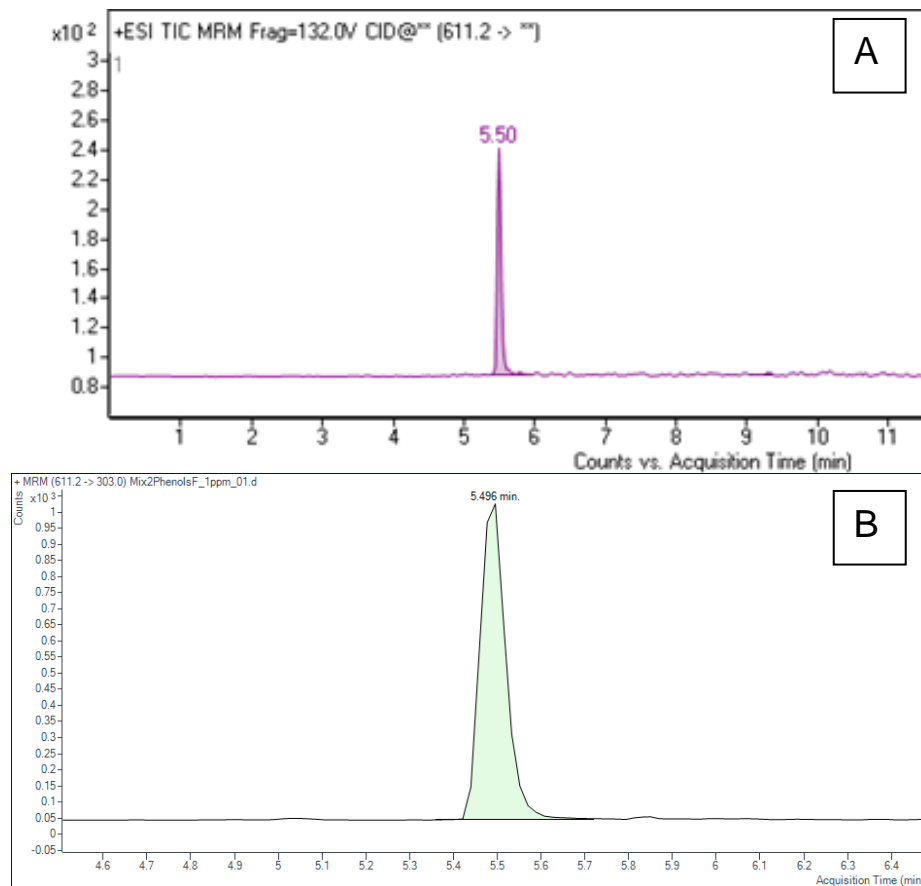


Figura 3-11: (A) Señal cromatográfica encontrada. (B) Señal cromatográfica del patrón hesperidina.

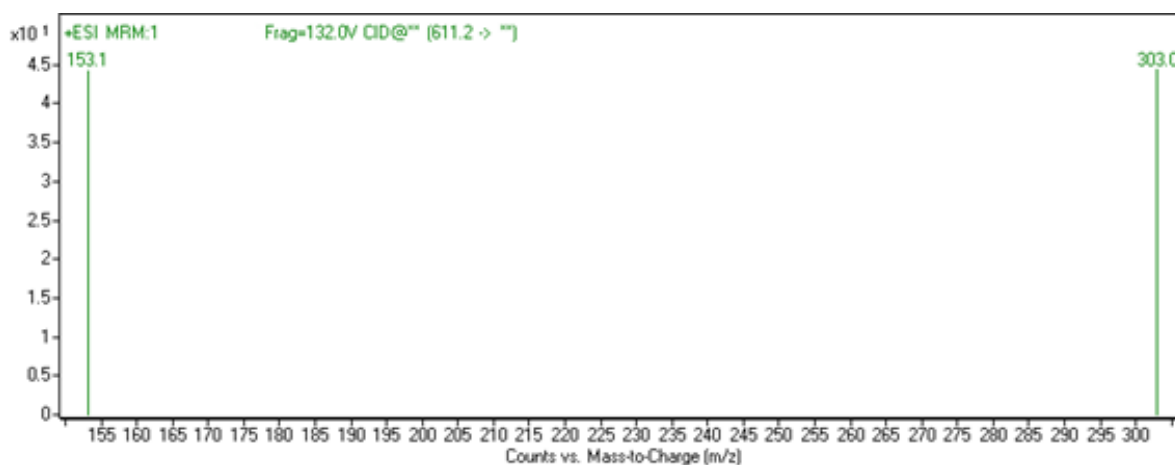


Figura 3-12: Espectro de masas de la señal obtenida.

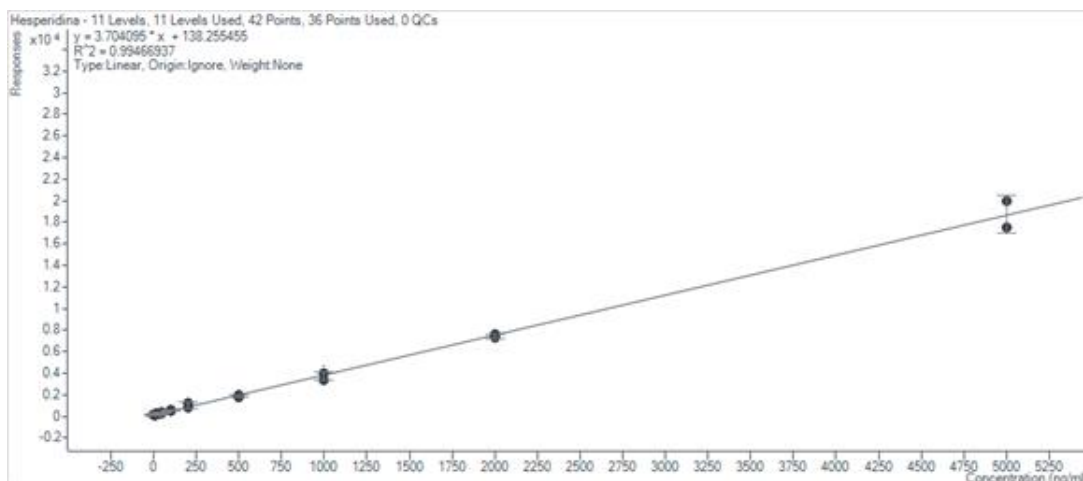


Figura 3-13: Curva de calibración de hesperidina.

3.5.2 Análisis de componentes principales para los extractos analizados

Para determinar si los compuestos identificados tentativamente presentes en los compuestos están relacionados de alguna manera con la actividad antioxidante *in-vitro*, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para las áreas de los ocho compuestos tentativamente identificados. Mediante el ACP se estableció que dos componentes explican el comportamiento de los datos (ver Tabla 3-6), con ellos se explica el 70.20% de la variación.

Tabla 3-6: Componentes con porcentaje acumulado de varianza

Componente		Porcentaje de	Porcentaje
Número	Eigenvalor	Varianza	Acumulado
1	5,02377	38,644	38,644
2	4,10179	31,552	70,197
3	1,55184	11,937	82,134
4	1,22194	9,400	91,533
5	0,559199	4,302	95,835
6	0,206694	1,590	97,425
7	0,12816	0,986	98,411
8	0,101308	0,779	99,190
9	0,0457717	0,352	99,542
10	0,0416265	0,320	99,862
11	0,015072	0,116	99,978
12	0,0027981	0,022	100,000
13	0,000035842	0,000	100,000

Los resultados de la bigráfica que incluye la representación de los individuos (los extractos) junto con la tendencia de las variables en los componentes principales se presentan en la Figura 3-14. A partir de ésta se puede afirmar que se encuentran fuertemente correlacionadas de forma positiva las variables de CTF y CTFO con porcentaje de inhibición por DPPH (% Inhibición), las cuales inciden sobre el carácter antioxidante de los extractos con mayor AA (en su orden los extractos 11, 5, 19 y 15), lo anterior corrobora lo obtenido por el test ANOVA descrito en la sección 3.3 (Anexo B).

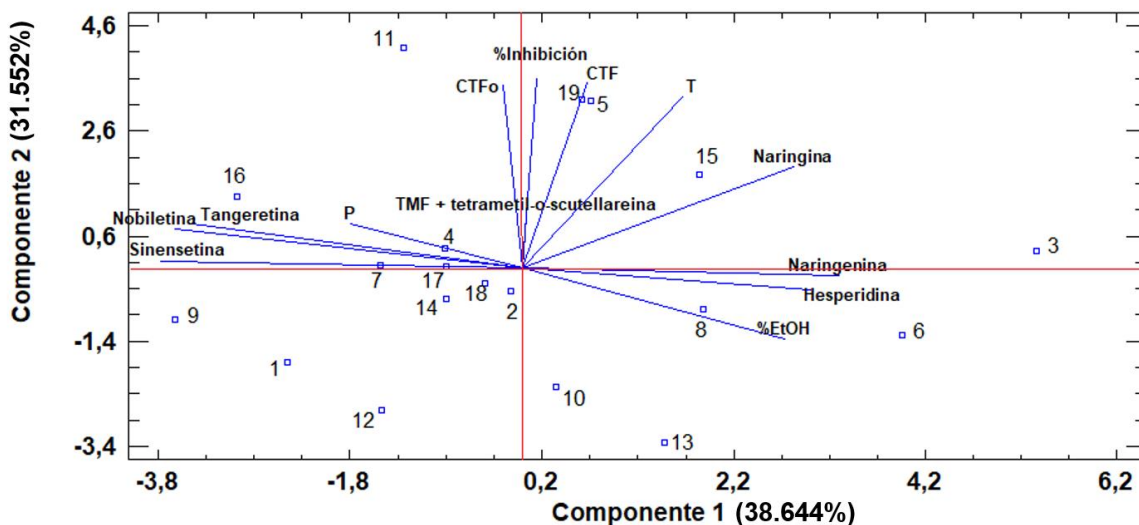


Figura 3-14: Gráfica del ACP. Los puntos representan los extractos supercríticos con su codificación.

Los pesos de las variables de cada uno de los componentes principales se muestran en la Tabla 3-7.

De acuerdo con los pesos en cada componente, existe una correlación positiva entre la inhibición y los contenidos totales de metabolitos, con el área de naringina, hesperidina, naringenina (compuestos del tipo flavanona) para el componente uno. Para el componente dos se observa una relación positiva al aumentar el valor de este componente con el valor de área de la mezcla de tetrametil-o-scutellareina + HMF, favoreciendo al porcentaje de inhibición y flavanonas, por lo que los mejores extractos deben estar alrededor de los vectores de CTF, CTFO y %Inhibición, que son los extractos 5, 11, 15 y 19, los cuales fueron obtenidos a alta temperatura, demostrando nuevamente que ésta tiene un efecto positivo sobre la actividad.

