



VNIVERSITAT E VALÈNCIA
FACULTAD DE FARMACIA

*Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública,
Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina
Legal*

**Programa de Doctorado en Ciencias de la
Alimentación**

**Compuestos bioactivos y capacidad
antioxidante en zumos y extractos de
residuos, obtenidos por ultrasonidos,
de mandarinas híbridas**

Dirigida por:

Presentada por:

Dra. Ana Frígola Cánoves
Dra. M^a José Esteve Mas

Mayra Lucía Anticona Barreto

Valencia, febrero 2022

Ana M^a Frígola Cánoves y M^a José Esteve Más, Catedráticas, del Área de Nutrición y Bromatología, del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, de la Universitat de València,

CERTIFICAN QUE: la licenciada en Nutrición, Dña Mayra Lucía Anticona Barreto ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título: “Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en zumos y extractos de residuos, obtenidos por ultrasonidos, de mandarinas híbridas” para optar al Título de Doctor por la Universitat de València.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Burjassot (Valencia), 16 de febrero de 2022.

Dra. Ana M^a Frígola Cánoves

Dra. M^a José Esteve Más

La estudiante de doctorado Mayra Lucía Anticona Barreto agradece a la beca predoctoral “Generación del Bicentenario” otorgada por el Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo (PRONABEC), del Ministerio de Educación, de la República del Perú.

AGRADECIMIENTOS

Luego de un largo camino de esfuerzo y dedicación me gustaría utilizar estas líneas para expresar mi profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado y han colaborado en la realización del presente trabajo. Gracias a mis directoras de Tesis, las doctoras Ana Frígola y M^a Jose Esteve, por su orientación, por compartir sus conocimientos y amor por la ciencia, por el riguroso seguimiento y supervisión a lo largo de todos estos años, sobretodo durante la etapa final, y especialmente por la motivación que me brindasteis aún cuando las circunstancias me fueron adversas. He aprendido mucho de vosotras y ese es el mejor regalo que me llevo. ¡Muchas gracias!

De manera especial agradezco al Doctor Jesús Blesa, quien, al incorporarse al equipo, se sumó también a orientarme y dirigirme con el trabajo en el laboratorio. Muchas gracias por tu paciencia y constancia cuando empezamos con el HPLC. Para mi fue iniciar desde cero y con tu ayuda aprendí muchísimo. Eres un gran ser humano. ¡Siempre te estaré agradecida! Gracias también al Doctor Daniel López, por compartir conmigo sus conocimientos y por hacerme más sencillas las explicaciones, por responder todas y cada una de mis dudas y sobre todo por su tiempo. Eres un excelente profesional.

Quiero dar mi más sincero agradecimiento a todas las personas del departamento, especialmente a las Dras. Reyes, Amparo, Guadalupe, y el Dr. Antonio, gracias por también transmitir vuestros conocimientos conmigo, que me fueron útiles en mi día a día en el laboratorio, y también por compartir agradables momentos. No voy a olvidar los buñuelos por fallas y los *croissants* en cada cumpleaños. Asimismo, gracias a las Dras. Cristina y Ana, quienes se sumaron a brindarme su apoyo durante el desarrollo de mi trabajo. Gracias también a las geniales personas del despacho de 'secretaría', gracias

especialmente a la Dra. Carmen Escrivá por todas las veces que, sin reparos, me ayudó en todo lo que necesité. ¡Muchas gracias!

Por supuesto, quiero dar las gracias a todos mis compañeros del Laboratorio 4-02 por vuestro apoyo, palabras de ánimo, por recibirme con los brazos abiertos y por tener tiempo para compartir conmigo, en fin, tantas cosas, cada uno se lleva un pedacito de corazón. Han sido más de 4 años en esta etapa de grandes momentos a vuestro lado, pero realmente a varios os conocí desde que hice el máster años antes, con ellos empiezo. Marieta, 'teta', eres una persona ¡maravillosa! pero ¡maravillosa de verdad!, admiro tu fortaleza, de ti aprendí a ser humilde, constante y disciplinada, gracias por decirnos siempre que, *si yo pude, vosotros también*. Gracias por nuestras conversaciones y por todos tus consejos cuando pasé por una etapa difícil, lo aprecio profundamente y como olvidar los *Ferrero Rocher* por navidad, sin duda siempre bienvenidos. Gracias a mi querida Islam por ser siempre un punto de apoyo durante mi trabajo. Te recuerdo aún en las clases de máster, cuando me explicabas algo que yo no entendía, pero te recordaré siempre por el tiempo que compartimos durante el doctorado, por tu ayuda desinteresada, por resolver cada duda y darte el tiempo de enseñarme, eres excepcional, de verdad ¡muchas gracias! Gabi, que puedo decir que no te lo hayan dicho ya. Eres sencillamente único, tan sincero, una excelente persona, un gran compañero. Gracias por tu paciencia, tus palabras de ánimo en mi última etapa, y sobre todo por tu tiempo. Gracias por escucharme cada vez que lo necesité y ser tan transparente. De ti incluso aprendí cosas de *Harry Potter* que no sabía, que momentos de diversión que sólo los que lo compartimos entendemos. Eres un excelente profesional y esa es la mejor enseñanza que me llevo de ti, gracias, cariño. Virgi, que buenos recuerdos tengo de nuestros primeros años de tesis. Tu vocación y dedicación para el trabajo en el

laboratorio han sido de inspiración para mí. Siempre estuviste dispuesta a ofrecerme tu apoyo en el laboratorio, muchas gracias. No puedo creer cómo ha pasado el tiempo, sois todos 'Doctores' y grandes profesionales, muchas gracias por todo chicos.

Quiero dar las gracias a mis compañeras del grupo de investigación *Nutraliment*; empiezo con mi ñaña Raquel, mi compañerita de doctorado. Iniciamos juntas y vaya momentos nos tocaron, la vida se encargó de que me faltases físicamente durante la última etapa de mi tesis, pero tu te has encargado de siempre estar ahí, ser mi soporte, muchas gracias. Sólo tú eres capaz de entender lo difícil que han sido todos estos años para mí, me siento afortunada de haber contado contigo para absolutamente todo, gracias por tu sincero abrazo cuando más falta me hizo, por tus palabras de aliento cuando sentí que todo se me derrumbaba, gracias por esos cafés de horas y horas, que me hicieron tanto bien, gracias por llorar conmigo, por reír conmigo y por cantar conmigo. Gracias por dejarme compartir contigo lo mejor que puedo dar, a ese Dios que un día conocí, y que hoy también está a tu lado. Gracias por todo ñaña. Adri y Clara, las chicas *Nades*, cuantas cosas compartimos durante tiempo que coincidisteis conmigo. Adri, amiga, mi *compi* de *eurotrip*, me alegro mucho de que hayas iniciado este reto académico. Estoy segura de que vas a conseguir todo lo que te propongas por desde ya lo estás demostrando. Eres una excelente amiga, muchas gracias por todos tus consejos, en todos los ámbitos en los que los necesité, gracias sobretodo por tu tiempo, por intentar animarme cuando sentía que no podía más y sobre todo por tu apoyo desinteresado. ¡Te quiero mucho amiga!. Clara, *pequeña*, que ánimos siempre me brindaste, gracias por ello, sobre todo en mi última etapa. Gracias por ser tan dispuesta y abierta, y por escucharme cuando más lo

necesitaba y por darme la certeza de que seguiré contando contigo. Estoy segura de que llegarás muy lejos, no me cabe ninguna duda.

Gracias también a todos mis compañeros de laboratorio, a los que se incorporaron hace poco y a quienes fueron parte de nuestro gran grupo durante sus estancias y trabajos de investigación. Laura (Italiana), Laura (Holandesa), Eva, Musa, Nerea, Manu, Ana, Diego, Nacho, Romy, Pablo, Sonia. Todos vosotros aportasteis un granito en mi día a día, siendo parte de un buen ambiente, de ese buen rollo que los del laboratorio conocemos. Me quedo con el recuerdo de nuestro mural en el laboratorio, de tantos momentos compartidos.

No puedo continuar sin agradecer a mis amigos de *Vives*, que sin dudarlo han estado siempre ahí, para mí. Gracias por los ánimos recibidos cada sábado, por vuestra compañía, y sobre todo gracias por vuestras oraciones. Han sido un importante apoyo para mí. Os tengo en el corazón. Y agradezco también a mi buena amiga Magdalena, que desde el día que nos conocimos no dudó en ningún momento ayudarme en lo que necesitara. Has sido una gran bendición en mi vida y ruego a Dios me permita retribuirte al menos un poco de todo lo que me brindaste. Eres un gran ser humano, ¡te quiero mucho! Gracias también todas y cada una de las personas maravillosas que he conocido a lo largo de estos años, que se han preocupado por mí y sin dudarlo me han brindado su más sincero apoyo.

A mis padres les doy las gracias siempre por acompañarme en cada uno de mis retos y por que aún sabiendo que esta tesis significaba estar lejos de ellos no dudaron en apoyarme y brindarme lo mejor que podían, su amor. Gracias por enseñarme a superarme, a luchar por mis sueños, a aceptar mis derrotas con humildad y aprender de mis errores, y sobre todo a gracias por siempre hacerme saber que aún en los momentos más difíciles estáis para mí. Gracias,

papá por todo tu esfuerzo para mi educación, gracias porque, aunque cansado no te rendías, y salías cada día a trabajar, con ello me enseñaste a valorar cada pequeño logro y que cada mínimo avance es importante para conseguir un objetivo. Gracias, mamá por todas y cada una de tus amorosas palabras, por soportar que tu pajarito saliera del nido tan pronto sin nunca detenerme, al contrario, apoyarme a seguir adelante. No son suficientes las palabras para expresar lo afortunada que me siento de ser vuestra hija, y por ello os dedico todos y cada uno de mis logros, ¡sois los mejores!

A mi hermano Samuel, gracias por verme como tu igual, aunque nos llevemos 16 años, porque con eso me inspirabas a ser un mejor ejemplo para ti y siempre estaré contigo cuando lo necesites. Echaré de menos al pequeño que dejé cuando empecé el doctorado. ¡Gracias por ser tan buen niño, te quiero! Y aunque no esté aquí conmigo, a Karlita le habría dado las gracias por enseñarme a no tener miedo, y a disfrutar los pequeños momentos. Ella fue y siempre será una de las personas más importantes en mi vida.

Y finalmente quiero dar las gracias al hacedor de todo en mi vida, Dios. Sin duda, durante todo este tiempo he pasado por momentos de prueba muy difíciles, pero Dios fue mi primer soporte. Mi fe en Él me ha mantenido con la fuerza suficiente para seguir día a día, porque es mejor vivir con esperanza, que vivir sin ella.

“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente;
no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios
estará contigo en dondequiera que vayas”

Josué 1:9 (Reina-Valera, 1960)

“La ciencia es el proceso de pensar los
pensamientos de Dios después de Él”

Johannes Kepler

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	I
INDICE DE FIGURAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. FRUTOS CÍTRICOS	3
1.1.1. Mandarinas.....	11
1.1.2. Zumo	15
1.2. RESIDUOS DE FRUTOS CÍTRICOS	17
1.2.1. Residuos de mandarina (<i>C. reticulata</i>) e híbridos.....	21
1.3. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE RESIDUOS CÍTRICOS	23
1.3.1. Métodos convencionales y no-convencionales	24
1.3.2. Ultrasonidos	26
1.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE RESIDUOS DE MANDARINA.....	30
1.4.1. Etapas del análisis de compuestos bioactivos	30
1.4.2. Determinación de compuestos fenólicos.....	33
1.4.3. Determinación de carotenoides.....	47
1.5. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	56
1.6. BIBLIOGRAFÍA	60
II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	73
III. MATERIAL Y MÉTODOS	81
3.1. MUESTRAS.....	83
3.1.1. Obtención de zumo	84
3.1.2. Obtención de extractos de piel de mandarinas híbridas	84
3.1.2.1. Extracción control	85

3.1.2.2. Extracción asistida por ultrasonidos.....	85
3.2. ANÁLISIS DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	86
3.2.1. Conductividad	86
3.2.2. °Brix: Sólidos solubles totales.....	87
3.2.3. pH.....	87
3.2.4. Color.....	88
3.3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	89
3.3.1. Compuestos fenólicos totales.....	89
3.3.2. Flavonoides totales.....	91
3.3.3. Ácido ascórbico.....	92
3.3.4. Carotenoides totales	93
3.4. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	95
3.4.1. Método DPPH	95
3.4.2. Método TEAC	97
3.5. CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	99
3.5.1. Método purificación para la separación de compuestos fenólicos de extractos de piel de mandarina.....	99
3.5.2. Detección de compuestos fenólicos por HPLC-UV	102
3.5.3. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por UPLC- qTOF-MS/MS	105
3.6. CARACTERIZACIÓN DE CAROTENOIDES	108
3.6.1. Método de extracción y saponificación para la determinación de carotenoides en los extractos de piel de mandarina	108
3.6.2. Detección de carotenoides por HPLC-UV	110
IV. RESULTADOS	115
4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA, CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN ZUMO DE TRES VARIEDADES DE MANDARINAS HÍBRIDAS	117