Tabla 3-7: Tabla de pesos en cada componente

<i>Variables</i>	<i>Componente</i>	<i>Componente</i>
	1	2
Naringina	0,313388	0,254663
Hesperidina	0,332941	-0,0572973
Naringenina	0,36569	-0,0209722
Sinensetina	-0,419749	0,0163102
Nobiletina	-0,403209	0,0977264
TMF + tetrametil-o-scutellareina	0,00348186	0,132365
Tangeretina	-0,382787	0,109961
T	0,184563	0,432211
%EtOH	0,303159	-0,182061
P	-0,198851	0,110483
%Inhibición	0,0160213	0,476504
CTF	0,074949	0,46852
CTFo	-0,0228178	0,46181

En general se observa que los compuestos tienen un efecto favorecedor sobre la actividad antioxidante, sin poder afirmar hasta qué punto éste es significativo. Se ha reportado que polifenoles glicosidados (como la naringina y la hesperidina) y metoxilados (las polimetoxiflavonas en general) pueden atenuar el efecto prooxidante de algunos flavonoides en su forma aglicona [129].

En la Figura 3-14 se observa una correlación entre el contenido de tangeretina, nobiletina y sinensetina con la presión, la cual tiene un efecto positivo sobre la extracción de estos compuestos dado que ésta favorece la extracción de compuestos de alto peso molecular [72]. Por otra parte, la temperatura tiene un efecto positivo sobre el contenido de naringina y la mezcla de tetrametil-o-scutellareina + HMF y el % de EtOH sobre las áreas de hesperidina y naringenina, probablemente debido a su carácter polar (la hesperidina, por ejemplo, es un compuesto glicosidado). Adicionalmente, en la Figura pueden observarse dos grupos claramente diferenciados: en un lado, están concentradas las áreas de tangeretina, nobiletina y sinensetina relacionadas entre sí, compuestos que pertenecen al grupo de las polimetoxiflavonas y en la región opuesta se encuentran los compuestos identificados como de tipo flavanona, dando indicios de que la identificación tentativa de compuestos podría estar acercada a la identidad real de las moléculas.

En conclusión, el ACP permitió establecer que existe una correlación positiva entre el área de los compuestos identificados con los contenidos de metabolitos y la actividad

antioxidante. Así mismo, se pudo confirmar el efecto positivo de la temperatura sobre la actividad antioxidante de los extractos. Finalmente, con dos componentes se explica el 70% de la variación de los datos.

3.6 Modelamiento de la cinética de extracción

Después de realizar la curva cinética por cinco horas a las condiciones del extracto 11 (CO₂ a 220 bar y 80 °C, con 5% de EtOH), se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3-8: Resultados de la curva cinética experimental (desviación estándar expresada para n=2).

Tiempo acumulado (min)	Peso acumulado de extracto (g)	Rendimiento acumulado (%)
5	0.0245 ± 0.0165	0.35%
10	0.0352 ± 0.0149	0.51%
15	0.0461 ± 0.0158	0.66%
20	0.0589 ± 0.0059	0.85%
25	0.0662 ± 0.0096	0.95%
30	0.0763 ± 0.0079	1.10%
40	0.0903 ± 0.0044	1.30%
50	0.1033 ± 0.0008	1.49%
60	0.1112 ± 0.0008	1.60%
80	0.1282 ± 0.0072	1.85%
100	0.1402 ± 0.0039	2.02%
120	0.1475 ± 0.0004	2.13%
150	0.1571 ± 0.0014	2.26%
180	0.1709 ± 0.0045	2.46%
210	0.1944 ± 0.0180	2.80%
240	0.2067 ± 0.0180	2.98%
270	0.2179 ± 0.0117	3.14%
300	0.2311 ± 0.0140	3.33%

El estudio cinético de la extracción (Figura 3-15) determinó el tiempo de velocidad de extracción constante- t_{CER} en 22.6 min; el tiempo de velocidad de extracción decayente- t_{FER} en 106.1 min y el parámetro relacionado con la convección del fluido, Z , de 3.6. Esto dio una sumatoria de error relativo de 3.6879. Adicionalmente se calculó el error cuadrático medio (RMSE, por sus siglas en inglés), el cual calcula el promedio del cuadrado del error absoluto. Para el ajuste del modelo realizado se obtuvo RMSE de

2.2177×10^{-5} mg extracto. Entre menor sea el RMSE se dice que el ajuste es mejor. Para el modelamiento de la extracción supercrítica de hojas de guayaba se obtuvieron RMSE entre 2.7×10^{-3} – 3.59×10^{-2} [130], siendo superior este número al obtenido en la presente investigación.

Al calcular el coeficiente de determinación (R^2) se obtuvo un valor de 0.8764 (ver código de Matlab en Anexo D), es decir, el modelo explica en un 87% la variabilidad de los datos. Al comparar contra la literatura dicho coeficiente normalmente alcanza valores de 0.95-0.99 [131,132], por lo que el valor obtenido fue aceptable.

En el periodo gobernado por la difusión, la pendiente de la curva experimental disminuye drásticamente, sin que se alcance un comportamiento totalmente asintótico acompañado de una mayor desviación estándar al final de la curva, sin embargo el coeficiente de variación (desviación*100/valor promedio) al final de la curva tiende a disminuir y volverse constante y aceptable (cercano a 10%).

Por otra parte, la alta desviación estándar de los datos al inicio de la curva puede deberse al tiempo inicial requerido para lograr controlar manualmente el flujo de CO_2 .

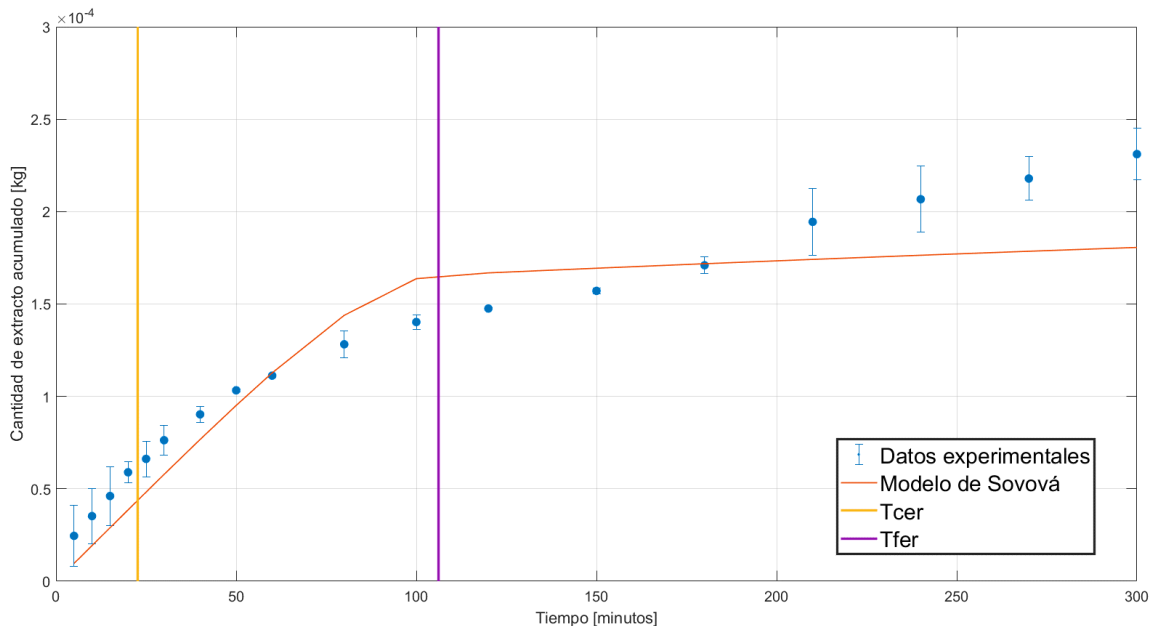


Figura 3-15: Ajuste de los datos experimentales obtenidos con el modelo de Sovová.

El modelo de Sovová inicialmente fue propuesto para el modelamiento de sistemas que utilizan CO₂ supercrítico como solvente, sin ningún tipo de modificadores, asumiendo que se conoce previamente la solubilidad del extracto en el solvente. Ha sido exitosamente aplicado por muchos autores y su principal planteamiento de la presencia de células rotas e intactas ha sido probada cierta por estudios con microscopía electrónica de barrido [26].

Sin embargo, la aproximación realizada para la determinación de la solubilidad como la pendiente de la etapa FER podría resultar alejada de la realidad por la complejidad del sistema (soluto multicomponente y solvente CO₂-etanol). Es probable que determinar la solubilidad utilizando modelos como los propuestos por Del Valle [133,134] sea útil como etapa previa, modelando la extracción de un compuesto de interés, por ejemplo, una flavanona específica. Adicionalmente, sería útil probar con otros modelos de transferencia de masa para comparar ajuste con los datos experimentales.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

A partir del presente estudio se caracterizaron los epicarpios de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *C. paradisi*) y mandarina Arrayana (*C. reticulata*) de variedades colombianas, al determinar en los extractos Soxhlet contenidos totales de compuestos fenólicos-CTF entre 115.10-874.92 y 160.23-1057.50 mg-eq AG/100 g de muestra seca-ms (en tangelo y mandarina, respectivamente); contenidos totales de flavanonas-CTFo de 1.13-12.26 en tangelo y 3.41-9.51 mg-eq N/100 g de ms en mandarina; y contenidos totales de carotenoides-CTC de 1.86-2.13 y 2.39-8.34 mg-eq β -caroteno/100 g de ms, para tangelo y mandarina, respectivamente. Adicionalmente, el extracto Soxhlet obtenido de mandarina Arrayana presentó una actividad antioxidante ligeramente mayor que el correspondiente de tangelo (22% vs 25%, en promedio).

Al someter el epicarpio de mandarina Arrayana a EFS se evidenció la efectividad de esta técnica de extracción en la obtención extractos con importantes CTF (26.88-112.42 mg-eq AG/g extracto) y CTFo (0.81-3.57 mg-eq N/g extracto), siendo éstos mayores que en los extractos Soxhlet (30.38-35.71 mg-eq AG/g extracto; 0.25-0.76 mg-eq N/g extracto). El rendimiento de los extractos Soxhlet fue superior a los extractos supercríticos (22% vs 10% en promedio); para los extractos obtenidos por EFS, al tener mayor concentración de metabolitos en menor rendimiento, se evidencia una mayor selectividad hacia los compuestos de interés en éstos, lo cual refleja un mayor porcentaje de inhibición a la oxidación del radical DPPH (25% para Soxhlet y 55% para EFS, en promedio).

La variable que más influenció la actividad antioxidante en la EFS fue la temperatura, a mayor temperatura ésta se favorece, debido al aumento en la difusividad del disolvente.

El extracto supercrítico 11 (220 bar, 80°C, 5% de EtOH) mostró un potencial antioxidante, para proteger de la oxidación a un producto emulsionado (mayonesa), similar al del antioxidante sintético BHA (0.79 µg MDA/g mayonesa para BHT vs 0.78 µg MDA/g mayonesa para extracto 11 adicionado a 250 ppm, al almacenar la muestra por seis días a 60°C), protegiendo la mayonesa un 30% más, respecto a la muestra sin antioxidantes.

A partir del análisis cromatográfico por UHPLC/DAD se pudo identificar tentativamente ocho flavonoides: naringina, hesperidina, naringenina, sinensetina, nobiletina, tetrametil-o-scullareteina, heptametoxiflavona y tangeretina. Mediante un análisis de componentes principales (ACP) se determinó, a partir de sus áreas, que estos compuestos en su mayoría tienen un posible efecto positivo sobre la actividad antioxidante. Con base en el ACP, dos componentes que explicaron en más del 70% el comportamiento de los datos. Adicionalmente se cuantificó el contenido de hesperidina en el extracto 11 en 0.66 mg/g extracto a través de HPLC/MS.