4.1.1. Material y métodos.....	117
4.1.2. Resultados y discusión.....	119
4.1.3. Conclusiones	139
4.2. EFECTOS DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS SOBRE LAS PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS, LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PIEL DE MANDARINAS HÍBRIDAS	140
4.2.1. Material y métodos.....	140
4.2.2. Resultados y discusión.....	142
4.2.3. Conclusiones	157
4.3. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE EXTRACTOS DE PIEL DE MANDARINAS HÍBRIDAS.....	158
4.3.1. Material y métodos.....	158
4.3.2. Resultados y discusión.....	160
4.3.3. Conclusiones	188
4.4. CARACTERIZACIÓN DE CAROTENOIDES EN EXTRACTOS DE PIEL DE MANDARINAS HÍBRIDAS	190
4.4.1. Material y métodos.....	191
4.4.2. Resultados y discusión.....	191
4.4.3. Conclusiones	204
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	205
VI. CONCLUSIONES	223
VII. BIBLIOGRAFÍA	229
VIII. ANEXOS	247

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Condiciones óptimas de almacenamiento <i>post</i> -cosecha de frutos cítricos mayormente producidos	11
Tabla 2.	Composición nutricional en 100 g de zumo de mandarina	16
Tabla 3.	Estudios de efectos protectores y preventivos de extractos de residuos de mandarina realizados en los últimos 10 años	22
Tabla 4.	Métodos de extracción para la obtención de polifenoles y carotenoides de residuos cítricos	26
Tabla 5.	Sistemas cromatográficos para el análisis de compuestos fenólicos de piel de mandarina.....	42
Tabla 6.	Sistemas cromatográficos para el análisis de carotenoides de piel de mandarina	55
Tabla 7.	Métodos empleados para determinar la capacidad antioxidante en residuos de mandarina.	59
Tabla 8.	Muestras según variedad y temporada de cosecha	84
Tabla 9.	Gradiente de fase móvil para la determinación de polifenoles por HPLC-UV	104
Tabla 10.	Gradiente de fase móvil para la determinación de polifenoles por UPLC-qTOF-MS/MS	106
Tabla 11.	Coefficientes de extinción de los patrones de carotenoides	111
Tabla 12.	Gradiente de fase móvil para la determinación de carotenoides por HPLC-UV.....	113
Tabla 13.	Conductividad, sólidos solubles totales, pH y color de zumos de mandarina según temporada de cosecha	120
Tabla 14.	Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de zumos de mandarina según variedad y temporada de cosecha.	127
Tabla 15.	Coefficientes de correlación de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante	133
Tabla 16.	Estudio de la evolución de las variables durante las temporadas de cosecha.....	135

Tabla 17. Coeficientes de la función de clasificación según la variedad	137
Tabla 18. Coeficientes estandarizados de la función discriminante por variedad	137
Tabla 19. El pH, Flavonoides totales, Ácido ascórbico, DPPH y TEAC: Clasificación de las variedades y el porcentaje de aciertos en la predicción	138
Tabla 20. Diferencias de las propiedades fisicoquímicas de extractos de piel de mandarinas según tiempo de extracción y variedad.	143
Tabla 21. Contenido de compuestos bioactivos en extractos de piel de mandarinas según tiempo de extracción y variedad.	145
Tabla 22. Capacidad antioxidante de piel de mandarinas tratadas por ultrasonidos.	149
Tabla 23. Métodos de purificación estudiados en extractos de piel de mandarinas para la detección de compuestos fenólicos.....	161
Tabla 24. Intervalos y parámetros de linealidad del método EFS-C ₁₈ /HPLC-UV para la determinación de compuestos fenólicos en piel de mandarinas híbridas	171
Tabla 25. Límites de detección y cuantificación de los compuestos fenólicos estudiados	172
Tabla 26. Precisión intra-día e inter-día del método EFS-C ₁₈ /HPLC-UV para la determinación de compuestos fenólicos en piel de mandarinas híbridas	173
Tabla 27. Exactitud y efecto matriz del método EFS-C ₁₈ /HPLC-UV para la determinación de compuestos fenólicos en piel de mandarinas híbridas.	175
Tabla 28. Concentraciones de compuestos fenólicos cuantificados por UPLC-qTOF-MS/MS en la piel de mandarina híbridas.	179
Tabla 29. Métodos de extracción (líquido-líquido) y saponificación en extractos de piel de mandarinas para la detección de carotenoides.....	192

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies ancestrales de cítricos	4
Figura 2. Mapa de expansión de los frutos cítricos a Europa y territorio mediterráneo	7
Figura 3. Producción mundial de frutos cítricos	9
Figura 4. Estructura de un fruto cítrico	10
Figura 5. Clasificación de las mandarinas	13
Figura 6. Componentes en residuos cítricos	19
Figura 7. Fenómeno de cavitación producido por las ondas ultrasónicas (compresión y rarefacción) durante el proceso de extracción	27
Figura 8. Equipos de ultrasonidos mayormente empleados.....	29
Figura 9. Etapas en el análisis de compuestos bioactivos de alimentos	31
Figura 10. Estructura de los principales compuestos fenólicos en frutos cítricos ..	34
Figura 11. Clasificación de compuestos fenólicos según su estructura	36
Figura 12. Estructura de los principales carotenoides en frutos cítricos.....	48
Figura 13. Clasificación de compuestos carotenoides según su estructura.....	49
Figura 14. Diseño del experimento y Plan de trabajo	78
Figura 15. Variedades de mandarinas incluidas en el estudio	83
Figura 16. Piezas seleccionadas de piel de mandarinas para elaborar los extractos..	85
Figura 17. Equipo de ultrasonidos empleado en el estudio.....	86
Figura 18. Gráfico de las coordenadas de medición de color	89
Figura 19. Reacción del radical DPPH [•] por captación del antioxidante	95
Figura 20. Reacción del radical ABTS ^{•+} por captación del antioxidante durante el ensayo	97
Figura 21. Proceso de análisis de polifenoles en piel de mandarina.....	101
Figura 22. Equipos cromatográficos de HPLC (a) y UPLC (b) empleados en el estudio.	106
Figura 23. Proceso de análisis de carotenoides en piel de mandarina.	110
Figura 24. Valores medios de parámetros físico-químicos en zumo de mandarinas híbridas.	121

Figura 25. Histogramas de correlación de los parámetros físico-químicos de zumo de mandarinas híbridas	124
Figura 26. Valores medios del contenido de compuestos bioactivos en zumo de mandarinas híbridas	128
Figura 27. Aporte de Vitamina C del zumo de mandarina a los requerimientos a la Ingesta Nutricional de Referencia.	130
Figura 28. Capacidad antioxidante del zumo de mandarina según variedad y temporada de cosecha.	132
Figura 29. Gráficos circulares de correlación estadística entre las características físico-químicas, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de los zumos de mandarinas híbridas.....	134
Figura 30. Diferenciación de variedades de mandarinas según las funciones discriminantes	138
Figura 31. Diferencias de capacidad antioxidante evaluadas por los métodos DPPH y TEAC, según a) variedades de piel de mandarinas tratadas por ultrasonidos y b) métodos antioxidantes aplicados.	151
Figura 32. Ácido ascórbico, Flavonoides totales y valores de DPPH y TEAC, de piel de mandarinas híbridas tratadas por ultrasonidos durante 5, 15 y 30 min.	152
Figura 33. Análisis de varianza de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de extractos de piel de mandarinas híbridas.	154
Figura 34. Índice de extracción de Incremento de conductividad, ° Brix, Flavonoides Totales, DPPH y TEAC, en extractos de piel de mandarina híbridas .	156
Figura 35. Cromatogramas de patrones de compuestos fenólicos a 280 nm por HPLC-UV	170
Figura 36. Cromatogramas de extractos de piel de mandarina híbridas a 280 nm por HPLC-UV	177
Figura 37. Distribución de la concentración de flavonoides en extractos de piel de mandarinas híbridas	181
Figura 38. Distribución de la concentración de ácidos fenólicos en extractos de piel de mandarinas híbridas	183

Figura 39. Correlación estadística entre el contenido de compuestos fenólicos determinado por UPLC-qTOF-MS/MS	184
Figura 40. Histograma de correlación entre los compuestos fenólicos determinados en piel de mandarinas híbridas	185
Figura 41. Gráfica del Análisis de Componentes Principales del contenido de compuestos fenólicos en mandarinas híbridas.....	186
Figura 42. Contribución de los componentes principales a la variabilidad de la composición fenólica en las muestras	187
Figura 43. Contribución de los compuestos fenólicos al componente 1.....	188
Figura 44. Cromatograma de patrones de carotenoides a 450 nm por HPLC-UV	201
Figura 45. Cromatograma de extractos de piel de mandarinas híbridas a 450 nm por HPLC-UV	203

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido ascórbico
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AESAN	Asociación Española de Alimentación y Nutrición
AIJN	Association of the Industry of Juices and Nectars/ Asociación Europea de Zumos de frutas
ANOVA	analysis of variance/ análisis de la varianza
BHT	butilhidroxitolueno
C₁₈	octadecilsilano
C₈	octilsilano
CE	catequin equivalent/ equivalente de catequina
CFT	compuestos fenólicos totales
CT	carotenoides totales
C_{USN}/C_U	cantidad por ultrasonidos/ cantidad control (índice de extracción)
DAD	detector diode-array
DE	desviación estándar
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl/ 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo
EUROSTAT	Statistical office of the European Union/ Oficina Europea de Estadística
FAO	Food and Agriculture Organization/ Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FT	flavonoides totales
GAE	gallic acid equivalente/ equivalente de ácido gálico
GC	gas chromatography/ cromatografía de gases
HPLC	high performance of liquid chromatography/ cromatografía líquida de alta resolución
Hz	hercio
IC	incremento de conductividad
INR	ingesta nutricional de referencia
LOD	limit of detection/ límite de detección
LOQ	limit of quantification/ límite de cuantificación
m/z	relación masa/carga
EC	extracción control
MS	mass spectrometer/ espectrometría de masas

MTBE	metil-ter-butil éter
NP-HPLC	normal phase of high performance of liquid chromatography/ cromatografía líquida de alta resolución en fase normal
¹O₂	oxígeno singlete
APC	análisis de componentes principales
PF	peso fresco
PMF	polimetoxiflavonas
<i>qTOF</i>	quadrupole time-of-flight/ tiempo de vuelo cuadrupolo
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe/ Rápido, fácil, barato, efectivo, y seguro
ROS	reactive oxygen species/ especies reactivas de oxígeno
RP-LC	reverse phase of liquid chromatography/ cromatografía líquida en fase reversa
RSD	relative standard deviation/ desviación estándar relativa
SPE	solid phase extraction/ extracción en fase sólida
TE	trolox equivalente
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity/ capacidad antioxidante equivalente de trolox
TROLOX	(±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UPLC	ultra performance of liquid chromatography/ cromatografía líquida de ultra resolución
UI	unidades internacionales
USDA	United States Department of Agriculture/ Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
USN	ultrasonidos
UV/Vis	ultravioleta visible
W	vatios

RESUMEN

Los cítricos son el cultivo más importante a nivel mundial. La elaboración de zumos genera grandes cantidades de residuos de fácil degradación, pero con alto contenido de compuestos bioactivos. La extracción asistida con ultrasonidos es uno de los métodos no-convencionales de extracción con resultados favorables. Durante la extracción son necesarios procesos de *clean-up* que favorezcan la purificación de los extractos para su mejor aprovechamiento. Además, la bibliografía indica que existe un mayor número de estudios con los de cítricos más conocidos, sin embargo, pocas investigaciones muestran resultados en mandarinas híbridas. Por todo ello el objetivo del presente trabajo es el estudio de mandarinas híbridas para la determinación de las características fisicoquímicas y funcionales del zumo, y de extractos de piel obtenidos por ultrasonidos, así como la caracterización del perfil fenólico de los extractos, y el estudio para la determinación de carotenoides en extractos cítricos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que los zumos de mandarinas híbridas (Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique) presentan características fisicoquímicas adecuadas para garantizar su calidad. La variedad y la temporada de cosecha influyen significativamente en el contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de los zumos. Así pues, los zumos de mandarina Clemenvilla muestran el mayor contenido de compuestos fenólicos totales y ácido ascórbico, con alta capacidad antioxidante según los métodos empleados. Los zumos de variedad Nadorcott presentan las concentraciones más altas de flavonoides totales mientras que en la variedad Ortanique de la segunda temporada de cosecha se obtiene el contenido más alto de carotenoides totales. La capacidad antioxidante de los zumos se correlaciona significativamente con el contenido de los compuestos bioactivos.

La extracción asistida por ultrasonidos tiene un efecto positivo en el contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. No se determina una influencia significativa de la variedad y el tiempo de tratamiento sobre las

características físico-químicas, sin embargo el contenido de compuestos bioactivos es influenciado por estos factores. Las muestras de variedad Clemenvilla presentan mayor concentración de flavonoides totales y ácido ascórbico. Los extractos de Ortanique contienen mayor cantidad de compuestos fenólicos, mientras que en las muestras de variedad Nadorcott se obtiene el mayor contenido de carotenoides totales. Durante la evaluación de la capacidad antioxidante se determina que el contenido de flavonoides y ácido ascórbico influye significativamente en los resultados, siendo las muestras de variedad Clemenvilla las de mayor actividad. El análisis del índice de extracción evidencia que cortos tiempos de tratamiento favorecen la obtención de compuestos bioactivos como los flavonoides, con alta capacidad antioxidante.

También se estudia la aplicación de diversos métodos de purificación sobre extractos de mandarina obtenidos por ultrasonidos. Se observa que con la extracción en fase sólida empleando cartuchos de C₁₈ como método *clean-up* se obtienen resultados satisfactorios para la separación y caracterización de polifenoles por HPLC-UV. Los compuestos de mayor concentración, identificados por UPLC-qTOF-MS/MS, son hesperidina y narirutina, siendo la piel de mandarinas Nadorcott y Ortanique las de mayor concentración, respectivamente.

Asimismo, se realiza un estudio sobre diversos procedimientos de extracción líquido-líquido y saponificación para la caracterización de carotenoides por HPLC-UV, en extractos de piel de mandarina obtenidos por ultrasonidos. Se observa un mejor perfil de carotenoides después de la extracción con dietil-éter en tres fases y una posterior saponificación.

Palabras claves: ultrasonidos, características físico-químicas, compuestos bioactivos, capacidad antioxidante, residuos cítricos, piel de mandarina.

INTRODUCCIÓN

1.1. FRUTOS CÍTRICOS

Los cítricos son el cultivo principal de frutas a nivel mundial con una producción estimada en 2015 de 130 947 miles de toneladas (FAO, 2017). Los cítricos se cultivan en las regiones de clima templado del mundo, donde las temperaturas en invierno son adecuadas para la supervivencia de los árboles y para evitar los daños por congelación, con suficiente agua y suelos adecuados que permiten el crecimiento de los árboles y la producción de los frutos (Talon & Gmitter, 2008). Durante el desarrollo de los frutos cítricos, estos pueden caer del árbol cuando el fruto es inmaduro, así, la caída se da de forma natural en frutos con un diámetro de 1 a 3 cm según las diferentes variedades y en este caso las frutas caídas se descartan en el campo (Ye et al., 2011). Aparte de su uso alimentario, los frutos cítricos han sido empleados ampliamente en la medicina tradicional china por sus efectos antimicrobianos y antiinflamatorios, principalmente atribuidos a altos niveles de compuestos bioactivos como fenoles (incluidos flavonoides), aceites esenciales, vitamina C y carotenoides (Duarte et al., 2016).

Los frutos del género *Citrus* pertenecen a la sub-familia *Aurantioideae* de la amplia familia *Rutacea* y son, probablemente, de los primeros frutos cultivados y explotados por el hombre (Ollitrault et al., 2020). El origen de los cítricos podría situarse en una extensa región del sudeste asiático que comprende el noreste de India, Myanmar y el sudeste de China, posteriormente se extenderían hacia el Medio Oriente, y finalmente por Europa y América (Talon et al., 2020). Wu et al. (2018) indican que los cítricos se diversificarían, aproximadamente, durante el mioceno tardío (6-8 Ma) a través de una rápida extensión desde el sudeste asiático, dando lugar a ocho especies progenitoras. Asimismo, indican que probablemente a través de dispersiones trans-oceánicas, ocurridas durante una segunda etapa de extensión en el primer plioceno de Oceanía, se originarían

varias especies de cítricos en Australia. De este mismo modo, la mandarina Tachibana, una especie nativa de Taiwán, el archipiélago de Ryukyu y Japón, se originaría durante el primer pleistoceno (2 Ma) (Wu et al., 2018).

Estudios previos han permitido determinar que los ancestros de la mayoría de especies cítricas conocidas serían *C. medica* (citron), *C. reticulata* Blanco (mandarina), *C. máxima* (pomelo) y *C. micrantha* Wester (papeda) (Ahmed et al., 2019; Curk et al., 2015; Wu et al., 2018) (Figura 1). A partir de estas especies y como resultado de la hibridación entre ellas, se originarían especies secundarias como *C. sinensis* L. Osbeck (naranja dulce), *C. aurantium* L. (naranja amarga), *C. paradisi* Macf. (toronja), *C. limon* L. Burm. (limón) y *C. aurantiifolia* Christm. Swing. (lima) (Ahmed et al., 2019). El estudio filogenético más completo en cítricos fue presentado por Wu et al. (2018) mediante un análisis genómico comparativo de 58 lotes de semillas de diversos cítricos y 2 variedades relacionadas, se identificaron 10 especies de cítricos como progenitores, dentro de los cuales, tres especies ancestrales (*C. medica*, *C. maxima* y *C. reticulata*) se asociaron con variedades comerciales conocidas (limones, limas, naranjas y toronjas), así como con nuevos híbridos.

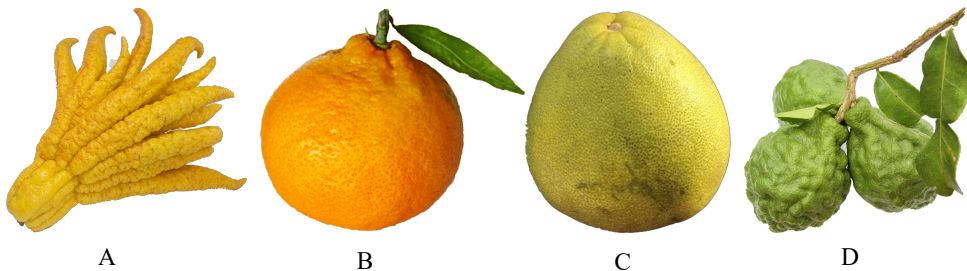


Figura 1. Especies ancestrales de cítricos A. Citrón (*C. medica*), B. Mandarina (*C. reticulata* Blanco), C. Pomelo (*C. maxima*), D. Papeda (*C. micrantha* Wester).

A pesar de que los frutos cítricos son ampliamente cultivados y consumidos en toda el área mediterránea, no son especies nativas de la región, ya que fueron importados por diversas culturas durante su expansión. En la zona de la cuenca mediterránea los cítricos empezarían a conocerse con la introducción del citrón (especie nativa de la India) por los persas (Antigua Media). Mas adelante, con la conquista de Persia por los griegos, se extendió su consumo. En su obra *Historia Plantarum*, Theophrastus de Eresos (372-287 a.C.) señala que al fruto del árbol del citrón se le conocía como *median* debido al origen persa (Antigua Media) que los griegos le atribuían del cual se derivaría su nombre en latín, *Citrus medica*, y no por sus propiedades medicinales (Duarte et al., 2016; Langgut, 2017). Posteriormente con la conquista Romana, estos frutos serían conocidos en casi todo el imperio. Pagnoux et al. (2013) señalan que los restos de *C. medica* (semillas) encontrados en un templo de Pompeya datarían de los siglos III y II a.C., siendo los hallazgos más antiguos de cítricos en la región mediterránea. El fruto del limonero, *C. limón*, fue posiblemente extendido en la región mediterránea occidental por los romanos, quienes empezaron a cultivarlo en casi todas las áreas de su imperio como un símbolo de élite, encontrándose restos (de semillas y fragmentos de piel) en el *Forum Romanum* en Roma que datan aproximadamente de entre los años 27 a.C. y 14 d.C. (Langgut, 2017; Pagnoux et al., 2013). La naranja agria (*C. aurantium*), cuya formación se remonta a la zona del sur de China o norte de Indochina, fue inicialmente introducida en Mesopotamia y el Mediterráneo oriental, aproximadamente en el siglo X y desde allí emigraría a la región occidental durante la expansión árabe hasta Sicilia, Cerdeña y España. Los frutos de *C. aurantifolia*, tienen su origen probablemente en Malasia o en el archipiélago de las Indias Orientales, desde dónde se extendieron hasta occidente por los árabes. Se han encontrado restos de semillas que datan de los siglos XI y XIII en territorios Egipcios, como resultado de la conquista Islámica (Langgut, 2017; Pagnoux et al., 2013). El origen del pomelo

(*C. máxima*) se sitúa en el sudeste asiático continental y el archipiélago malayo, y su migración al territorio mediterráneo se remonta a los siglos XI y XII siendo introducido en España por los árabes, donde sus condiciones climáticas favorecieron su expansión (Langgut, 2017). Las naranjas dulces (*C. sinensis*) fueron ampliamente cultivadas en China antes de llegar a la zona del mediterráneo; sin embargo, no existe una fecha determinada hasta mediados del siglo XV que existen referencias de su cultivo en el sur de Europa, sobre todo a partir de inicios del siglo XVI, siendo los portugueses quienes fomentaron su importación (Duarte et al., 2016; Langgut, 2017). Las mandarinas (*C. reticulata*), cuyo origen se remonta a cientos de años en China y el noreste de la India, fueron en un inicio traídas de China a Inglaterra en 1805, y desde allí a Malta y luego a Italia, extendiéndose al resto del territorio mediterráneo (Duarte et al., 2016; Langgut, 2017), dónde rápidamente se adaptó, debido a sus condiciones climáticas favorables. En la figura 2 se muestra la expansión a Europa y territorio mediterráneo. Con el paso del tiempo, los medios de cultivo y los avances en irrigación han permitido contar con miles de hectáreas de árboles cítricos en diversas zonas de la cuenca mediterránea, siendo España el mayor país productor de la zona.

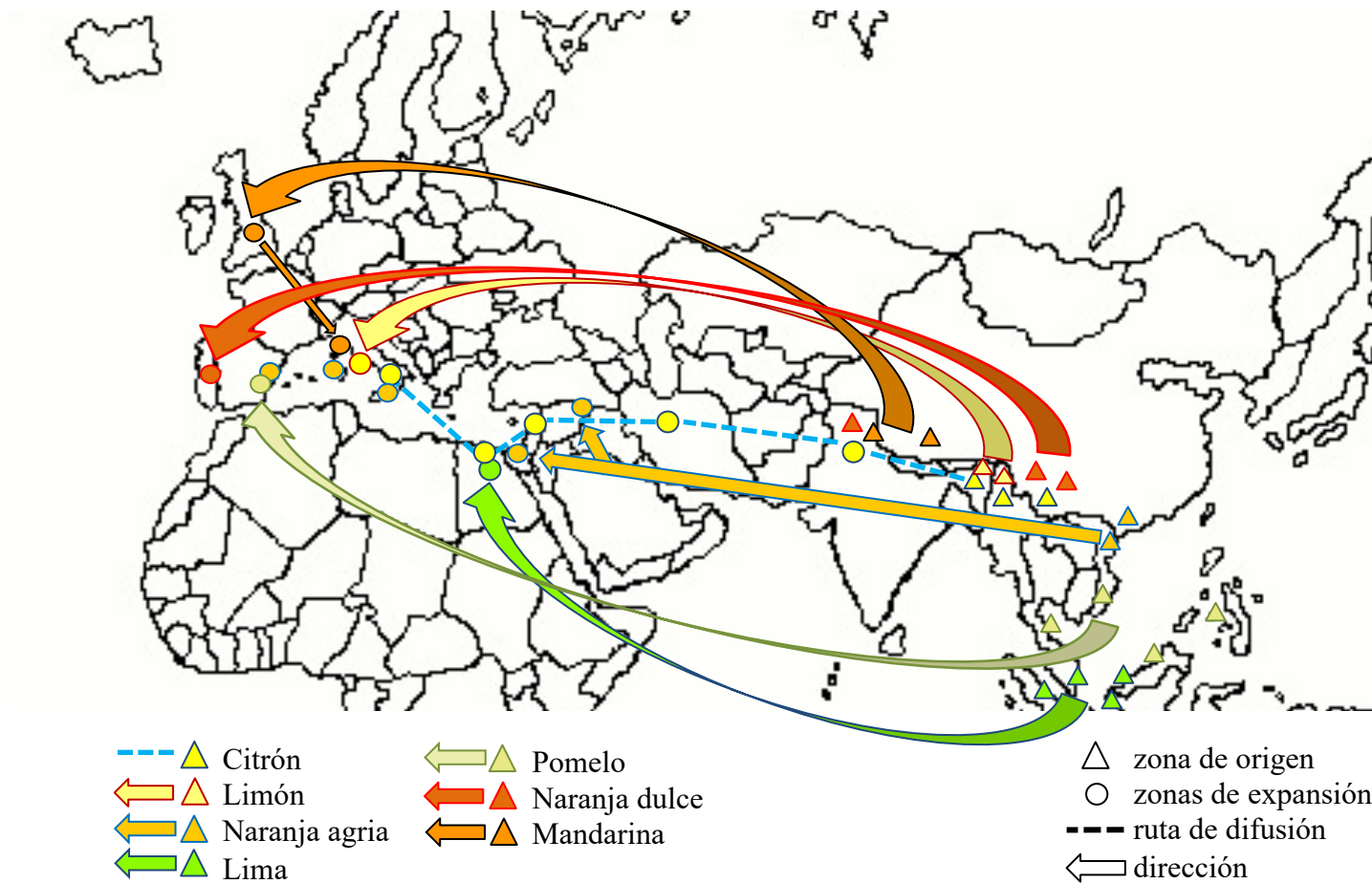
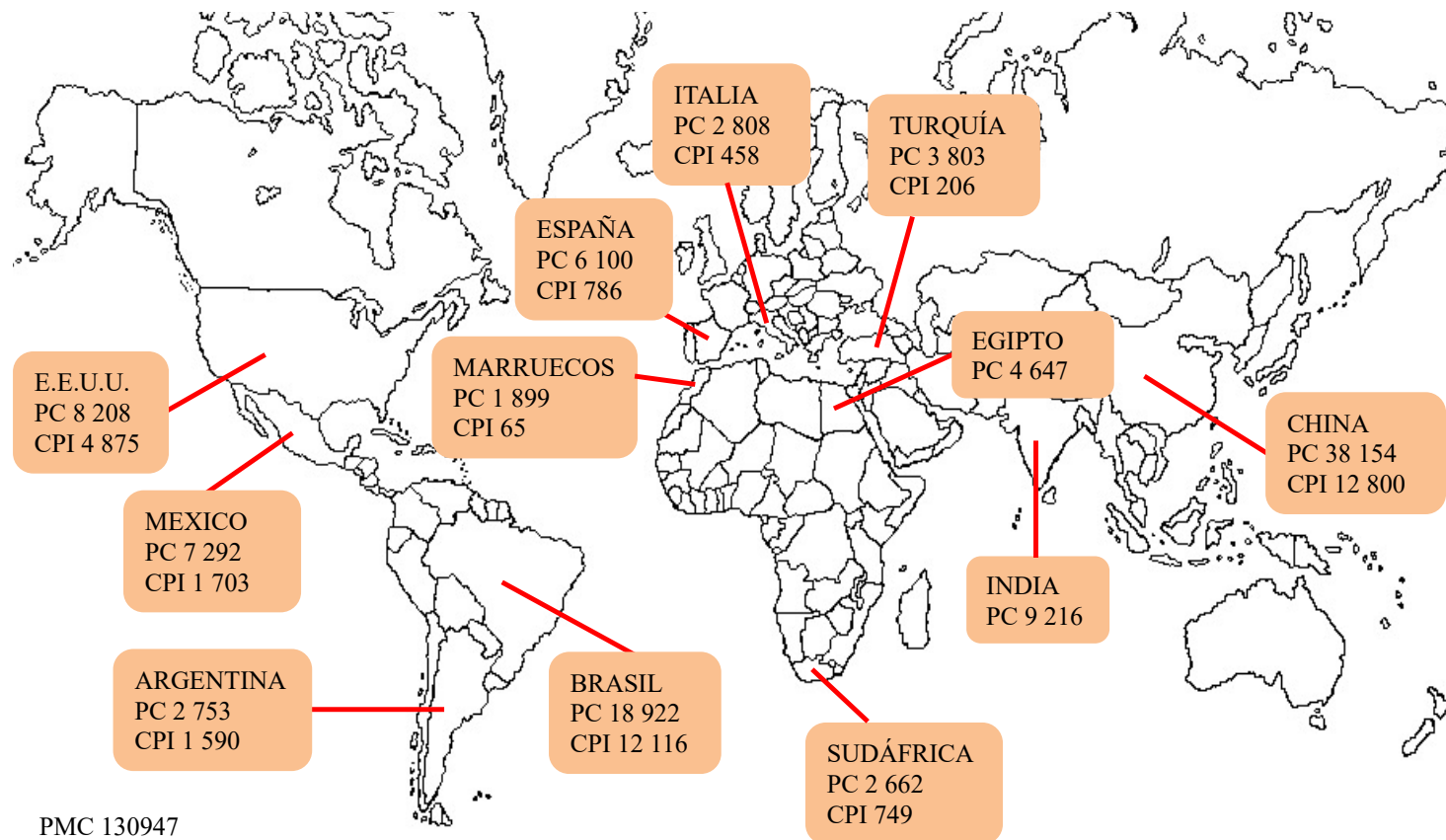