Finalmente, al realizar un ajuste del modelo cinético supercrítico de Sovová a datos experimentales del mejor extracto supercrítico (extracto 11) se obtuvo un ajuste aceptable, con un R^2 de 0.87, susceptible de ser mejorado. Esto fue útil para diagnosticar posibles problemas en el equipo utilizado, como necesidad de automatización del flujo de solvente.

Este trabajo constituye un primer acercamiento al estudio del potencial aprovechamiento del epicarpio de la mandarina Arrayana, uno de sus principales subproductos, como fuente de extractos con actividad antioxidante con potencial aplicación en la industria de alimentos, en particular en la obtención de extractos mediante EFS capaces de proteger una mayonesa de la oxidación. Cabe señalar que en el proceso planteado se emplean disolventes tipo GRAS (generally recognized as safe), como son el CO₂ y el EtOH.

4.2 Recomendaciones

Con el propósito de complementar y superar algunos inconvenientes presentados durante la investigación se plantean las siguientes recomendaciones:

- Determinar el ajuste cinético de la EFS del epicarpio de mandarina Arrayana utilizando otros modelos de transferencia de masa y realizar un estudio de solubilidad del extracto en sistemas con co-solvente.
- Explorar otros métodos de extracción verde, como extracción con fluidos presurizados o extracción asistida con microondas y/o ultrasonido, con el fin de acortar tiempos de extracción y obtener extractos con mayor actividad.
- Realizar mediciones de hidroperóxidos lipídicos y TBARS para todos los extractos, con el fin de observar diferencias en tendencia respecto a la actividad antioxidante hidrofílica (métodos como DPPH que emplean radicales sintéticos). Así mismo, para observar si existe correlación entre la inhibición de la oxidación lipídica con la presencia de alguno de los flavonoides preliminarmente identificados.
- Someter todos los extractos EFS a un análisis HPLC acoplado con espectrometría de masas para confirmar o descartar la identidad de los compuestos y lograr su cuantificación a través de patrones.

Bibliografía

- [1] C. Espinal, H. Martínez, Y. Peña, Citrus agroindustrial chain in Colombia, 2005.
http://www.asohofrucol.com.co/archivos/Cadenas/caracterizacion_citricos_2005.pdf.
- [2] J.O. Orduz-Rodríguez, S. Castiblanco, C.L. Calderón, H. Velásquez, Yield and quality potential of 13 commercial varieties and hybrids of citrus in the conditions of the Piedmont Plains, *Rev. Colomb. Ciencias Hortícolas*. 5 (2011) 171–185.
- [3] M. Monsalve, *Agría cosecha de mandarina*, *El Tiempo*. (2003).
<http://www.eltiempo.com/archivo/documento/MAM-1045965>.
- [4] Agricultural and Rural development Ministry, *Balance of the horticultural sector in 2017*, Bogotá D. C, 2018.
http://www.asohofrucol.com.co/imagenes/BALANCE_SECTOR_HORTIFRUTICOLA_DICIEMBRE_2017.pdf.
- [5] C. Economos, W.D. Clay, Nutritional and health benefits of citrus fruits, *Food, Nutr. Agric.* 24 (1999) 11–18. <http://www.fao.org/docrep/x2650T/x2650t03.htm>.
- [6] L.F. Mejía Flórez, F.S. Morales Aguilar, *Estructura de la cadena frutícola en Cundinamarca*, Bogotá, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, 2016.
- [7] Agriculture and Rural development Ministry, *Agricultural statistics. Volume 24*, Bogotá D. C., 2014.
- [8] Corporación Universitaria Lasallista, *Citrus: Growing, postharvest and industrialization*, 2012.
- [9] K. Sharma, N. Mahato, M.H. Cho, Y.R. Lee, Converting citrus wastes into value-added products : Economic and environmently friendly approaches, *Nutrition*. 34

- (2017) 29–46. doi:10.1016/j.nut.2016.09.006.
- [10] S. Saval, Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro, *BioTecnología*. 16 (2012) 14–46.
- [11] J. Siles López, Q. Li, I.P. Thompson, Biorefinery of waste orange peel., *Crit. Rev. Biotechnol.* 30 (2010) 63–9. doi:10.3109/07388550903425201.
- [12] P. Hurtado, A.L. Villa, Estudio de mercado de aceite esencial de naranja en Colombia en el período 2009-2014, *Rev. Colomb. Ciencias Hortícolas*. 10 (2016) 301–310.
- [13] J.M. Salgado, T.R. Baroni Ferreira, F. de Oliveira Biazoto, C.T. dos Santos Dias, Increased Antioxidant Content in Juice Enriched with Dried Extract of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel, *Plant Foods Hum. Nutr.* 67 (2012) 39–43. doi:10.1007/s11130-011-0264-y.
- [14] S. Daniells, Supply-demand imbalance escalating natural antioxidant market: F&S., *Food Navig. USA*. (2013).
- [15] O. Benavente-García, J. Castillo, Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids : New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 6185–6205.
- [16] M. Kamran, Z. E-Huma, O. Dangles, Journal of Food Composition and Analysis A comprehensive review on flavanones , the major citrus polyphenols, *J. Food Compos. Anal.* 33 (2014) 85–104.
- [17] S. Kumar, A.K. Pandey, Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *Sci. World J.* 2013 (2013) 1–16.
- [18] S. Asgary, M. Keshvari, M.R. Afshani, M. Amiri, I. Laher, S.H. Javanmard, Effect of Fresh Orange Juice Intake on Physiological Characteristics in Healthy Volunteers, *ISRN Nutr.* 2014 (2014) 1–7.
- [19] V. Mollace, I. Sacco, E. Janda, C. Malara, D. Ventrice, C. Colica, V. Visalli, S. Muscoli, S. Ragusa, C. Muscoli, D. Rotiroti, F. Romeo, Fitoterapia Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols : From animal models to human studies, *Fitoterapia*. 82 (2011) 309–316. doi:10.1016/j.fitote.2010.10.014.

- [20] C. Morand, C. Dubray, D. Milenkovic, D. Lioger, J. Franc, A. Scalbert, Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice : a randomized crossover study in healthy volunteers, *Am. J. Clin. Nutr.* 93 (2011) 73–80. doi:10.3945/ajcn.110.004945.INTRODUCTION.
- [21] J. Fernández-López, J.M. Fernández-Ginés, L. Aleson-Carbonell, E. Sendra, E. Sayas-Barberá, J.A. Pérez-Alvarez, Application of functional citrus by-products to meat products, *Trends Food Sci. Technol.* 15 (2004) 176–185. doi:10.1016/j.tifs.2003.08.007.
- [22] N. Mhiri, I. Ioannou, M. Ghoul, M. Boudhrioua, Extraction methods of citrus peel phenolic compounds: a review, *Food Rev. Int.* 30 (2014) 265–290. doi:10.1080/87559129.2014.924139.
- [23] M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, M.T. Tena, *Analytical Supercritical Fluid Extraction*, Primera ed, Springer Laboratory, Córdoba, 1994. doi:10.107/978-3-642-78673-0.
- [24] T. Suetsugu, H. Iwai, M. Tanaka, M. Hoshino, A. Quitain, M. Sasaki, M. Goto, Extraction of Citrus Flavonoids from Peel of Citrus Junos Using Supercritical Carbon Dioxide with Polar Solvent, *Chem. Eng. Sci.* 1 (2013) 87–90. doi:10.12691/ces-1-4-7.
- [25] Y. Kawamoto, Y. Suidou, T. Suetsugu, A. Takamizu, M. Tanaka, M. Hoshino, H. Kanda, M. Goto, Functional Ingredients Extraction from Citrus Genkou by Supercritical Carbon Dioxide, *Asian J. Appl. Sci.* 04 (2016) 833–838.
- [26] Z. Huang, X. Shi, W. Jiang, Theoretical models for supercritical fluid extraction, *J. Chromatogr. A.* 1250 (2012) 2–26. doi:10.1016/j.chroma.2012.04.032.
- [27] Ministerio de Agricultura de Costa Rica, Cítricos, *Minist. Agric. Costa Rica.* (n.d.).
- [28] S. Singh, M. V Rajam, Citrus biotechnology : Achievements , limitations and future directions, 15 (2009) 3–22.
- [29] USDA, *Citrus: World Markets and Trade*, 2017. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>.

- [30] Instituto Colombiano Agropecuario, Manejo fitosanitario del cultivo de cítricos, ICA. (2012). <http://www.ica.gov.co/getattachment/89f7ca91-2820-4d06-9826-74964de55de6/Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-Citricos.aspx> (accessed March 27, 2017).
- [31] G.P. Galindo Triana, Hábitos de consumo de frutas y hortalizas en personas de 15 a 39 años, habitantes de Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, 2015. <http://www.bdigital.unal.edu.co/50014/>.
- [32] J. Morton, Tangelo, Horticult. Purdue. (1987). <https://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/tangelo.html> (accessed March 17, 2017).
- [33] Missouri Botanical Garden, *Citrus reticulata* blanco, Tropicos. (2019). <http://www.tropicos.org/Name/28100572> (accessed May 11, 2019).
- [34] J.O. Orduz-Rodríguez, J. Monroy, S. Barrera, V. Núñez, G. Ligarreto, Caracterización morfo-agronómica y molecular de mandarina 'Arrayana' en el piedemonte del Meta (Colombia), *Corpoica Cienc. y Tecnol. Agropecu.* 13 (2016) 5. doi:10.21930/rcta.vol13_num1_art:234.
- [35] T.K. Lim, *Edible Medicinal and Non-medicinal plants*. Volume 4. Fruits, First Edit, Springer Science+Business Media, 2012.
- [36] J. Morales Granados, J. López González, *Manual técnico para el cultivo de mandarina (Citrus reticulata)*, Corpoica, 2004.
- [37] G.H. Xu, J.C. Chen, D.H. Liu, Y.H. Zhang, P. Jiang, X.Q. Ye, Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water, *J. Food Sci.* 73 (2008). doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00546.x.
- [38] H.R. De Moraes Barros, T.A.P. De Castro Ferreira, M.I. Genovese, Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil, *Food Chem.* 134 (2012) 1892–1898. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.090.
- [39] Y.C. Wang, Y.C. Chuang, H.W. Hsu, The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan, *Food Chem.* 106 (2008) 277–284.