Figura 2. Mapa de expansión de los frutos cítricos a Europa y territorio mediterráneo.

La producción de cítricos para su consumo, en fresco o procesado, es importante para el comercio mundial donde tienen un alto impacto económico. Entre los países con mayor producción cítrica se encuentran China, Brasil, India, Estados Unidos, México, España y Egipto, entre otros (FAO, 2017) (Figura 3). A nivel europeo, España constituye el principal productor de cítricos con una producción estimada en 2015 de un 58,6% del total europeo (10414 miles de toneladas) (FAO, 2017). Siendo sus condiciones climáticas y las características del suelo las que favorecen el crecimiento de estos árboles, cuyos frutos tienen un sabor y color más atractivo que los cítricos de las regiones originarias (Duarte et al., 2016). En el último informe correspondiente a la campaña 2019/2020, España tuvo una producción cítrica de 6 238 673 toneladas y sólo en la Provincia de Valencia se produjeron 1 874 349 toneladas, un 30% de la producción nacional de cítricos (Generalitat Valenciana, 2020).

Los cítricos incluyen una amplia gama de variedades de las cuales casi el 70% corresponde a la naranja dulce (*C. sinensis* L. Osb.) (Talon & Gmitter, 2008), seguida por las mandarinas (*C. reticulata*). Entre los cítricos de mayor producción también se encuentran limas (*C. latifolia*), limones (*C. aurantifolia*) y pomelos (*C. paradisi*). Todos estos frutos derivan de especies ancestrales como *C. medica*, *C. reticulata*, *C. maxima* y *C. micrantha* que fueron sometidos a diferentes modificaciones según el lugar y tiempo. Las variedades de cítricos comerciales más conocidos hoy en día se clasifican según su constitución filogenómica, actualizada recientemente en diferentes estudios (Ahmed et al., 2019; Curk et al., 2015; Wu et al., 2018).



PMC 130947
CPI 24996

PMC: Producción mundial de cítricos; PC: producción de Cítricos, CPI: cítricos empleados en procesos industriales. Datos en miles de toneladas

Figura 3. Producción mundial de frutos cítricos (fuente FAO, 2017).

Aproximadamente el 87% del peso de los frutos cítricos es agua, mientras que el 13% corresponde a varios compuestos (3% grasas, 5% aceites esenciales, 9% proteínas, 10% minerales, 10% de glucósidos, 11% fibras, 15% de pentosanos, 16% ácidos cítricos y 21% de pectinas) (Zema et al., 2018). Estructuralmente el fruto cítrico está constituido por la piel que representa entre el 25 y el 40% del peso del fruto (Yu et al., 2021) formada por una parte externa coloreada conocida como flavedo (exocarpo), una parte interna incolora llamada albedo (mesocarpo) y los sacos de zumo (endocarpo) (Chen et al., 2021) (Figura 4). El típico color naranja-amarillo de la piel de los cítricos se debe a la degradación de la clorofila verde y la formación del característico color amarillo-rojo (conversión de β,ϵ -carotenoide en β,β -carotenoide en el flavedo) durante la maduración (Putnik et al., 2017a).

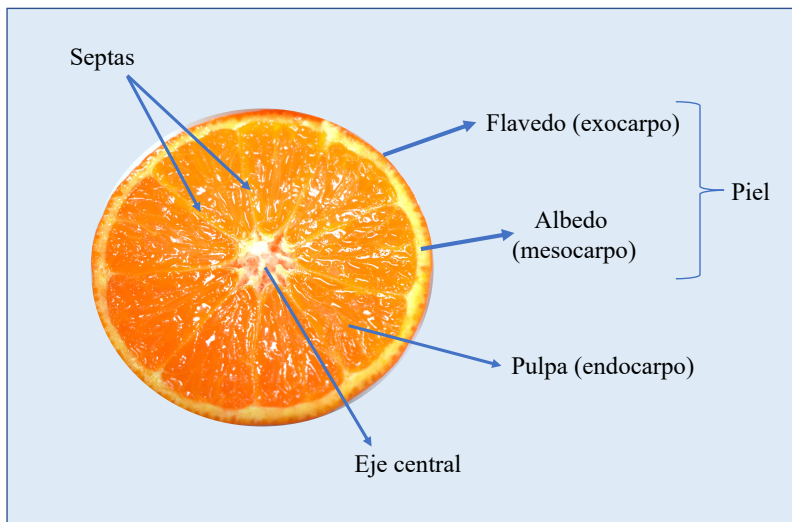


Figura 4. Estructura de un fruto cítrico

El almacenamiento adecuado de los cítricos (véase Tabla 1) es necesario para preservar sus características de calidad como color, sabor, olor y actividad enzimática (Li et al., 2021). Los principales problemas del almacenamiento en condiciones no óptimas corresponden a lesiones por frío, daños y oscurecimiento

de la piel, así como enfermedades fúngicas post-cosecha (Pérez-Gago & Palou, 2020).

Tabla 1. Condiciones óptimas de almacenamiento *post-cosecha* de frutos cítricos

Condiciones	Naranjas	Mandarinas	Limas	Limones	Toronjas
Temperatura	2-5 °C	5-10 °C	10-13 °C	7-12 °C	10-12 °C
Tiempo	hasta 3 meses	1-2 meses	6-8 semanas	4-6 meses	2-3 meses
Humedad	90-95 %				
Atmosfera	< 5-10% O ₂ < 0-5% CO ₂	< 5-10% O ₂ < 0-2% CO ₂		< 5-10% O ₂ < 0-10% CO ₂	< 3-10% O ₂ < 5-12% CO ₂

Adaptado de Pérez-Gago & Palou (2020).

1.1.1. Mandarinas

Después de la naranja, la mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) es uno de los mayores cultivos cítricos y representa el 22% de la producción mundial de este tipo de frutos (FAO, 2017). Son uno de los principales cítricos producidos en España con más de 1 966 448 toneladas durante 2017-2018 y 2 408 753 toneladas en 2018-2019. En la provincia de Valencia se cosechó el 38% y el 39% de la producción nacional de mandarinas en las temporadas 2017-2018 y 2018-2019, respectivamente (Generalitat Valenciana, 2018, 2019).

La especie *C. reticulata* posee el genoma más corto del género *Citrus* (Gmitter et al., 2020; Ollitrault et al., 2020). Originaria del sudeste asiático, llegó a Europa en 1805 extendiéndose hasta la región del mediterráneo. En España, la mandarina se introdujo en 1845 pero su cultivo se inició en 1856, en la provincia de Castellón (Duarte et al., 2016). Estos frutos tienen un sabor dulce, color naranja rojizo y comúnmente es fácil de pelar (Ye et al., 2011). El término "mandarina" comprende un número de especies puras aún indeterminadas, así como una vasta colección de mezclas heterogéneas con diferentes proporciones de introgresión de pomelo. Asimismo, *C. Tachibana* (variedad nativa de Japón) puede ser

considerada como una subespecie de *C. reticulata*, mientras que las "mandarinas salvajes" naturales de Mangshan, del norte de las montañas de China, representan dos especies distintas: *C. mangshanensis* y *C. reticulata*. La evidencia genómica, ha permitido saber que *C. mangshanensis* no es un antepasado directo de *C. reticulata* por lo que ambas serían especies separadas (Gmitter et al., 2020).

C. reticulata constituye una especie ancestral para la generación de los cítricos modernos (Wang et al., 2017) siendo asociada con la formación de diferentes híbridos como *C. x aurantium*, *C. x amblycarpa*, *C. x limonia*, *C. x microcarpa*, *C. x lemon*, y *C. x latifolia* (Ollitrault et al., 2020). Sin embargo, Wu et al. (2014) indican que en algunas variedades de mandarinas tradicionales como 'Ponkan' y 'Willowleaf', que antes se consideraban erróneamente como especies *C. reticulata* puras, se han identificado introgresiones inter-específicas de *C. maxima*. En un estudio realizado por Curk et al. (2015) se confirmó una sistemática introgresión de *C. maxima* en varios cultivos de mandarinas comestibles, indicando que tendría un importante papel en su expansión, entre otros cítricos híbridos como naranjas (*C. sinensis*) y pomelos (*C. paradisi*), basado en la asociación de la proporción de *C. maxima*, con el tamaño y la palatabilidad de la fruta, entre otras características (Curk et al., 2015; Wu et al., 2018). Los datos actuales indican que solo las variedades *C. reticulata* var. *Tachibana* ined. y *C. reticulata* var. *Austera* Swingle no son especies con introgresiones de *C. maxima*. Estos serían los frutos de mandarino más puros y antiguos, de característica poliembriónica, que además no se consideran frutos comerciales. Ambos producen frutas pequeñas muy ácidas y con muchas semillas, que alcanzan el color naranja en la madurez (Ollitrault et al., 2020).

La clasificación más antigua de mandarinas fue realizada por Swingle (1943) y posteriormente por Tanaka (1954), quienes sentaron las bases para la

taxonomía actual de los cítricos. Recientemente Barry et al. (2020) clasificaron las mandarinas en tres tipos (Figura 5):

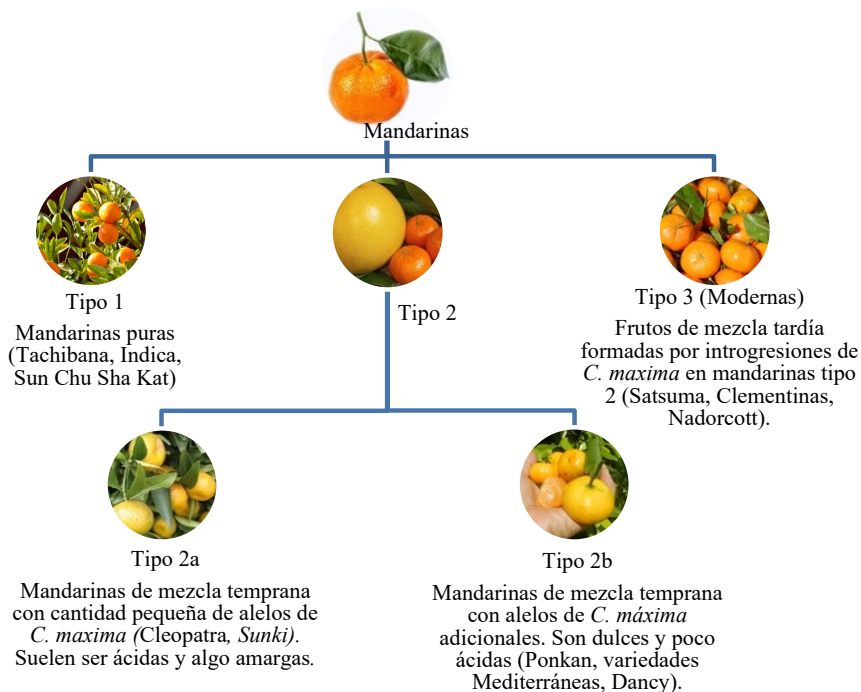


Figura 5. Clasificación de las mandarinas (Adaptado de Barry et al., 2020).

En la formación de diferentes cultivos de mandarinas se han desarrollado procesos de hibridación, con el objetivo de incrementar la resistencia de los árboles frente a las condiciones climáticas y enfermedades que afectan directamente a los frutos, y para mejorar las características organolépticas de aroma y sabor según las preferencias de los consumidores y la industria (Barboni et al., 2009). Una de las prácticas más desarrollada es emplear injertos que permitan producir rápidamente una cantidad ilimitada de árboles genéticamente idénticos y con frutos de características similares a los del árbol original (Bowman & Joubert, 2020). Como resultado de estos procesos se han obtenido diversas variedades a lo largo del mapa de cultivos cítricos.

Uno de los híbridos más comercializados es la variedad Ortanique. En 1963 se describe como mandarina Tangor, un híbrido de *C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* (L.) Osbeck. Es un cultivo de maduración tardía, cuyos frutos son grandes y permanecen en el árbol en buen estado por períodos prolongados. Se caracterizan por tener una aureola estilar en la base del fruto y una piel muy aceitosa (Barry et al., 2020). Nadorcott es un híbrido de Murcott (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* (L.) Osbeck) × Mandalina (*C. reticulata*), descubierto en 1982 y desarrollado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas de Marruecos. Mandalina es posiblemente un sinónimo de Ponkan en algunos países del Medio Oriente de donde se deriva. Sus árboles se caracterizan por ser de crecimiento erguido, menos denso que la Clementina, cuyos brotes no suelen ser espinosos. El polen de Nadorcott es altamente fértil; sin embargo, es muy sensible a la polinización cruzada. Las frutas son de tamaño mediano de color naranja profundo y albedo rosáceo, la textura de la piel es muy suave, de forma aplanada y posee leves nervaduras en el extremo del tallo. Su sabor se caracteriza por ser dulce ya que el contenido de azúcar es alto (10 - 14 °Brix) y su grado de acidez es moderado (1,0% - 1,4%) con una proporción bien equilibrada (Barry et al., 2020). Clementina es un híbrido natural de mandarinas mediterráneas y naranja dulce (*C. × aurantium* var. *Sinensis*). Fue descubierta por Clement Rodier (a quien debe su nombre) en el jardín de un orfanato en Argelia. Estos frutos tienen un excelente sabor, aunque son de tamaño más pequeño que otras clementinas cultivadas en otras regiones. Las Clemenvillas también conocidas como Nova desde 1964, son híbridos de Clementina (*C. clementina* Hort) y Tangelo Orlando (*C. paradisi* Macf x *C. tangerina* Hort). Los frutos son redondeados de tamaño mediano a grande, de piel color naranja-rojizo. Dado su alto contenido de azúcar y acidez equilibrada, los frutos son de sabor apetecible (Carrau, 2004; Verzera et al., 2000).

1.1.2. Zumo

La extracción de zumo es uno de los principales usos de los frutos cítricos, que según la FAO (2017) la cantidad destinada a procesos industriales representa un 18% de la producción. Las propiedades físico-químicas de los zumos permiten evaluar la calidad de estas bebidas. Datos como acidez, °Brix, pH, conductividad y color son los parámetros mayormente determinados en zumos cítricos (Coelho et al., 2021; Li et al., 2021). Según los datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), 100 g de zumo de mandarina fresco proporcionan 43 calorías, y contiene 10,1 g de hidratos de carbono (de los cuales 9,9 g corresponde a azúcares totales y 0,2 g a fibra). Asimismo, aporta diversas vitaminas y minerales tales como vitamina C (31 mg), vitamina B9 (5 mg), vitamina A (253 UI) y potasio (178 mg), entre otros (véase Tabla 2).

Numerosos estudios han determinado el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de zumos de cítricos comprobándose que la capacidad antioxidante está asociada al contenido de vitamina C y compuestos fenólicos de los zumos (Betoret et al., 2012; Hunlun et al., 2017; Roussos et al., 2019; Xu et al., 2008). Factores como el grado de madurez, condiciones climáticas e incluso forma de cultivo y actividades post-cosecha, además de las características genéticas propias según la variedad de las frutas, afectan a la composición de los zumos (Hunlun et al., 2017; Li et al., 2021; Roussos et al., 2019).

Aunque la comercialización de zumo de naranja es la principal actividad de la industria cítrica, la adición de zumo de mandarina se puede realizar para intensificar el color e incluso el sabor (Pérez et al., 2005) reforzando estos parámetros de calidad en los zumos. El zumo de mandarina, de sabor típicamente dulce y color naranja intenso, es rico en compuestos fenólicos, principalmente hesperidina, narirutina y didimina (Betoret et al., 2012), y carotenoides como β -

criptoxantina (Ma et al., 2017; Nakamura & Sugiura, 2019). En menor concentración se han encontrado compuestos volátiles, principalmente limoneno y γ -terpineno (Barboni et al., 2009). Diversos estudios han demostrado las propiedades anticancerígenas del zumo de mandarina tanto en estudios *in vitro* (Camarda et al., 2007; Celano et al., 2015, 2015; Cilla et al., 2020) como *in vivo* en ratas (Kohno et al., 1999; Tanaka et al., 2000). Recientemente se ha determinado el efecto protector de zumo de mandarina frente al síndrome metabólico (*in vivo*) en ratas (Testai et al., 2021) y la enfermedad de Parkinson (*in vitro*) (Cirmi et al., 2021).

Tabla 2. Composición nutricional en 100 g de zumo de mandarina (Adaptado de USDA, 2020).

Composición	Contenido en 100g de zumo de mandarina
Calorías (Kcal/100g)	43
Agua (g)	88,9
Hidratos de carbono (g)	10,1
- Azúcares (g)	9,9
- Fibra total (g)	0,2
Proteínas (g)	0,5
Grasa total (g)	0,2
Sodio (mg)	1
Potasio (mg)	178
Magnesio (mg)	8
Calcio (mg)	18
Hierro (mg)	0,2
Cobre (mg)	0,03
Cinc (mg)	0,03
Selenio (mg)	0,1
Vitamina C (mg)	31
Vitamina E (mg)	0,13
Vitamina A (UI)	253
Vitamina B9 (mg)	5

1.2. RESIDUOS DE FRUTOS CÍTRICOS

En el mundo se producen toneladas de residuos sólidos, que provienen de diferentes fuentes (doméstica, industrial, agricultura, etc.) y que en la mayoría de los casos no se vuelven a utilizar, generando un impacto negativo en el medio ambiente. En 2018, solo en la Unión Europea se produjeron alrededor de 2 317 millones de toneladas de residuos provenientes de actividades económicas y domésticas, de los cuales 10,6% provienen de la industria (EUROSTAT, 2020). El sector agrario y la industria agroalimentaria emplean recursos de la naturaleza para la obtención, manejo, procesamiento y comercialización de productos, sin embargo, solo se aprovecha un pequeño porcentaje de estos, generando una cantidad adicional de residuos que ocasionan serios problemas asociados a su eliminación (Cury et al., 2017; Ghosh et al., 2016). En 2011, se dio a conocer que 1,3 billones de toneladas de alimentos por año, generados desde la producción agrícola hasta el consumo, van a la basura (FAO, 2011), y representa casi un tercio del total de alimentos que se producen en el mundo y que no son consumidos. El 20% se pierde durante la cosecha y clasificación, el 3% en la etapa de almacenamiento y transporte, el 2% en los procesos agroindustriales (como la elaboración de zumos), un 9% durante la comercialización (venta al por mayor a los supermercados) y un 19% es descartado en los hogares. No hay una cifra exacta de la cantidad de residuos vegetales producidos por año, pero se conoce que tienen un impacto negativo sobre el medio ambiente por un mal manejo y porque son altamente perecederos, sin embargo, estos residuos son una fuente rica de biomoléculas y compuestos bioactivos (Figura 6). Recientemente, la FAO indica que de los alimentos producidos en el mundo, el 13,8% se pierden entre la explotación agrícola y el comercio al por menor (FAO, 2019). Entre el 15 y el 50% de todos los residuos de frutas y verduras producidos, se originan en la etapa de post-cosecha (Ghosh et al., 2016). Estos residuos que incluyen piel,

semillas y restos de pulpa y fibras, son en muchos casos reutilizables, presentan problemas de eliminación y son contaminantes por su fermentabilidad (Tripodo et al., 2004) y fácil biodegradación (Plazzotta et al., 2017) por lo que el estudio y aprovechamiento de estos residuos es creciente. La reutilización de residuos vegetales se centra en obtener los máximos beneficios y reducir la cantidad de residuos que van a vertederos, a su vez está dirigida a encontrar mejores formas de usar estos recursos naturales y renovables (Ghosh et al., 2016). A ello se suma que en la actualidad las empresas de alimentos son mejor valoradas por su compromiso de protección al medio ambiente y como política institucional deben ser conscientes del impacto ambiental que generan en sus procesos productivos.

Durante el procesado de cítricos, principalmente en la elaboración de zumo, se generan grandes cantidades de residuos que corresponden aproximadamente al 50% del peso total del fruto, que pueden ser reutilizados (Boukroufa et al., 2017). Del total de residuos, del 60 al 65% corresponden a la piel, del 30 al 35% son residuos de pulpa, y las semillas suponen menos del 10% (Mahato et al., 2019) (Figura 6).

El estudio de recuperación e identificación de compuestos bioactivos procedentes de residuos cítricos es creciente y ha llevado a investigar y desarrollar diversos métodos para la extracción de compuestos de interés como flavonoides, carotenoides, aceites esenciales y pectinas (Anticonna et al., 2020). El residuo más utilizado como sustrato para la obtención de estos compuestos bioactivos es la piel que generalmente se descarta sin tener en cuenta su potencial valor, dado que no es incluida como parte de la dieta humana como la pulpa o el zumo (Yu et al., 2021). En diversas investigaciones se ha estudiado la obtención de compuestos bioactivos de gran interés a partir de residuos de la piel de los cítricos (Buniowska et al., 2015; Ferreira et al., 2018; Gómez-Mejía et al., 2019; Ma et al., 2009; Ma et al., 2008; Saini et al., 2019), siendo los componentes

mayoritarios los flavonoides, carotenoides y aceites esenciales, que le atribuyen propiedades protectoras de la salud dado su potente carácter antioxidante (Wang et al., 2017).

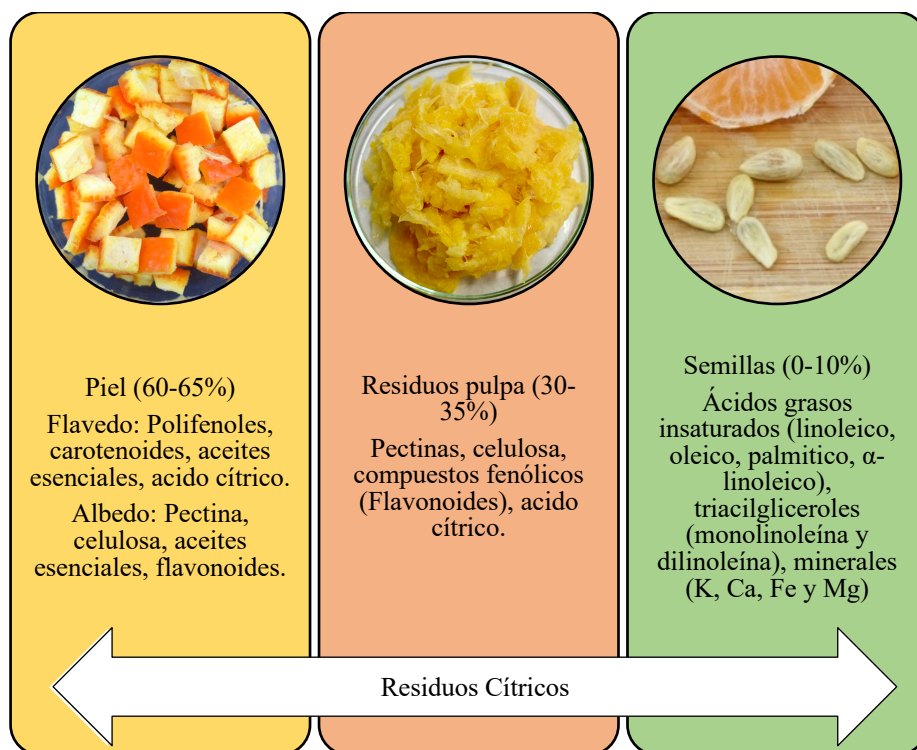


Figura 6. Componentes en residuos cítricos (adaptado de Anticona et al., 2020; Damian, 2018; Mahato et al, 2019; Rosa et al, 2019 y Zema et al., 2018).