- doi:10.1016/j.foodchem.2007.05.086.
- [40] B. Levaj, V. Dragovic-uzelac, D. Bursac kobacevic, N. Krasnici, Determination of Flavonoids in Pulp and Peel of Mandarin Fruits, *Agric. Conspec. Sci. Cus.* 74 (2009) 221–225. http://www.agr.unizg.hr/smotra/pdf_74/acs74_38.pdf.
- [41] A. Cano, A. Medina, A. Bermejo, Bioactive compounds in different citrus varieties. Discrimination among cultivars, *J. Food Compos. Anal.* 21 (2008) 377–381. doi:10.1016/j.jfca.2008.03.005.
- [42] W.W. Widmer, Dietary fiber content in fresh citrus, in: *Florida State Hortic. Soc. Proc.*, Florida, 2002: pp. 301–303.
- [43] F.R. Marín, C. Soler-Rivas, O. Benavente-García, J. Castillo, J.A. Pérez-Alvarez, Food Chemistry By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres, *Food Chem. Toxicol.* 100 (2007) 736–741. doi:10.1016/j.foodchem.2005.04.040.
- [44] D. Roldan, M. Salazar, *La cadena de cítricos en Colombia*, Bogotá D. C., 2002. <http://repiica.iica.int/docs/B0148e/B0148e.pdf>.
- [45] F. Lanuzza, F. Mondelo, M.M. Tripodo, Studies about the utilization of citrus wastes in view of environmental protection, in: R. Salomone, G. Saija (Eds.), *Pathways to Environ. Sustain.*, First Edit, Springer International Publishing Switzerland, Messina, 2014: p. 285.
- [46] S. Rafiq, R. Kaul, S.A. Sofi, N. Bashir, F. Nazir, G. Ahmad, Citrus peel as a source of functional ingredient: A review, *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* In press. (2016). doi:10.1016/j.jssas.2016.07.006.
- [47] Medline Plus, Soluble vs insoluble fiber, *Medlin. Plus.* (2016). <https://medlineplus.gov/ency/article/002136.htm> (accessed April 5, 2017).
- [48] L.P.T. Quoc, V.T.N. Huyen, L.T.N. Hue, N.T.H. Hue, N.H.D. Thuan, N.T.T. Tam, N.N. Thuan, T.H. Duy, Extraction of pectin from pomelo (*Citrus maxima*) peels with the assistance of microwave and tartaric acid, *Int. Food Res. J.* 22 (2015) 1637–1641.

- [49] M. Kaya, A.G. Sousa, M. Crépeau, S.O. Sørensen, M.-C. Ralet, Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions : influence of acid type and pH of extraction, *Ann. Bot.* 114 (2014) 1319–1326. doi:10.1093/aob/mcu150.
- [50] V.O. Aina, M.M. Barau, O.A. Mamman, A. Zakari, H. Haruna, M.S. Umar, Y. Abba, Extraction and Characterization of Pectin from Peels of Lemon (*Citrus limon*), Grape Fruit (*Citrus paradisi*) and Sweet Orange (*Citrus sinensis*), *Br. J. Pharmacol. Toxicol.* 3 (2012) 259–262.
- [51] E. Gaden, D.N. Petsiavas, J. Winoker, Microbiological Production of Riboflavin and Citric Acid from Citrus Molasses, *Agric. Food Chem.* 2 (1954) 632–638.
- [52] J.J. Kagan, W. Pilnik, M.D. Smith, Lactic Acid Production by Fermentation of Citrus Peel Juice, *Agric. Food Chem.* 8 (1960) 236–238.
- [53] M. Pourbafrani, G. Forgács, I. Sárvári, C. Niklasson, M.J. Taherzadeh, Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 4246–4250. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.077.
- [54] D. Mamma, P. Christakopoulos, Citrus Peels: An Excellent Raw Material for the Bioconversion into Value-added Products, *Tree For. Sci. Biotechnol.* 2 (2008) 83–97.
- [55] J.J. Peterson, J.T. Dwyer, G.R. Beecher, S.A. Bhagwat, S.E. Gebhardt, D.B. Haytowitz, J.M. Holden, Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature, *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 66–73. doi:10.1016/j.jfca.2005.12.006.
- [56] A.A. Damián-reyna, J.C. González-hernández, M. del C. Chávez-Parga, Current procedures for extraction and purification of citrus flavonoids, *Rev. Colomb. Biotechnol.* 18 (2016) 135–147. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57724.
- [57] Y. Nogata, K. Sakamoto, H. Shiratsuchi, T. Ishii, M. Yano, H. Ohta, Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (2006) 178–192.
- [58] J. Londoño-londoño, V. Rodrigues, O. Lara, A. Gil, T. Pasa, G. Arango, J.R. Ramirez, Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an

- aqueous ultrasound-assisted extraction method, *Food Chem.* 119 (2010) 81–87. doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.075.
- [59] A. Nazareno, H.T. Mishima, A.N. Giannuzzo, Supercritical Fluid Extraction of Naringin from the Peel of *Citrus paradisi*, 223 (2003) 221–223.
- [60] L.H. Yao, Y.M. Jiang, J. Shi, F.A. Tomás-Barberán, N. Datta, R. Singanusong, S.S. Chen, Flavonoids in Food and Their Health Benefits, *Plant Foods Hum. Nutr.* 59 (2004) 113–122.
- [61] P.C.H. Hollman, M.B. Katan, Dietary Flavonoids : Intake, Health Effects and Bioavailability, *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 937–942.
- [62] J.B. Harborne, *Methods in Plant Biochemistry. Volume 1. Plant Phenolics*, Academic Press, London, 1989.
- [63] L. Bravo, Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutr. Rev.* 56 (1998) 317–333.
- [64] M. Quiñones, M. Miguel, A. Aleixandre, Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular, *Nutr. Hosp.* 27 (2012) 76–89. doi:10.3305/nh.2012.27.1.5418.
- [65] A.N. Panche, A.D. Diwan, S.R. Chandra, Flavonoids: an overview, *J. Nutr. Sci.* 5 (2016). doi:10.1017/jns.2016.41.
- [66] S. Li, M.H. Pan, C.Y. Lo, D. Tan, Y. Wang, F. Shahidi, C.T. Ho, Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones, *J. Funct. Foods.* 1 (2009) 2–12. doi:10.1016/j.jff.2008.09.003.
- [67] Y. Asami, R. Horie, H. Hamamoto, K. Sekimizu, Use of silkworms for identification of drug candidates having appropriate pharmacokinetics from plant sources, *BMC Pharmacol.* 10 (2010) 1–7. doi:10.1186/1471-2210-10-7.
- [68] Royal Chemical Society, Soxhlet extraction, (n.d.). <http://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=CMO:0001609&MSID=B823001C> (accessed September 6, 2017).
- [69] A. Caldas, Optimización escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción

- sólido líquido, Universidad de Cuenca, 2012.
- [70] Universidad Pablo de Olavide, Determinación del contenido graso de leche en polvo: extracción soxhlet, (2005).
https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/TAQ/curso0405/TAQP5_0405.pdf (accessed September 6, 2017).
- [71] E.M. Yener, Supercritical Fluid Processing for the Recovery of Bioactive Compounds from Food Industry By-Products, in: T. Fornari, R.P. Stateva (Eds.), High Press. Fluid Technol. Green Food Process., Primera ed, Springer International Publishing, Suiza, 2015: p. 517. doi:10.1007/978-3-319-10611-3.
- [72] B. Díaz-Reinoso, A. Moure, H. Domínguez, J.C. Parajó, Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 2441–2469. doi:10.1021/jf052858j.
- [73] J.W. King, Modern Supercritical Fluid Technology for Food Applications, Annu. Rev. Food Sci. Technol. 5 (2013) 215–238. doi:10.1146/annurev-food-030713-092447.
- [74] Valensa, Valensa, About Co. (2019). <http://valensa.com/about/>.
- [75] Natex, Natex, About Co. (2019). <https://www.natex.at/about-us/>.
- [76] D. Huang, B. Ou, R. Prior, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 1841–1856.
- [77] C.-C. Chang, M.-H. Yang, H.-M. Wen, Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, J. Food Drug Anal. 10 (2002) 178–182. doi:N/A.
- [78] L. Nováková, P. Svoboda, J. Pavlík, Ultra-high performance liquid chromatography, 2017. doi:10.1016/B978-0-12-805393-5.00029-4.
- [79] E.M. Yahia, Fruit and vegetable phytochemicals, 2018.
- [80] Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, Farmacopea argentina, Séptima ed, Ministerio de Salud de Argentina, Buenos Aires, 2003. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología

Médica.

- [81] P. Putnik, D. Bursać Kovačević, A. Režek Jambrak, F.J. Barba, G. Cravotto, A. Binello, J.M. Lorenzo, A. Shpigelman, Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citruswastes - A review, *Molecules*. 22 (2017). doi:10.3390/molecules22050680.
- [82] E. De Ritter, A.E. Purcell, *Carotenoid Analytical Methods*, 2013. doi:10.1016/b978-0-12-082850-0.50017-2.
- [83] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Sci. Technol.* 28 (1995) 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- [84] F. Shahidi, Y. Zhong, Revisiting the polar paradox theory: A critical overview, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 3499–3504. doi:10.1021/jf104750m.
- [85] H. Sovová, Broken-and-intact cell model for supercritical fluid extraction: Its origin and limits, *J. Supercrit. Fluids*. 129 (2017) 3–8. doi:10.1016/j.supflu.2017.02.014.
- [86] E. Reverchon, C. Marrone, Modeling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils, *J. Supercrit. Fluids*. 19 (2001) 161–175. doi:10.1016/S0896-8446(00)00093-0.
- [87] J. Martínez, J.M. Martínez, Fitting the Sovová’s supercritical fluid extraction model by means of a global optimization tool, *Comput. Chem. Eng.* 32 (2008) 1735–1745. doi:10.1016/j.compchemeng.2007.08.016.
- [88] B. Nagy, B. Simándi, Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika, *J. Supercrit. Fluids*. 46 (2008) 293–298. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2008.04.009.
- [89] J.M. Del Valle, E.L. Uquiche, Particle size effects on supercritical CO₂ extraction of oil-containing seeds, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79 (2002) 1261–1266. doi:10.1007/s11746-002-0637-9.
- [90] U. Vrhovsek, F. Mattivi, A.L. Waterhouse, Analysis of red wine phenolics: comparison of HPLC and spectrophotometric methods, *Vitis*. 40 (2001) 87–91.

- [91] H.S. Lee, W.S. Castle, Seasonal changes of carotenoid pigments and color in Hamlin, Earlygold, and Budd Blood orange juices, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 877–882. doi:10.1021/jf000654r.
- [92] S. Prahl, Beta-carotene, Photochem ID. (2017).
<https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/041.html>.
- [93] V. Raikos, M. Neacsu, P. Morrice, G. Duthie, Anti- and pro-oxidative effect of fresh and freeze-dried vegetables during storage of mayonnaise, *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015) 7914–7923. doi:10.1007/s13197-015-1897-x.
- [94] Food and Agricultural Organization, SECTION 1. Codex General Standard for Fats and Oils, (1999). <http://www.fao.org/docrep/004/y2774e/y2774e03.htm> (accessed January 19, 2017).
- [95] S.S. Turgut, F. Işıkçı, A. Soyer, Antioxidant activity of pomegranate peel extract on lipid and protein oxidation in beef meatballs during frozen storage, *Meat Sci.* 129 (2017) 111–119. doi:10.1016/j.meatsci.2017.02.019.
- [96] J. Gutiérrez-Salinas, L. Cruz-Tovat, L. Cruz-Tova, Determinación de enzimas antioxidantes y malonaldehído en el suero de niños con IgM positiva para citomegalovirus, *Acta Pediátrica México.* 30 (2009) 77–83.
<http://www.redalyc.org/pdf/4236/423640316002.pdf>.
- [97] C.E. Narváez-Cuenca, J.P. Vincken, C. Zheng, H. Gruppen, Diversity of (dihydro) hydroxycinnamic acid conjugates in Colombian potato tubers, *Food Chem.* 139 (2013) 1087–1097. doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.018.
- [98] S.K.T. Seraglio, A.C. Valese, H. Daguer, G. Bergamo, M.S. Azevedo, L.V. Gonzaga, R. Fett, A.C.O. Costa, Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach, *Food Res. Int.* 87 (2016) 60–67.
doi:10.1016/j.foodres.2016.06.019.
- [99] B.B. Li, B. Smith, M.M. Hossain, Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method, *Sep. Purif. Technol.* 48 (2006) 182–188.
doi:10.1016/j.seppur.2005.07.005.

- [100] M. Tenorio Domínguez, Flavonoids extracted from orange peelings tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) and their application as a natural antioxidant in sachinchi (*Plukenetia volubilis*) vegetable oil, *Sci. Agropecu.* 7 (2016) 419–431. doi:10.17268/sci.agropecu.2016.04.07.
- [101] D. Ramful, E. Tarnus, P. Rondeau, C. Da Silva, T. Bahorun, E. Bourdon, Citrus Fruit Extracts Reduce Advanced Glycation End Products (AGEs) - and H₂O₂ - Induced Oxidative Stress in Human Adipocytes, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 11119–11129. doi:10.1021/jf102762s.
- [102] Y. NOGATA, K. SAKAMOTO, H. SHIRATSUCHI, T. ISHII, M. YANO, H. OHTA, Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (2006) 178–192. doi:10.1271/bbb.70.178.
- [103] L. Castro-vazquez, M.E. Alañón, V. Rodríguez-robledo, M.S. Pérez-coello, I. Hermosín-gutierrez, M.C. Díaz-maroto, J. Jordán, M.F. Galindo, M.M. Arroyo-jiménez, Bioactive flavonoids, antioxidant behaviour and Cytoprotective Effects of Dried Grapefruit Peels (*Citrus paradisi* Macf.), *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2016) 1–12. doi:10.1155/2016/8915729.
- [104] C.W. Daniels, F. Rautenbach, W.T. Mabusela, A.J. Valentine, J.L. Marnewick, Comparative antioxidant-capacity and -content of leaves, bulbs, roots, flowers and fruit of *Gethyllis multifolia* L. Bolus and *G. villosa* Thunb. species, *South African J. Bot.* 77 (2011) 711–717. doi:10.1016/j.sajb.2011.03.005.
- [105] P.R. Itankar, V.A. Sontakke, M. Tauqeer, S.S. Charde, Antioxidant potential and its relationship with polyphenol content and degree of polymerization in *Opuntia elatior* Mill. fruits, *AYU J.* 35 (2014) 423–427. doi:10.4103/0974-8520.159010.
- [106] P.R. Itankar, S.J. Lokhande, P.R. Verma, S.K. Arora, R.A. Sahu, A.T. Patil, Antidiabetic potential of unripe *Carissa carandas* Linn. fruit extract, *J. Ethnopharmacol.* 135 (2011) 430–433. doi:10.1016/j.jep.2011.03.036.
- [107] D.L. Chothani, S.H. Mishra, In vitro anti-oxidant activity of *Ruellia tuberosa* root extracts, *Free Radicals Antioxidants.* 2 (2013) 38–44. doi:10.5530/ax.2012.4.7.
- [108] L. Wang, B. Yang, X. Du, C. Yi, Optimisation of supercritical fluid extraction of

- flavonoids from *Pueraria lobata*, *Food Chem.* 108 (2008) 737–741.
doi:10.1016/j.foodchem.2007.11.031.
- [109] J. ZHANG, Relationship between the density of supercritical CO₂+ ethanol binary system and its critical properties, *Sci. China Ser. B.* 46 (2003) 290.
doi:10.1360/02yb0189.
- [110] I.H. Adil, H.I. Çetin, M.E. Yener, A. Bayindirli, Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts, *J. Supercrit. Fluids.* 43 (2007) 55–63.
doi:10.1016/j.supflu.2007.04.012.
- [111] R.A. Heidemann, A.M. Khalil, The calculation of critical points, *AIChE J.* 26 (1980) 769–779. doi:10.1002/aic.690260510.
- [112] Y.H. Lee, A.L. Charles, H.F. Kung, C.T. Ho, T.C. Huang, Extraction of nobiletin and tangeretin from *Citrus depressa* Hayata by supercritical carbon dioxide with ethanol as modifier, *Ind. Crops Prod.* 31 (2010) 59–64. doi:10.1016/j.indcrop.2009.09.003.
- [113] A.M. Fariás-Campomanes, M.A. Rostagno, J.J. Coaquira-Quispe, M.A.A. Meireles, Supercritical fluid extraction of polyphenols from lees: overall extraction curve, kinetic data and composition of the extracts, *Bioresour. Bioprocess.* 2 (2015) 45.
doi:10.1186/s40643-015-0073-5.
- [114] L. Chotphruethipong, S. Benjakul, Use of cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaf extract for prevention of lipid oxidation in mayonnaise enriched with fish oil, *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* 19 (2018) 825–836.
- [115] Zia-ur-Rehman, Citrus peel extract - A natural source of antioxidant, *Food Chem.* 99 (2006) 450–454. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.054.
- [116] Y. Zhao, C.P. Kao, C.R. Liao, K.C. Wu, X. Zhou, Y.L. Ho, Y.S. Chang, Chemical compositions, chromatographic fingerprints and antioxidant activities of *Citri exocarpium rubrum* (Juhong), *Chinese Med. (United Kingdom)*. 12 (2017) 1–15.
doi:10.1186/s13020-017-0127-z.
- [117] N. Datta, R. Singanusong, S.S. Chen, L.H. Yao, Y.M. Jiang, J. Shi, F.A.T.O.M. Asbarber, Flavonoids in food and their health benefits, *Plants Foods Hum. Nutr.* 59

- (2006) 113–122.
- [118] Shimadzu Corporation, High Speed, High resolution analysis (part 13): Analysis of flavanones in citrus juice, Appl. News. (n.d.) 2.
https://shimadzu.com.au/sites/default/files/Appl_HPLC_L363_Flavanoids_Orange_Juice_en.pdf.
- [119] D. Srilatha, M. Nasare, B. Nagasandhya, V. Prasad, P. Diwan, Development and Validation of UV Spectrophotometric Method for Simultaneous Estimation of Hesperidin and Diosmin in the Pharmaceutical Dosage Form, ISRN Spectrosc. 2013 (2013) 1–4. doi:10.1155/2013/534830.
- [120] M.I. Sancho, M.C. Almandoz, S.E. Blanco, E.A. Castro, Spectroscopic study of solvent effects on the electronic absorption spectra of flavone and 7-hydroxyflavone in neat and binary solvent mixtures, Int. J. Mol. Sci. 12 (2011) 8895–8912. doi:10.3390/ijms12128895.
- [121] D. Wang, J. Wang, X. Huang, Y. Tu, K. Ni, Identification of polymethoxylated flavones from green tangerine peel (*Pericarpium Citri Reticulatae Viride*) by chromatographic and spectroscopic techniques, J. Pharm. Biomed. Anal. 44 (2007) 63–69. doi:10.1016/j.jpba.2007.01.048.
- [122] Y. Sun, J. Wang, S. Gu, Z. Liu, Y. Zhang, X. Zhang, Simultaneous determination of flavonoids in different parts of citrus reticulata “Chachi” fruit by high performance liquid chromatography - Photodiode array detection, Molecules. 15 (2010) 5378–5388. doi:10.3390/molecules15085378.
- [123] H. Il Kim, Y.U. Jeong, J.H. Kim, Y.J. Park, 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, inhibits collagenase activity and induces type I procollagen synthesis in HDFn cells, Int. J. Mol. Sci. 19 (2018). doi:10.3390/ijms19020620.
- [124] J.M. Hyun, Y.J. Jo, J.E. Kim, H.J. An, Y.H. Choi, C.G. Hyun, N.H. Lee, Tetramethyl-O-scutellarin isolated from peels of immature shiranuhi fruit exhibits anti-inflammatory effects on LPS-induced RAW264.7 cells, Trop. J. Pharm. Res. 16 (2017) 2197–2205. doi:10.4314/tjpr.v16i9.22.
- [125] J.M. Sendra, J.L. Navarro, L. Izquierdo, C18 solid-phase isolation and high-

- performance liquid chromatography/ultraviolet diode array determination of fully methoxylated flavones in citrus juices, *J. Chromatogr. Sci.* 26 (1988) 443–448. doi:10.1093/chromsci/26.9.443.
- [126] P.G. Pietta, P.L. Mauri, C. Gardana, A. Bruno, High-performance liquid chromatography with diode-array ultraviolet detection of methoxylated flavones in *Orthosiphon* leaves, *J. Chromatogr. A.* 547 (1991) 439–442. doi:10.1016/S0021-9673(01)88668-4.
- [127] A. Garg, S. Garg, L.J.D. Zaneveld, A.K. Singla, Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin, *Phyther. Res.* 15 (2001) 655–669. doi:10.1002/ptr.1074.
- [128] M.Q. Man, B. Yang, P.M. Elias, Benefits of Hesperidin for Cutaneous Functions, Evidence-Based Complement. *Altern. Med.* 2019 (2019). doi:10.1155/2019/2676307.
- [129] D. Procházková, I. Boušová, N. Wilhelmová, Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia.* 82 (2011) 513–523. doi:10.1016/j.fitote.2011.01.018.
- [130] C.G.F. da Silva, A.M. Lucas, A.T.E. Santo, R.N. Almeida, E. Cassel, R.M.F. Vargas, Sequential processing of *Psidium guajava* L. leaves: steam distillation and supercritical fluid extraction, *Brazilian J. Chem. Eng.* 36 (2019) 1–10.
- [131] N. Hadi Tan, Performance of Microwave Assisted Aqueous Enzymatic, *Universiti Teknologi Malaysia*, 2017.
- [132] A. Luiz, B. Dias, C. Scarelli, A. Sergio, P. Santos, G. Fernández, C. Alves, J. Martínez, Ultrasonics Sonochemistry Effect of ultrasound on the supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*), *Ultrason. Sonochem.* 31 (2016) 284–294. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.01.013.
- [133] J.M. del Valle, Extraction of natural compounds using supercritical CO₂: Going from the laboratory to the industrial application, *J. Supercrit. Fluids.* (2014). doi:10.1016/j.supflu.2014.10.001.
- [134] F. Edi-Soetaredjo, S. Ismadji, Y.H. Ju, Measurement and modeling of epicatechin

solubility in supercritical carbon dioxide fluid, *Fluid Phase Equilib.* 340 (2013) 7–10.
doi:10.1016/j.fluid.2012.12.005.