El interés por el aprovechamiento y el manejo responsable de residuos cítricos ha ido en aumento por su alta disponibilidad, el bajo coste y la necesidad emergente de reducir el impacto ambiental ocasionado por su desecho (Peñaranda-Gonzalez et al., 2017). La potencial reutilización de los residuos cítricos ha permitido su empleo en la elaboración de sub-productos como biocombustibles (Taghizadeh-Alisaraei et al., 2017), como el bioetanol (Ghorbanpour Khamseh & Miccio, 2012), biopolímeros para envases de alimentos (Bátori et al., 2017), bio-nanopartículas de hierro (piel de pomelo como

agente reductor) (Wei et al., 2016) y plata (piel de limón, naranja y limón dulce como agente reductor) (Annu et al., 2018), fertilizantes y alimentos para animales (Castellanos & Torres, 2017), briquetas de carbón vegetal (Zanella et al., 2016), adsorbentes de compuestos químicos, así como para la extracción de aceites esenciales y pectinas (Rezzadori et al., 2012). Asimismo, hay estudios sobre el aprovechamiento termoquímico de los residuos sólidos de naranja (Aguiar et al., 2015), además de su uso para la extracción de celulosa, que puede ser empleada como relleno y material absorbente (por sus buenos niveles de pureza, baja cristalinidad, blancura, retención de agua y pesos moleculares moderados) (Bicu & Mustata, 2011, 2013).

En la revisión realizada por Mahato et al. (2018) diversos estudios han puesto en evidencia los beneficios para la salud de extractos de residuos cítricos, a su vez las empresas farmacéuticas, la industria alimentaria y la cosmética han manifestado su interés en extraer y purificar compuestos bioactivos de estos residuos para su utilización en productos como aditivos y/o principios activos. Por ejemplo, para la obtención de colorantes alimentarios naturales (Tsitsagi et al., 2018). Se han estudiado los compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico y otros componentes de origen cítrico por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas, cardioprotectoras, neuroprotectoras, nefroprotectoras y antialérgicas promoviendo este tipo de residuos como productos funcionales (Mahato et al., 2018). Asimismo, diferentes compuestos aromatizantes (aceites esenciales) se han empleado en bebidas y otros productos alimentarios, y también se han utilizado en la preparación de perfumes, jabones y otros productos cosméticos (Chavan et al., 2018). Otros productos químicos importantes obtenidos a partir de residuos cítricos son los ácidos orgánicos (principalmente cítrico, succínico, láctico y pirúvico), y fibras (pectina, celulosa, etc.) que se pueden utilizar para

desarrollar polímeros biodegradables para la administración controlada de fármacos y materiales funcionales, así como para la elaboración de envases de alimentos (Mahato et al., 2020).

1.2.1. Residuos de mandarina (*C. Reticulata*) e híbridos

El flavedo, parte de la piel de mandarina, se caracteriza por ser de color naranja en su estado de madurez, aunque según la variedad puede ser de tonos verde-amarillento a naranja-rojizo. El grosor del albedo puede variar afectando al pelado manual del fruto y por ende a su consumo. Organolépticamente el color y grosor de la piel influye en la aceptación de la mandarina por parte del consumidor, y en su empleo en la industria citrícola. Sin embargo, numerosos estudios han puesto en evidencia que esta parte del fruto es la que mayor cantidad de compuestos bioactivos presenta en comparación con la pulpa y el zumo extraído (Agócs et al., 2007; Babazadeh-Darjazi, 2017; Barros et al., 2017). Asimismo, se han evidenciado propiedades saludables de extractos obtenidos de residuos de mandarina, principalmente de la piel, generalmente en referencia a diversas enfermedades de origen oxidativo (véase Tabla 3).

En algunos estudios se ha demostrado un contenido mayor de compuestos bioactivos en residuos de mandarina, comparado con otros cítricos. Por ejemplo, en piel de mandarina se ha determinado mayor cantidad de polifenoles y aceites esenciales, que en piel de lima, limón o naranja (Casquete et al., 2015; Omar et al., 2013). De todos modos, los métodos y protocolos de extracción afectarían directamente a la estabilidad de los compuestos extraídos de este tipo de residuos. En concreto, los residuos de piel, pulpa y semillas de *C. reticulata* y especies derivadas se consideran un sustrato atractivo para la obtención de compuestos con propiedades beneficiosas.

Tabla 3. Estudios de efectos protectores y preventivos de extractos de residuos de mandarina realizados en los últimos 10 años.

Residuo cítrico	Compuesto bioactivo	Efecto	Tipo de estudio	Referencia
Piel de Satsuma (<i>C. unshiu</i>)	Flavonoides	Actividad antitumoral frente a carcinoma renal.	<i>In vivo</i>	Lee et al. (2011)
Piel de <i>C. reticulata</i> Blanco y <i>C. unshiu</i> Marcovich	Flavonoides (nobiletina)	Mejora del aprendizaje y memoria	<i>In vivo</i>	Kawahata et al. (2013)
Piel de <i>C. unshiu</i>	Polifenoles (taninos)	Disminución de colesterol y triglicéridos séricos, y pérdida de grasa visceral	<i>In vivo</i>	Kim et al. (2016)
Piel de <i>C. unshiu</i>	Flavonoides (hesperidina, narirutina)	Proangiogénico, mejora de circulación sanguínea	<i>In vitro</i>	Lee et al. (2016)
Piel de <i>C. reticulata</i> Blanco	Flavonoides	Antiedad, antioxidante	<i>In vitro</i>	Apraj & Pandita, (2016)
Piel de mandarina e híbridos	Flavonoides	Actividad citotóxica en 3 líneas celulares de carcinoma gástrico	<i>In vitro</i>	Wang et al. (2017)
Piel de <i>C. reticulata</i> Blanco	Flavonoides	Antiproliferativo frente a células de carcinoma hepático, mama y colon-rectal	<i>In vitro</i>	Ferreira et al. (2018)
Residuos de <i>C. reticulata</i> Blanco	Polifenoles	Antiproliferativo frente a células de cáncer colon-rectal	<i>In vitro</i>	Esparza-Martínez et al. (2019)

1.3. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE RESIDUOS CÍTRICOS

Desde que se introdujo el primer carotenoide sintético en los años 50 del siglo pasado, el β -caroteno obtenido a partir de β -ionona derivado de acetona y butadieno (Rutz et al., 2016), se ha continuado con el estudio de nuevas y mejores fuentes de obtención de diversos compuestos bioactivos para ser empleados en productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos. Además, durante los últimos años existe un creciente interés por consumir alimentos con propiedades saludables. Al mismo tiempo, en la industria alimentaria hay una tendencia constante hacia la producción de alimentos y obtención de ingredientes alimentarios funcionales de origen natural, con el objetivo de satisfacer esta demanda. Es así como las técnicas de extracción deben garantizar no sólo una mayor recuperación de compuestos, sino también proporcionar extractos que puedan ser utilizados directamente o con el mínimo procesado y que resulten seguros a fin de poder ser empleados en la industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética sin afectar la salud.

En la actualidad existe un interés en encontrar métodos de extracción que faciliten la obtención de compuestos funcionales como polifenoles y carotenoides de fuentes naturales y renovables, que sean aptos para el consumo humano y que la forma de extracción sea respetuosa con el medio ambiente. Putnik et al. (2017b) indican que, para la obtención segura de compuestos bioactivos de residuos de frutos cítricos, se requiere conocer la fuente del compuesto de interés, a fin de seleccionar la variedad y el tejido que mayor contenido tenga. Así como las técnicas y condiciones de extracción deben ser optimizadas según las características de la muestra y los compuestos, para obtener la máxima selectividad. La purificación influye en el aislamiento de los compuestos que, ya sean puros o mezclas caracterizadas, podrían utilizarse por la industria. Para

garantizar el aprovechamiento de los compuestos adicionados a cualquier producto, son necesarios estudios de bioaccesibilidad y biodisponibilidad, así como la interacción de los compuestos obtenidos y otros componentes.

1.3.1. Métodos convencionales y no-convencionales

La extracción convencional con solventes orgánicos es el método más empleado para extraer compuestos bioactivos y su eficiencia depende del solvente elegido. Además, la característica común entre los métodos convencionales es el uso del calor y el largo tiempo de extracción, factores que afectarían al contenido de compuestos presentes en los extractos. Asimismo, emplean solventes orgánicos que afectan a la seguridad de los extractos para el consumo y son considerados dañinos para el medio ambiente (Reddy et al., 2020). Entre los métodos convencionales, el más empleado es la extracción sólido-líquido utilizando cuatro solventes principalmente: acetona, etanol, metanol y agua (Jelley et al., 2016). El Soxhlet, con etanol y metanol como solventes, se ha empleado para la extracción de compuestos fenólicos, sin embargo, tiene como desventaja un tiempo largo de extracción y altas temperaturas que pueden causar hidrólisis y subsecuente degradación de los compuestos (Caldas et al., 2018).

Estos efectos negativos pueden reducirse empleando métodos no-convencionales o *green extraction methods*, para la extracción de compuestos bioactivos. Entre otras ventajas, se caracterizan por emplear cortos tiempos de extracción a temperaturas no muy elevadas favoreciendo el ahorro de energía, requieren menos tiempo, aumentan la transferencia de calor y masa, emplean menor cantidad de solventes orgánicos y permiten extraer con solventes alternativos, la eficiencia de la extracción puede ser mayor con menos unidades

de operación, no son tóxicos y no desnaturalizan los compuestos extraídos (Sharmila et al., 2016).

Una de las consideraciones más importantes en el desarrollo de nuevos procesos y tecnologías para la extracción es la seguridad de los productos finales cuando se utilizan como productos alimentarios (Strati & Oreopoulou, 2011), pues al ser menos agresivos con las muestras vegetales, estas mantendrían sus caracteres organolépticos e incluso nutricionales. Al mismo tiempo y en base al concepto de “*green extraction methods*”, serían respetuosos con el medio ambiente, por minimizar o no emplear solventes orgánicos y por el menor uso de energía. Es así como estos métodos contribuyen a la sostenibilidad medioambiental y a la seguridad alimentaria (Chemat et al., 2019), y por ello se debe continuar con el estudio de su aplicación en fuentes naturales que ofrecen una mayor cantidad de compuestos bioactivos, como son los residuos cítricos. Anticono et al. (2020) revisan las ventajas y resultados de aplicar métodos no-convencionales en residuos cítricos como la extracción asistida por ultrasonidos, microondas, fluidos supercríticos, agua presurizada, pulsos eléctricos, descargas eléctricas de alto voltaje y altas presiones hidrostáticas. En función de los compuestos bioactivos (polifenoles y carotenoides) a extraer a partir de residuos cítricos algunos métodos resultan más convenientes que otros (Tabla 4).

Tabla 4. Métodos de extracción para la obtención de polifenoles y carotenoides de residuos cítricos

Compuestos	Métodos convencionales	Métodos no-convencionales
Polifenoles	líquido-líquido (Maceración) sólido-líquido (Soxhlet)	ultrasonidos microondas fluidos supercríticos agua presurizada líquidos presurizados pulsos eléctricos descargas eléctricas de alto voltaje altas presiones hidrostáticas
Carotenoides	líquido-líquido sólido-líquido (Soxhlet)	ultrasonidos fluidos supercríticos descargas eléctricas de alto voltaje

1.3.2. Ultrasonidos

La extracción asistida por ultrasonidos se emplea para la extracción de compuestos fenólicos, así como de carotenoides por la facilidad del proceso y la mejora de las variables. Durante este proceso se ha descrito una reducción del tiempo de extracción, mayor reproducibilidad, disminución del uso de solventes orgánicos, prevención de la degradación de compuestos termolábiles con una mayor pureza del producto final, y mayor rendimiento de extracción, eliminando el post-tratamiento de las aguas residuales y consumiendo menor energía fósil de la que normalmente es necesaria para un método de extracción convencional (Chemat et al., 2017; Gullón et al., 2021).

Los ultrasonidos consisten en ondas mecánicas que tienen la propiedad de extenderse en un medio elástico, principalmente líquido, que involucran ciclos de alta (compresión) y baja presión (rarefacción) (Gullón et al., 2021). La onda ultrasónica involucra cuatro parámetros físicos: frecuencia (Hz), potencia (W), longitud de onda (cm) e intensidad (W/cm^2) (Khadhraoui et al., 2019). La generación de ondas ultrasónicas involucra el fenómeno de cavitación (Figura 7).