A. Anexo: Curvas de calibración

- Curva de calibración para CTF

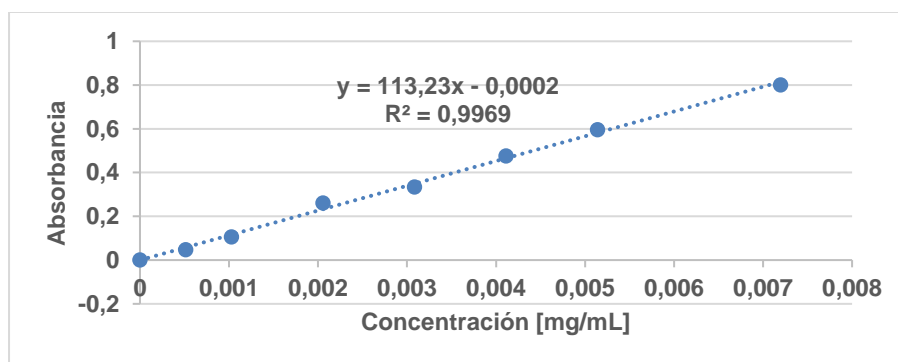


Figura A.1: Curva de calibración de Ácido Gálico. Dentro de la gráfica se muestra la linealización y el coeficiente de determinación de la regresión.

- Curva de calibración para CTFO

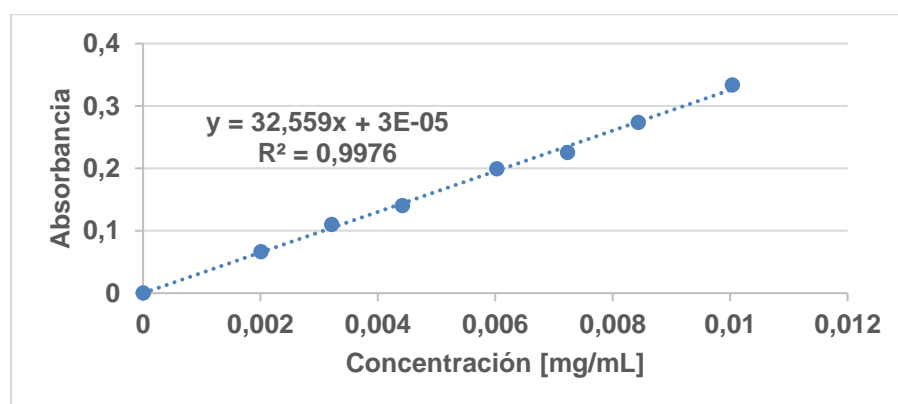


Figura A.2: Curva de calibración de Ácido Gálico. Dentro de la gráfica se muestra la linealización y el coeficiente de determinación de la regresión.

B. Anexo: Análisis estadístico

Test ANOVA

Las gráficas de correlación lineal para las variables de respuesta en la EFS se muestran a continuación, con su respectivo coeficiente de correlación y de ajuste (R^2).

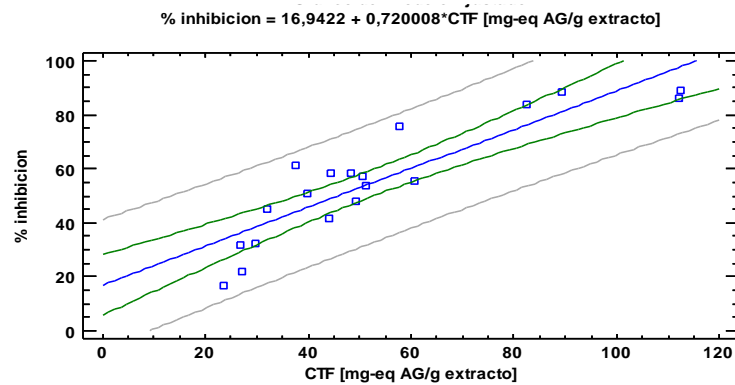


Figura B-1: Gráfico de correlación lineal para el % de inhibición y el CTF

Coeficiente de Correlación = 0.890407

R-cuadrada = 79.2824 %

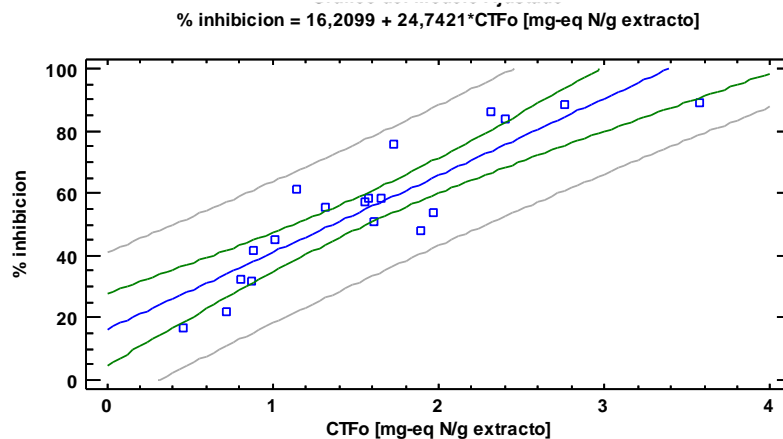


Figura B-2: Gráfico de correlación lineal para el % de inhibición y el CTF

Coeficiente de Correlación = 0.887004

R-cuadrada = 78.6776 %

Análisis de superficie de respuesta

Tabla B-1: Análisis de varianza para análisis de superficie de respuesta optimizando actividad antioxidante

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Valor-P</i>
A:P	0,0554664	1	0,0554664	0,0029
B:T	0,661749	1	0,661749	0,0000
C:% EtOH	0,0632754	1	0,0632754	0,0019
AA	0,00715895	1	0,00715895	0,1802
AB	0,00010658	1	0,00010658	0,8632
AC	0,00991232	1	0,00991232	0,1215
BB	0,0000737315	1	0,0000737315	0,8860
BC	0,00095048	1	0,00095048	0,6093
CC	0,0216245	1	0,0216245	0,0325
Error total	0,0305179	9	0,00339087	
Total (corr.)	0,855416	18		

R-cuadrada = 96,4324 por ciento

Error estándar del est. = 0,0582312

Error absoluto medio = 0,0355133

C. Anexo: Cromatografía

Datos del patrón de naringina

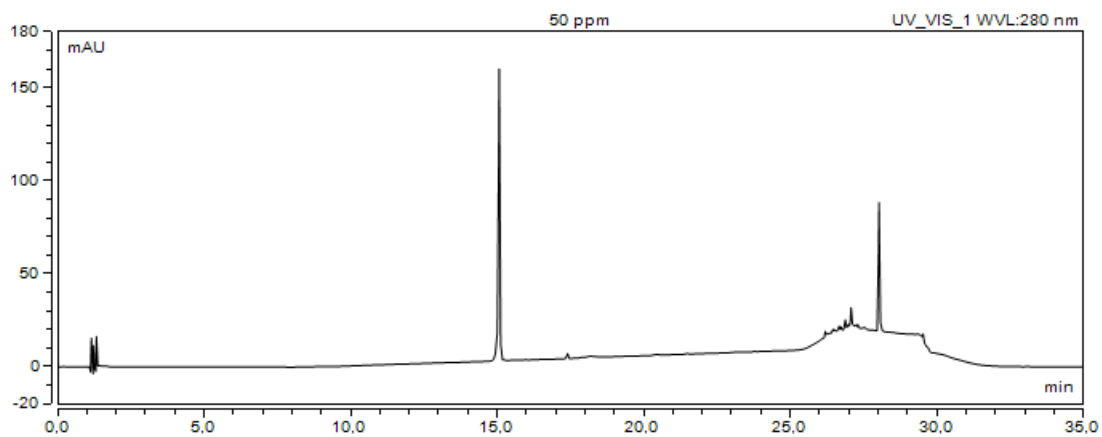


Figura C-1: Pico cromatográfico de naringina. Señal captada a 280 nm. Tiempo de retención 15 min.

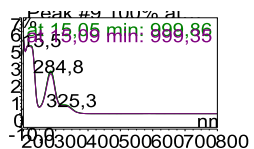
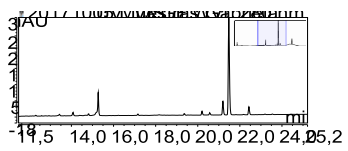
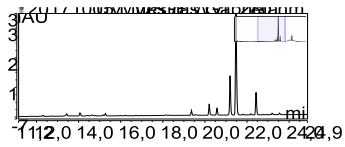
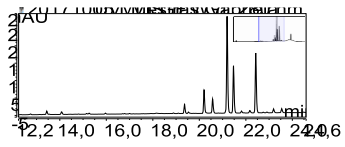
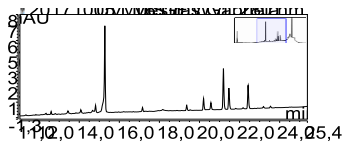
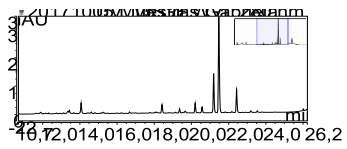
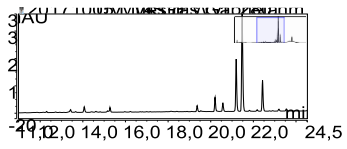
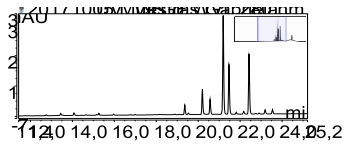
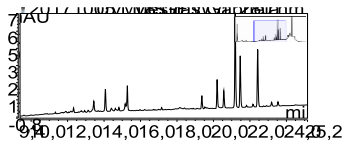
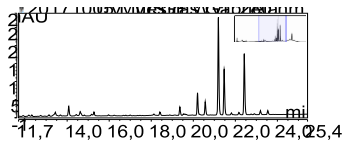
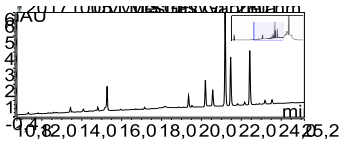
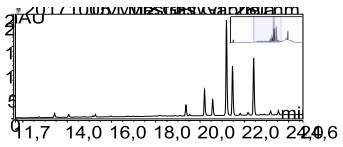
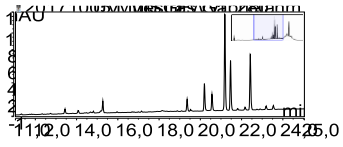


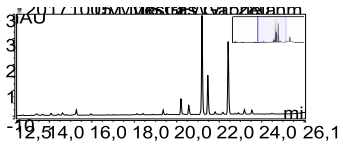
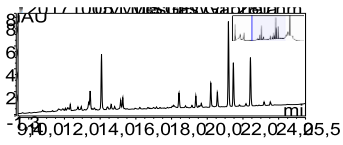
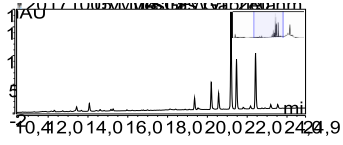
Figura C-2: Espectro UV de la naringina. Máximos de absorbancia a 215, 284 y 325 nm.

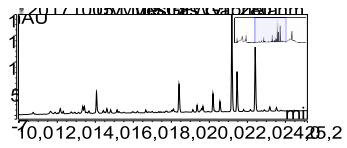
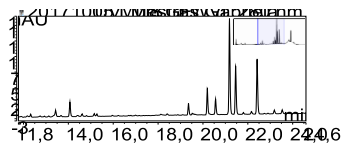
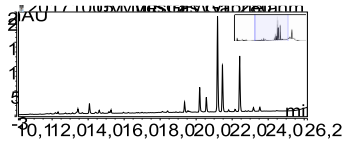
Picos cromatográficos de los extractos analizados











D. Anexo: Códigos de Matlab utilizados

Cálculo del punto crítico de una mezcla. Método de Heidemann y Khalil.

```
function [T,P,v] = critpt_eos(z, Tci, Pci, w, kij, lij, varargin)
% CRITPT_EOS Calculates the critical temperature, pressure and
% volume of
% a multicomponent mixture using the method developed by Heidemann
% and
% Khalil (1980) and Michelsen and Heidemann (1981). Can use both
% Peng-Robinson and Soave-Redlich-Kwong EOS. Two parameter van der
% Waals
% mixing rules are used. Initial critical property estimates are
% generated
% by the program unless specified by the user (see below).
%
% Inputs:
% n - vector of molar compositions of components
% Tci - Critical temperatures of pure components (K)
% Pci - Critical pressures of pure components (bar)
% w - Acentric factors of pure components
%
% Optional:
% kij - Binary interaction parameters of n species in vector form
%       ex. kij = [k12 k13 k14 k15 k23 k24 k25 k34 k35 k45]
% lij - Binary interaction parameters of n species in vector form
%       ex. lij = [l12 l13 l14 l15 l23 l24 l25 l34 l35 l45]
%
% Optional Parameters:
% eos - Flag indicating which EOS to use (1 = PR, 2 = SRK; default
% = PR)
% Ti - Starting temperature for Tc iteration (K)
% vi - Starting molar volume for v iteration (cm^3/mol)
% ver - Verbose output (default = 0, 1 = on)
%
% Outputs:
```

```

% T - Critical temperature of mixture (K)
% P - Critical pressure of mixture (bar)
% v - Critical volume of mixture (cm^3/mol)
%
% Example Usage:
% -- CO2 and ethanol --
% Tci = [304.2, 516.4]; % (K)
% Pci = [73.82, 63.84]; % (bar)
% w = [0.288, 0.637];
% kij = 0.06; % Secuianu et al. (2008)
% n = ...
% [T, P, v] = CRITPT_EOS(n, Tci, Pci, w, kij, 'ver', 1);

% Copyright Hythem Sidky (c) 2012
%
% This work is licensed under a Creative Commons
% Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0) Unported License.
% http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/
%
% Changes:
% 04/24/14 - Modified interaction parameter input to packed
format.
% 07/07/12 - Corrected error in summation.
% 07/04/12 - Initial file.

% References:
% 1 - Heidemann, Robert A., and Ahmed M. Khalil. "The Calculation
of
% Critical Points." AIChE Journal 26.5 (1980): 769-79.
% 2 - Michelsen, Michael L., and Robert A. Heidemann. "Calculation
of
% Critical Points from Cubic Two-constant Equations of State."
AIChE
% Journal 27.3 (1981): 521-23.

% Get component count
n = length(z);

% Parse user inputs
p = inputParser;
% - Required
p.addRequired('n', @(x)~isempty(x));
p.addRequired('Tci',@(x)length(x) == n);
p.addRequired('Pci',@(x)length(x) == n);
p.addRequired('w', @(x)length(x) == n);

% - Optional
p.addOptional('kij', 0, @(x)length(x) ==
factorial(n)/(2*factorial(n-2)));

```

```

    p.addOptional('lij', 0, @(x)length(x) ==
factorial(n)/(2*factorial(n-2)));
    % - Optional Parameters
    p.addParamValue('Ti', 0, @(x)x>0);
    p.addParamValue('vi', 0, @(x)x>0);
    p.addParamValue('eos', 1, @(x)x==1 || x==2);
    p.addParamValue('ver', 0, @(x)x==0 || x==1);

    % - Parse
    p.parse(z, Tci, Pci, w, kij, lij, varargin{:});
    z = p.Results.n;
    Tci = p.Results.Tci;
    Pci = p.Results.Pci;
    w = p.Results.w;
    kij = p.Results.kij;
    lij = p.Results.lij;
    eos = p.Results.eos;
    Ti = p.Results.Ti;
    vi = p.Results.vi;
    ver = p.Results.ver;

    % Expand packed interaction parameter vector
    km = zeros(n);
    lm = zeros(n);
    for i=1:n
        for j=i:2
            if i==j
                km(i,j) = 0;
                lm(i,j) = 0;
            else
                km(i,j) = kij(j+(2*n-i)*(i-1)/2-i);
                lm(i,j) = lij(j+(2*n-i)*(i-1)/2-i);
                km(j,i) = km(i,j);
                lm(j,i) = lm(i,j);
            end
        end
    end

    % Override previous entries
    kij = km;
    lij = lm;

    % If user supplied a mol frac of 0 for any component, just
    remove it.
    % This makes things easy when generating a critical curve in
    an
    % external call
    j = find(z == 0);
    n = length(j); % Update count
    for i=1:n

```

```

    z(j(i)) = [];
    Tci(j(i)) = [];
    Pci(j(i)) = [];
    w(j(i)) = [];
    kij(j(i),:) = [];
    kij(:,j(i)) = [];
    lij(j(i),:) = [];
    lij(:,j(i)) = [];
end

% Now let's check if the result of the above process leaves us
with a
% pure compound. If that's the case then just return supplied
% properties. User doesn't supply v so return 0.
if length(z) == 1
    if ver
        fprintf('Only a single compound supplied. ');
        fprintf(' Returning pure properties\n');
    end
    T = Tci;
    P = Pci;
    v = 0;
    return;
end

% Define R and normalize n
R = 83.14472; % (bar cm3/mol-K)
z = z./sum(z);

% Initial guess of Tc, if user didn't supply one. We will
evaluate
% initial v guess later because we need to calculate some
thermo
% properties first.
T = Ti;
if ~T
    T = 1.5*sum(z.*Tci);
end

% Declare thermodynamics properties anonymous functions
props = @(n,T,v)calc_eos_props(n, T, v, Tci, Pci, w, kij, lij,
eos);

% Generate initial v guess by evaluating b. Below is not ideal
but we
% really only need b. It doesn't matter what v is (obviously b
is
% independent of it).
v = vi;

```

```

[~,~,~,~,~,b,~] = props(z, T, 0);
if ~v
    v = 4*b;
end

% Display initial conditions
if ver
    fprintf('\nInitial estimates: Tc = %.3f K, v = %.3f
(cm^3/mol)\n', ...
        T, v);
    fprintf('\nSolving for initial Tc where det(Q)=0\n');
end

% Get an initial evaluation on Tcrit then begin finding zero
of cubic
% form Cf which contains a nested routine for calc_T_crit
f = @(T)calc_T_crit(z,T,v,props);
%T = fzero(f,T);
To=200;
options =
optimset('MaxFunEvals',1000,'Display','off','MaxIter',10);
T=fminsearch(f,To,options);
% Display initial calculated Tc
if ver
    fprintf('Initial Tc = %.3f K\n',T);
    fprintf('\nBegin solving both criticality conditions\n');
end

% Solve for critical volume
f = @(v)calc_v_crit(z,T,v,props,ver);
%v = fzero(f,v);
%[fmin,v] = fnmin(f,...);
%v=fnzeros(f,[-999 999]);
vo=2;
options =
optimset('MaxFunEvals',1000,'Display','off','MaxIter',10);
v=fminsearch(f,vo,options);

% Re-evaluate critical volume for appropriate temperature
[~,T,~] = f(v);

% Return critical temperature, pressure and volume
[~,D,~,~,a,b,~] = props(z, T, v);
P = R*T/(v-b)-a/((v+D(1)*b)*(v+D(2)*b));

% Display final results
if ver
    fprintf('\nFinal Results:\n');
    fprintf('Tc = %.3f K, Pc = %.3f bar, v = %.3f
(cm^3/mol)\n', ...

```

```

        T, P, v);
    end

% calc_v_crit - Calculates the cubic form Cf for a given T.
Returns Cf,
% iterated temperature T from inside loop, and perturbation vector
N.
function [Cf, T, N] = calc_v_crit(n, T, v, props, ver)

    % Total number of moles
    C = length(n);
    nt = sum(n);

    % Define R
    R = 83.14472; % (bar cm3/mol-K)

    % Evaluate Tcrit for given v
    tcrit = @(T)calc_T_crit(n,T,v,props);
    %T = fzero(tcrit,T);
    %[tcritmin,T] = fmin(tcrit,...);
    % T=fnzeros(tcrit,[-999 999]);
    To=200;
    options =
optimset('MaxFunEvals',1000,'Display','off','MaxIter',10);
    T=fminsearch(tcrit,To,options);

    % Re-evaluate tcrit for det(Q), then get thermo properties
    [~, Q] = tcrit(T);
    [F, ~, A, B, a, b, aij] = props(n, T, v);

    % Calculate a non-zero perturbation vector in component mols
(N) based
    % on Q*N=0 using SVD then normalize the vector.
    [U,~,~] = svd(Q);
    N = U(:,end);
    N = N'/norm(N);

    % Calculate additional critical point parameters (underscore
indicates
    % a bar on variable in paper.
    N_ = sum(N);
    A_ = sum(N.*A);
    B_ = sum(N.*B);
    a_ = 0;
    for i=1:C
        for j=1:C
            a_ = a_ + N(i)*N(j)*aij(i,j);
        end
    end
end

```



```

a_ = a_/a;

% Calculate cubic form Cf. Split into terms for readability.
Note in
% [2], "RT" is multiplied by first term. However in original
paper [1]
% it is divided through.
t1 = -sum(N.^3./n.^2)+3*N_*(B_*F(1))^2+2*(B_*F(1))^3;
t2 = 3*B_^2*(2*A_-B_)*(F(3)+F(6))-2*B_^3*F(4)-3*B_*a_*F(6);
Cf = 1/nt^2*(t1)+a/(nt^2*b*R*T)*t2;
Cf = Cf*((v-b)/(2*b))^2; % Dimensionless scaling term [1]

% Display iteration
if ver
    fprintf('Iteration T = %.3f K, v = %.3f (cm^3/mol)\n', T,
v);
end

% calc_T_crit - Calculates hessian matrix Q and its determinant
detQ for a
% given temperature. The name of the function is misleading
because it
% doesn't actually calculate Tc. It's simply used in it's
calculation.
function [detQ, Q] = calc_T_crit(n, T, v, props)

% Total number of moles
C = length(n);
nt = sum(n);

% Define R
R = 83.14472; % (bar cm3/mol-K)

% Kronecker delta
delta = eye(C);

% Get thermodynamics properties
[F, ~, A, B, a, b, aij] = props(n, T, v);

% Calculate matrix Q and determinant.
Q = zeros(C);
for i=1:C
    for j=1:C
        % Split terms up for readability. Note in [2], "RT" is
        % multiplied by first term, however in original paper
[1] it is
        % divided through. This scaling helps with root
finding.
        t1 =
(1/nt)*(delta(i,j)/n(i)+(B(i)+B(j))*F(1)+B(i)*B(j)*F(1)^2);