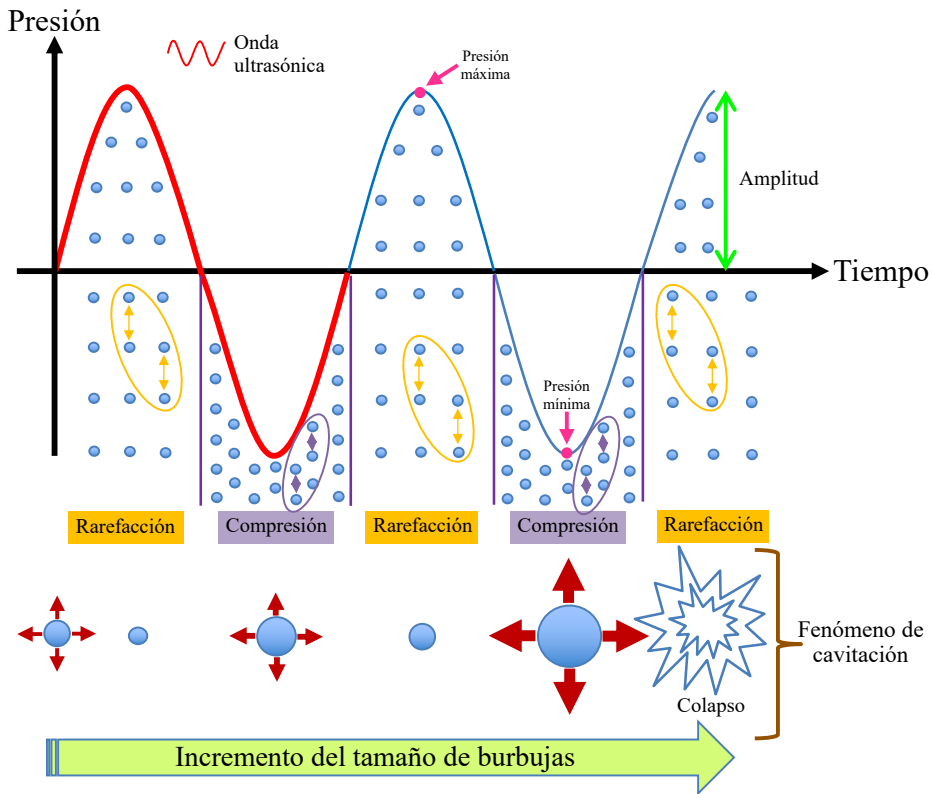


Figura 7. Fenómeno de cavitación producido por las ondas ultrasónicas (compresión y rarefacción) durante el proceso de extracción (adaptado de Khadhraoui et al., 2019).

Durante este fenómeno se crean, agrandan e implosionan microburbujas de vapores o gases disueltos en el medio líquido por la compresión y rarefacción de las moléculas que constituyen el medio. El colapso de las burbujas producidas por cavitación induce el aumento de la temperatura y presión, generando un aumento de energía e incrementando la intensidad acústica eléctrica, dando inicio a un movimiento oscilatorio en la superficie. Las moléculas constitutivas del medio que experimentan la sucesión de fases de compresión y rarefacción pueden desplazarse de su posición de equilibrio. El colapso de las burbujas es asimétrico y genera microchorros y ondas de choque dirigidas hacia la superficie de la matriz, esto facilita la ruptura de la pared celular, generando diversos efectos en

la matriz (fragmentación, erosión, sonoporación, etc) y promueve la liberación del contenido celular proporcionando una excelente difusión del solvente en el medio de extracción (Boukroufa et al., 2017; Chemat et al., 2017; Gullón et al., 2021; Khadhraoui et al., 2019).

Los ultrasonidos han mostrado una buena aplicación comercial y un alto rendimiento por la mejora del proceso de producción, simplicidad, requerir de un mantenimiento de menor costo y ser aplicable a gran escala (Gullón et al., 2021). La optimización del proceso es necesaria dado que la eficiencia de la extracción depende de varios parámetros como la concentración del solvente, el tiempo de sonicación, la temperatura, la relación sólido-solvente, la potencia ultrasónica y la frecuencia. Estos factores también influyen en las estructuras moleculares de los compuestos de interés y, por consiguiente, puede afectar a su rendimiento y sus diferentes actividades biológicas (Gullón et al., 2021). Por ejemplo, se ha observado un aumento de la concentración de carotenoides con el aumento de la intensidad ultrasónica (Boukroufa et al., 2017).

La extracción asistida por ultrasonidos puede aplicarse empleando dos tipos de sistemas: el baño de ultrasonidos y la sonda de ultrasonidos (Figura 8). Ambos sistemas emplean un transductor electromecánico como fuente de energía, siendo los transductores piezoeléctricos los más usados por ser más versátiles y eficientes (Chemat et al., 2017; Gullón et al., 2021).

El baño de ultrasonidos ha sido el equipo más común en la extracción de compuestos bioactivos. Este equipo consta de transductores ultrasónicos adheridos a su base y un generador electrónico que suministra energía eléctrica al transductor, generalmente funcionan a una frecuencia de 40 - 45 kHz y pueden estar equipados con un calentador controlado termostáticamente (Lavilla & Bendicho, 2017), se considera económico y tiene la capacidad de tratar varias muestras simultáneamente. Asimismo, la distribución de la intensidad ultrasónica

ocurre de forma heterogénea en el baño (Rutkowska et al., 2017). Su principal inconveniente es la baja potencia de los ultrasonidos aplicados a la matriz y la baja reproducibilidad del método (Chemat et al., 2017; Gullón et al., 2021). Sin embargo, esta se puede mejorar con el control de temperatura durante la extracción (Lavilla & Bendicho, 2017).

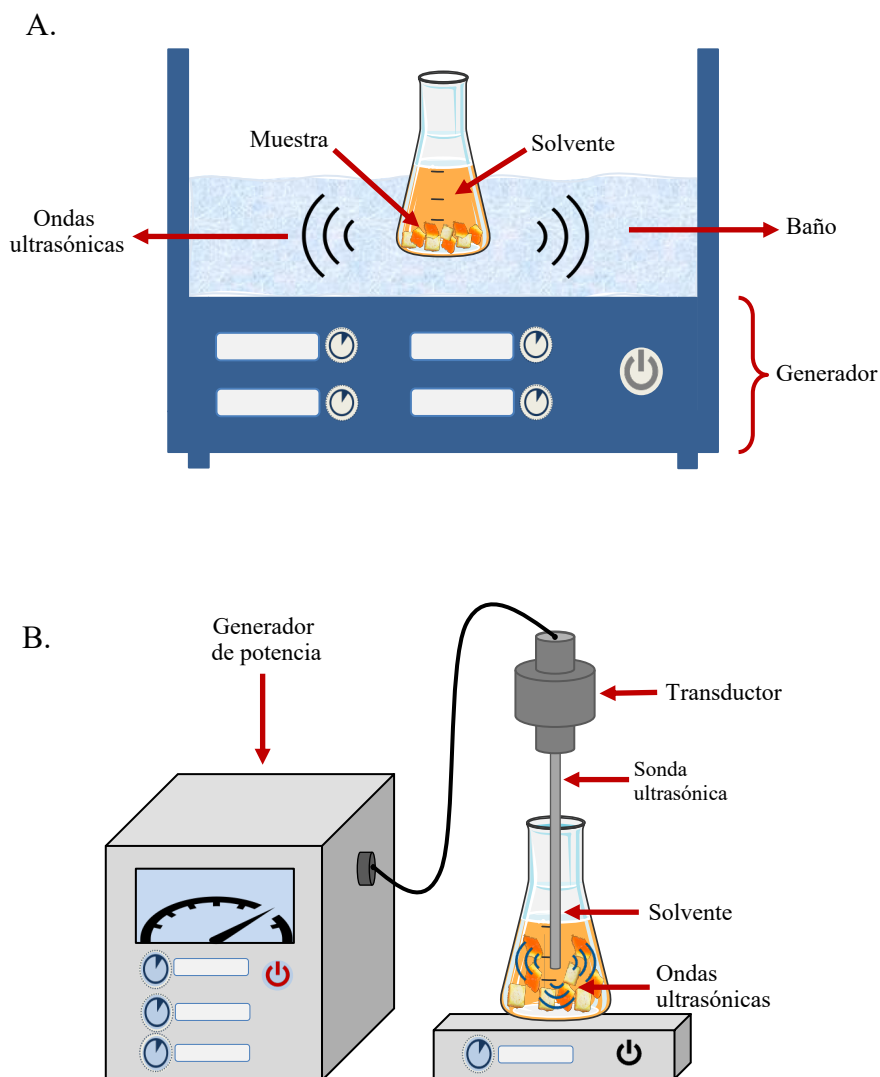


Figura 8. Equipos de ultrasonidos mayormente empleados A. baño de ultrasonidos y B. sonda de ultrasonido (adaptado de Gullón et al., 2021).

La sonda de ultrasonidos incluye un generador, que generalmente funciona a unos 20 kHz y un transductor unido a la sonda, que se sumerge en el recipiente que contiene la materia prima (Chemat et al., 2017; Gullón et al., 2021). En comparación con el baño, la sonda de ultrasonidos es más ventajosa porque la intensidad del ultrasonido se transmite desde la sonda directamente a la muestra, siendo su efectividad hasta 100 veces mayor (Gullón et al., 2021; Rutkowska et al., 2017).

1.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE RESIDUOS DE MANDARINA

Los compuestos bioactivos, como su nombre indica son sustancias que presentan actividad biológica con efectos beneficiosos para la salud. Estas sustancias, de origen vegetal en su mayoría, son sintetizadas en pequeñas cantidades de forma natural como metabolitos secundarios y actúan como agentes protectores frente a microorganismos y otros factores externos (Câmara et al., 2021). Pueden ser de naturaleza hidrófila y lipófila y se suelen clasificar de acuerdo con su estructura química. Los compuestos bioactivos determinados en residuos de mandarina, principalmente la piel, son compuestos fenólicos, carotenoides, aceites esenciales, ácidos orgánicos (ácido ascórbico) y algunos minerales.

1.4.1. Etapas del análisis de compuestos bioactivos

El proceso de extracción es una etapa importante durante la determinación de compuestos bioactivos, ya que es un factor que afecta a la cuantificación y caracterización de estos. Dado que se encuentran en pequeñas cantidades en alimentos y otras fuentes naturales, es necesario el uso de procedimientos de extracción que permitan su recuperación de forma eficiente y que al mismo tiempo eliminen algunos compuestos de poco interés para el estudio que pueden

interferir durante el análisis. Câmara et al. (2021) indican que el análisis de compuestos bioactivos de alimentos involucra cuatro etapas importantes: la preparación de la muestra, la adquisición de los datos, la proyección de los datos y el análisis estadístico de los datos obtenidos (Figura 9), siendo la primera etapa la que mayor tiempo involucra, dependiendo de la matriz a analizar. En el caso de residuos de mandarina y otros cítricos, estas etapas varían en función de los compuestos de interés del estudio.

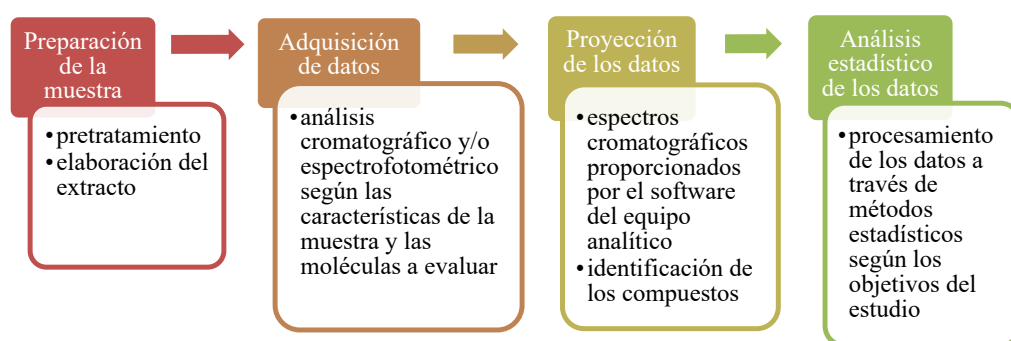


Figura 9. Etapas del análisis de compuestos bioactivos de alimentos.

La etapa de preparación de la muestra involucra procesos de pre-tratamiento y/o la extracción propiamente dicha, así como un posterior proceso de *clean-up* de los extractos. Los residuos cítricos, al tratarse de muestras sólidas, deben someterse a una preparación previa a la extracción. En diferentes estudios se ha observado la reducción del tamaño de partículas en fresco (Ahmad & Langrish, 2012), molido (Nipornram et al., 2018), liofilización (Bashandy et al., 2020), pulverización en seco (Zhang et al., 2018), como pretratamiento de residuos de mandarina. Estos procedimientos permiten preparar la muestra para la posterior extracción y son determinantes para una mayor recuperación de los compuestos mediante el método extractante seleccionado.

Posterior al pre-tratamiento, la naturaleza del método de extracción, al igual que las variables que lo involucran como tiempo, temperatura, tipo de solvente

extractante, y relación muestra/solvente entre otros, influyen en el contenido de compuestos bioactivos extraídos de la muestra, por lo que es necesaria una optimización para reducir todos los factores que puedan interferir en los resultados y mejorar la reproducibilidad del método. Recientemente, las técnicas de extracción para la industria química, alimentaria y farmacéutica han recibido mucha atención debido al aumento de los precios de la energía, las emisiones de CO₂ y otros problemas relacionados con el medio ambiente. Por ello, los métodos clásicos de extracción empleando solventes, también conocidos como métodos convencionales, son reemplazados por el uso de tecnologías no-convencionales que se proponen como métodos con mayores ventajas durante el proceso de extracción. Diversos estudios evidencian una mayor recuperación de compuestos bioactivos de residuos de mandarinas y otros cítricos con el uso de estos métodos no-convencionales que además son más respetuosos con el medio ambiente (Khan et al., 2010; Nipornram et al., 2018; Safdar et al., 2017; Sun et al., 2011).