```

```

        t2 = (B(i)*B(j)-A(i)*B(j)-A(j)*B(i))*F(6);
        t3 = a/(b*R*T*nt)*(B(i)*B(j)*F(3)-aij(i,j)/a*F(5)+t2);
        Q(i,j) = (t1+t3)*T/100; % Dimensionless scaling factor
[1]
    end
end
detQ = det(Q);

% calc_eos_props - Calculates the thermodynamic properties
including EOS
% parameters for the input components. Returns mixture properties
and
% auxillary functions used in critical calculation.
function [F, D, A, B, a, b, aij] = calc_eos_props(n, T, v, Tci,
Pci, w, kij, lij, eos)

    % Total number of moles
    C = length(n);
    nt = sum(n);

    % Define reduced temperature and R
    Tri = T./Tci;
    R = 83.14472; % (bar cm3/mol-K)

    % - EOS assignments. Switch between PR and SRK EOS depending
on user
    % input. These are condition independent parameters.
    if eos==1 % Peng-Robinson
        u0 = 2;
        w0 = -1;
        psi = 0.45724;
        omg = 0.07780;
        m = 0.37464+1.54226.*w-0.26992*w.^2;
    else % Soave-Redlich-Kwong
        u0 = 1;
        w0 = 0;
        psi = 0.42748;
        omg = 0.08664;
        m = 0.480+1.574.*w-0.176*w.^2;
    end
    D1 = (u0+sqrt(u0^2-4*w0))/2;
    D2 = (u0-sqrt(u0^2-4*w0))/2;

    % - Calculate EOS pure component parameters
    ai = (R.*Tci).^2*psi./Pci.*(1+m.*(1-sqrt(Tri))).^2;
    bi = omg*R*Tci./Pci;

    % - Calculate EOS mixture parameters
    a = 0;

```

```

b = 0;

aij = zeros(C);
bij = zeros(C);
for i=1:C
    for j=1:C
        aij(i,j)=sqrt(ai(i)*ai(j))*(1-kij(i,j));
        bij(i,j)=sqrt(bi(i)*bi(j))*(1-lij(i,j));
        a = a + n(i)*n(j)*aij(i,j)/nt^2;
        b = b + n(i)*n(j)*bij(i,j)/nt^2;
    end
end

% Override b. comment this line to have geometric mixing for
% b as well.
b = sum(n.*bi/nt);

B = bi./b; % beta
A = zeros(1,C); % alpha
for i=1:C
    for j=1:C
        A(i) = A(i)+n(j)*aij(i,j);
    end
    A(i) = A(i)/a;
end

% Dimensionless volume and auxillary functions
K = v/b;
F1 = 1/(K-1);
F2 = 2/(D1-D2)*(D1/(K+D1)-D2/(K+D2));
F3 = 1/(D1-D2)*((D1/(K+D1))^2-(D2/(K+D2))^2);
F4 = 1/(D1-D2)*((D1/(K+D1))^3-(D2/(K+D2))^3);
F5 = 2/(D1-D2)*log((K+D1)/(K+D2));
F6 = F2 - F5;

% Return matrices
F = [F1, F2, F3, F4, F5, F6];
D = [D1, D2];

```

Programación del modelo de Sovová (elaboración propia)

```

clc;
clear all;
tcer=1360;
tfer=6800;
Z=3.6;

%% Modelo BIC - Sovová, 1994

%Constantes de entrada
QCO2=0.000153; %Flujo de CO2 (kg/s)
mmuestra=0.0069427; %masa de la muestra ingresada al extractor
(kg)
mextracto=0.000231100; %masa total de extracto (kg)

msi=mmuestra-mextracto; %masa de material no extraíble (libre de
extracto) (kg)
xo=mextracto/msi; %masa inicial de material extraíble relativa a
la masa no extraíble (kg/kg)
Y=0.00021607; %solubilidad del extracto en el solvente a una P y T
(kg/kg)

t=[5 10 15 20 25 30 40 50 60 80 100 120 150 180 210 240 270
300]*60;
%vector tiempo en segundos

%%
%Ecuaciones del modelo

%Parámetros constantes
xp=(tcer*Y*Z*QCO2)/msi;
xk=xo-xp;

j=1;
W(1)=0.001;
Werror(1)=1;

while Werror(j)>0.000001

    W(j+1)=(msi/((tfer-
tcer)*QCO2))*log((xk+xp*exp(W(j)*xo/Y))/xo);
    Werror(j+1)=abs(W(j+1)-W(j));
    W(j)=W(j+1);
    j=j+1;
end

w=W(numel(W));

for i=1:1:numel(t)

```

```

        Zw(i)=(Z*Y)/(w*xo))*log((xo*exp(w*QCO2*(t(i)-tcer)/msi)-
xk)/(xo-xk));

end

for i=1:1:numel(t)
    if (t(i)>0) && (t(i)<=tcer)
        y(i)=QCO2*Y*(1-exp(-Z))*t(i); %etapa CER

        elseif (t(i)<=tfer)&&(t(i)>tcer)
            y(i)=QCO2*Y*(t(i)-tcer*exp(Zw(i)-Z)); %etapa FER

            elseif t(i)>tfer
                y(i)=msi*(xo-(Y/w)*log(1+(exp(w*xo/Y)-
1)*exp((w*QCO2/msi)*(tcer-t(i)))*(xk/xo)));
                %etapa DC

            end
        end
end

%%
%Función de error

yobs=[2.455E-05 3.525E-05 0.0000461 5.895E-05 6.62E-05 7.63E-05
9.03E-05 0.0001033 0.0001125 0.0001282 0.00014025 0.00014755
0.0001571 0.00017095 0.00019445 0.0002067 0.0002179 0.0002311];

for i=1:1:numel(t)

    E(i)=abs((y(i)-yobs(i))/yobs(i));
end

error=sum(E);

[c,~]=restric_sovova(Z,tfer,tcer);

if c(1)<=0 && c(2)<=0 && c(3)<=0
    disp('las restricciones se cumplen')
end

tmin=t/60;
tcermin=tcer/60;
tfermin=tfer/60;
%desviacion estandar de yobs (datos experimentales)
DE= [1.64756E-05 1.492E-05 1.58392E-05 5.86899E-06 9.61665E-06
7.9196E-06 4.38406E-06 8.48528E-07 7.77817E-07 7.21249E-06
3.88909E-06 3.53553E-07 1.41421E-06 4.45477E-06 1.80312E-05
1.79605E-05 1.1738E-05 1.40007E-05];

```

```

errorbar(tmin,yobs,DE)
hold on
plot(tmin,y)
hold on
plot([tcermin tcermin],ylim)
hold on
plot([tfermin tfermin],ylim)

[r2 rmse]=rsquare(yobs,y)%Cálculo de coeficiente de determinación

```

Restricciones del modelo de Sovová (elaboración propia)

```

function [c,ceq] = restric_sovova(Z,tfer,tcer)

QCO2=0.000153; %Flujo de CO2 (kg/s)
mmuestra=0.0069427; %masa de la muestra ingresada al extractor
(kg)
mextracto=0.000231100; %masa total de extracto (kg)

msi=mmuestra-mextracto; %masa de material no extraíble (libre de
extracto) (kg)
xo=mextracto/msi; %masa inicial de material extraíble relativa a
la masa no extraíble (kg/kg)
Y=0.00021607; %solubilidad del extracto en el solvente a una P y T
(kg/kg)

c(1) = Z-((msi*xo)/(tcer*Y*QCO2));
c(2)= tcer*(1+Z)-tfer;
c(3) = tfer-tcer-((msi*xo)/(QCO2*Y));

ceq = [ ];
end

```

Código de Matlab para calcular coeficiente de determinación (*)

```

function [r2 rmse] = rsquare(y,f,varargin)
% Compute coefficient of determination of data fit model and RMSE
%
% [r2 rmse] = rsquare(y,f)
% [r2 rmse] = rsquare(y,f,c)
%
% RSQUARE computes the coefficient of determination (R-square)
value from
% actual data Y and model data F. The code uses a general version
of
% R-square, based on comparing the variability of the estimation
errors

```

```

% with the variability of the original values. RSQUARE also
outputs the
% root mean squared error (RMSE) for the user's convenience.
%
% Note: RSQUARE ignores comparisons involving NaN values.
%
% INPUTS
%   Y      : Actual data
%   F      : Model fit
%
% OPTION
%   C      : Constant term in model
%           R-square may be a questionable measure of fit when
no
%           constant term is included in the model.
%   [DEFAULT] TRUE : Use traditional R-square computation
%           FALSE  : Uses alternate R-square computation for model
%                   without constant term [R2 = 1 - NORM(Y-
F)/NORM(Y)]
%
% OUTPUT
%   R2     : Coefficient of determination
%   RMSE   : Root mean squared error
%
% EXAMPLE
%   x = 0:0.1:10;
%   y = 2.*x + 1 + randn(size(x));
%   p = polyfit(x,y,1);
%   f = polyval(p,x);
%   [r2 rmse] = rsquare(y,f);
%   figure; plot(x,y,'b-');
%   hold on; plot(x,f,'r-');
%   title(strcat(['R2 = ' num2str(r2) ' '; RMSE = ' num2str(rmse)]))
%
% Jered R Wells
% 11/17/11
% jered [dot] wells [at] duke [dot] edu
%
% v1.2 (02/14/2012)
%
% Thanks to John D'Errico for useful comments and insight which
has helped
% to improve this code. His code POLYFITN was consulted in the
inclusion of
% the C-option (REF. File ID: #34765).

if isempty(varargin); c = true;
elseif length(varargin)>1; error 'Too many input arguments';

```

```
elseif ~islogical(varargin{1}); error 'C must be logical
(TRUE||FALSE) '
else c = varargin{1};
end

% Compare inputs
if ~all(size(y)==size(f)); error 'Y and F must be the same size';
end

% Check for NaN
tmp = ~or(isnan(y),isnan(f));
y = y(tmp);
f = f(tmp);

if c; r2 = max(0,1 - sum((y(:)-f(:)).^2)/sum((y(:)-
mean(y(:))).^2));
else r2 = 1 - sum((y(:)-f(:)).^2)/sum((y(:)).^2);
    if r2<0
        %
        http://web.maths.unsw.edu.au/~adelle/Garvan/Assays/GoodnessOfFit.h
        tml
        warning('Consider adding a constant term to your model')
    %#ok<WNTAG>
        r2 = 0;
    end
end

rmse = sqrt(mean((y(:) - f(:)).^2));
```

[*]Recuperado de: <https://la.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/34492-r-square-the-coefficient-of-determination>

E. Anexo: Producción académica

Manuscrito sometido a *Journal of Supercritical fluids*

Franco-Arnedo, G., Buelvas-Puello, L., Parada-Alfonso, F., Martínez-Correa, H. SFE of *C. reticulata* var. 'Arrayana' peels and its use as a natural antioxidant in a mayonnaise.

Participación en eventos

Franco-Arnedo, G., Parada-Alfonso, F., Martínez-Correa, H. A contribution to citrus biorefinery. Potential use of tangelo and mandarin byproducts. XXVI Italo American Congress of Ethnomedicine Society – SILAE/IX Congreso Colombiano de Cromatografía – COCOCRO (Cartagena de Indias, Colombia, 2017). Modalidad: Póster.

José Alejandro Bourdon García, Luis Miguel Buelvas Puello, Gabriela Franco Arnedo, Fabián Parada Alfonso. Obtención de extractos a partir de epicarpio de mandarina empleando técnicas convencionales y no convencionales. Modalidad: Ponencial oral. / *Simposio Internacional de Solanáceas Cultivadas en el Trópico y VII Congreso Colombiano de Horticultura. 15-17 noviembre de 2017. Cajicá, Cundinamarca.*