Dado que los métodos de extracción no suelen ser selectivos, una vez el extracto ha sido preparado se requiere un proceso de fraccionamiento o purificación a fin de eliminar diversas moléculas que interferirían potencialmente en la obtención de los resultados. Este paso se conoce como *clean-up* e incluye la ejecución de un método de purificación para aislar los compuestos de interés que se escoge teniendo en cuenta la naturaleza del extracto, que será seleccionado en función de los compuestos que se pretendan eliminar y de la polaridad de las moléculas a aislar.

Una vez purificado el extracto, se procede a la caracterización y/o cuantificación de los compuestos bioactivos de interés para el estudio. Las técnicas basadas en cromatografía permiten separar los compuestos bioactivos ya que son más específicas y ofrecen datos más detallados que las técnicas espectrofotométricas (Câmara et al., 2021). La cromatografía líquida de alta y

ultra resolución (en sus siglas en inglés HPLC y UHPLC, respectivamente) es más utilizada en extractos de residuos de mandarina para cuantificar compuestos bioactivos. La separación de los compuestos bioactivos se lleva a cabo con un modelo de cromatografía líquida en fase reversa (RP-LC), con el uso de columnas de sílice como octilsilano (C₈), octadecilsilano (C₁₈) y triacontilsilano (C₃₀), cuyos átomos de silicio forman enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo de los compuestos a analizar presentes en la muestra, facilitando la separación (Mahato et al., 2019).

Los detectores acoplados al equipo cromatográfico favorecen la identificación de los compuestos, siendo los más comunes el detector *diode-array* (DAD), el detector de fluorescencia (FD) y la espectrometría de masas (MS). El sistema de análisis por HPLC a menudo está equipado con MS (HPLC-MS) para una rápida y precisa identificación de los compuestos de interés, incluso cuando no se dispone de estándares (Mahato et al., 2019). La cromatografía de gases acoplada a MS (GC-MS) se utiliza con resultados favorables para separar compuestos determinados y provee información más específica como su peso molecular y la presencia de moléculas derivadas. También se ha descrito el empleo de la electroforesis capilar para evaluar la influencia de la exposición a atmósferas de N₂ sobre la expresión génica de la fermentación de etanol en albedo de mandarinas Murcott (*C. reticulata* Blanco) (Shi et al., 2007).

1.4.2. Determinación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles, son metabolitos secundarios de las plantas y se caracterizan por presentar uno o más grupos hidroxilos unidos a uno o más anillos de benceno u otras estructuras aromáticas, variando desde moléculas simples hasta otras más complejas, de alto peso molecular (Figura 10) (Durazzo et al., 2019; Zuurro et al., 2016).


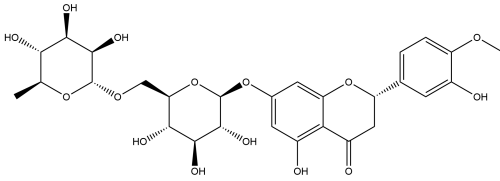
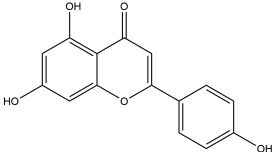
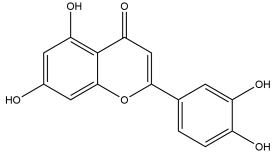
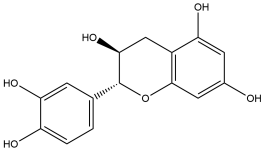
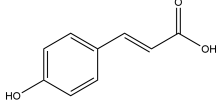
Estructura base de los compuestos fenólicos		
		
Principales compuestos fenólicos en frutos cítricos		
Flavanonas	Hesperidina $C_{28}H_{34}O_{15}$	
Flavonas	Apigenina $C_{15}H_{10}O_5$	
Flavonoles	Quercitina $C_{15}H_{10}O_7$	
Flavanoles	Catequina $C_{15}H_{14}O_6$	
Ácidos fenólicos	Ácido <i>p</i> -cumárico $C_9H_8O_3$	

Figura 10. Estructura de los principales compuestos fenólicos en frutos cítricos (adaptado de Ma et al., 2020).

Se han descrito aproximadamente entre 8000 y 9000 estructuras polifenólicas, por ello son considerados como los compuestos mayoritarios de las plantas (Khan et al., 2018; Tsao, 2010). La forma más común de clasificar los compuestos fenólicos ha sido según su estructura química, agrupándolos en ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides, estilbenos, polímeros fenólicos, lignanos y cumarinas (Craft et al., 2012), sin embargo en los últimos años se ha optado por clasificar a estos compuestos en dos grandes grupos: flavonoides y no

flavonoides (Câmara et al., 2021; Khan et al., 2018) (véase Figura 11). Estos compuestos desempeñan funciones protectoras en las plantas frente a patógenos y depredadores. Asimismo, en diversos estudios se han descrito los efectos protectores y beneficiosos de los polifenoles dado su carácter antioxidante.

Los polifenoles mayoritarios en frutos cítricos son las flavanonas y los ácidos fenólicos (Xi et al., 2014). Sin embargo, es variable en función de la parte del fruto que se va a analizar. Así, se ha observado una mayor concentración de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, en la piel de las mandarinas que en la pulpa y zumo. Estos compuestos suelen estar en forma aglicona o glucósido, que favorece su estabilidad (Kundu et al., 2020; Sammani et al., 2019). Las polimetoxiflavonas (PMF) y los O-glucósidos de flavona y sus agliconas, son los flavonoides más comunes en los cítricos. Las PMF están presentes especialmente en la piel de naranjas dulces y mandarinas silvestres (Wang et al., 2017). Asimismo, el grado de madurez del fruto afecta el contenido de flavonoides en la piel (Zhu et al., 2020), incluso se ha observado que la disminución del aroma puede correlacionarse con la pérdida del contenido de flavonoides como resultado de la muerte celular y envejecimiento de la piel (Jo et al., 2018).

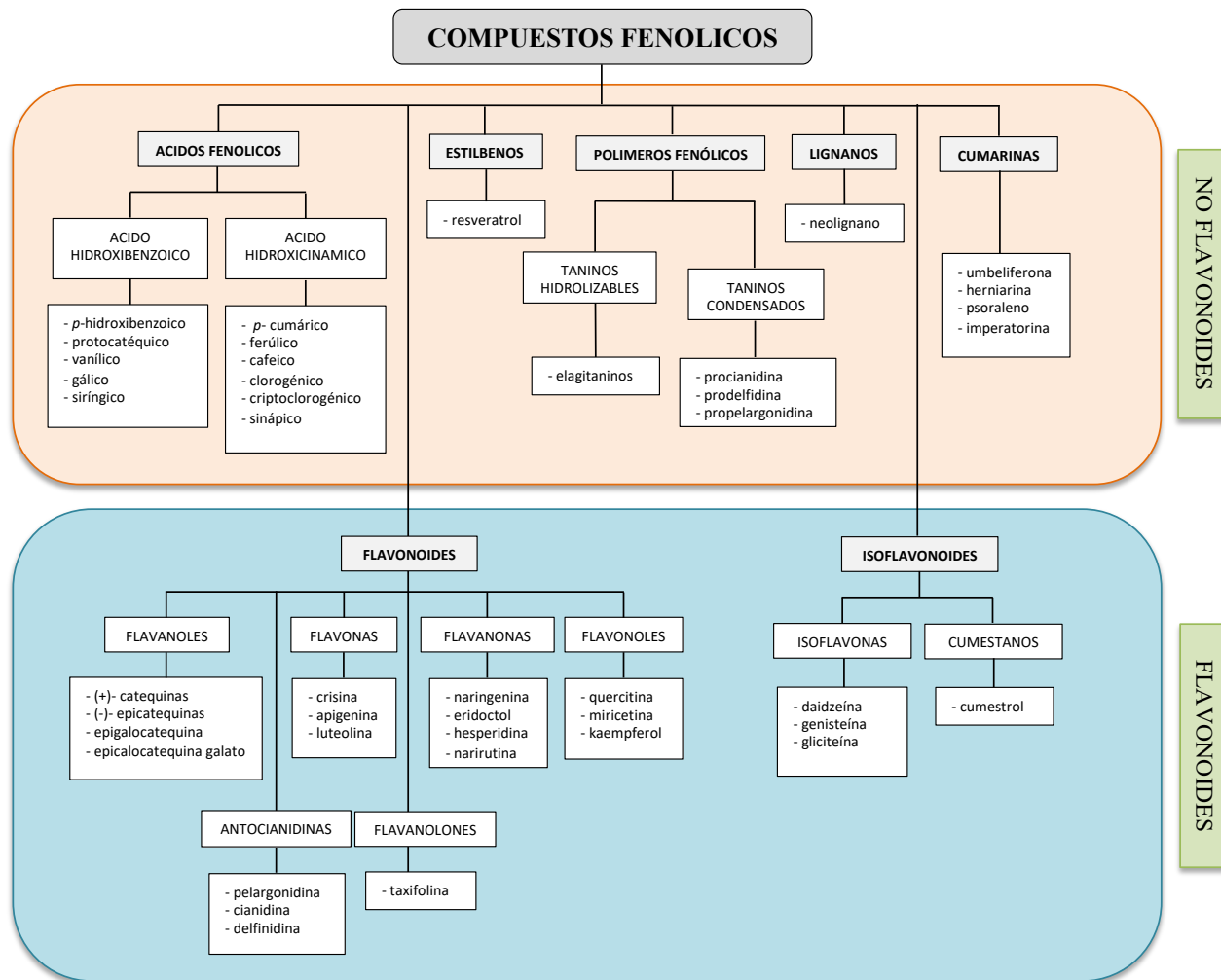


Figura 11. Clasificación de compuestos fenólicos según su estructura.

Durante el proceso de extracción, la solubilidad de los compuestos fenólicos en los solventes a emplear es un factor importante, y generalmente no es muy alta, dada su naturaleza hidrófila. En diversos estudios se ha evidenciado una eficiente extracción de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, empleando etanol, metanol, acetona y acetato de etilo, tanto de forma absoluta o mezclado con agua u otro co-solvente (Barreca et al., 2020; Mahato et al., 2019). Sin embargo, en algunos casos estos solventes no garantizan la seguridad de los extractos en el contexto de seguridad y protección de la salud si se emplean en productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos. Asimismo, solventes como el metanol presentan otras desventajas como un mayor coste de eliminación para disminuir la contaminación propia del proceso de extracción.

Previo al análisis de los compuestos fenólicos en una muestra es necesario realizar un procedimiento de purificación para eliminar compuestos interferentes del extracto y facilitar la identificación de las moléculas fenólicas. La separación por cromatografía de permeación en columna/gel y las técnicas de extracción en fase sólida (EFS) son técnicas comúnmente utilizadas de purificación antes del análisis fenólico.

La cromatografía en columna es una técnica eficaz para aislarlos a gran escala dada su simplicidad durante las separaciones iniciales. Las columnas empleadas son la columna abierta con gel de sílice, gel dextrano reticulado, poliamida y adsorbentes de celulosa. A pesar de que los adsorbentes de sílice favorecen la separación de flavonoides menos polares, es necesario utilizar solventes altamente polares como eluyentes para la purificación de algunos flavonoides glucosilados. Los adsorbentes de gel dextrano reticulado separan los compuestos de acuerdo con sus tamaños moleculares (Reddy et al., 2020).

Durante el proceso para aislar compuestos fenólicos de los extractos aplicando EFS se emplean cartuchos C₁₈ con cantidades de sílice que varían entre 4 - 200

mg (Câmara et al., 2021). Durante el procedimiento se debe acondicionar el cartucho con una serie de solventes, principalmente agua y metanol, para la mayor retención de los compuestos de interés en la fase sólida, mientras las moléculas que interfieren son eliminadas. El fluido suspendido en el cartucho se lava con agua acidificada para eliminar azúcares, ácidos orgánicos y otros componentes solubles en agua. Asimismo, el arrastre de los compuestos fenólicos retenidos se realiza principalmente con metanol que en algunos casos es acidificado. Este extracto fenólico se evapora y redisuelve en el medio adecuado seleccionado para su determinación (Mahato et al., 2019). Recientemente, se han desarrollado nuevos enfoques de extracción y limpieza para simplificar la preparación de las muestras, avanzando hacia análisis más eficientes en términos de cantidad y calidad, y técnicas más respetuosas con el medio ambiente. Una de ellas es el uso del método '*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*' (QuEChERS), que se caracteriza por combinar la extracción líquido-líquido (ELL) (muestra) y la extracción en fase sólida-dispersa (EFD-D) con MgSO₄, amina primaria/secundaria (PSA) y C₁₈, y se propone como una alternativa económica y sostenible (Aguilar et al., 2020).

Para conocer la concentración de cada compuesto fenólico se emplean sistemas de separación que permiten caracterizar y cuantificar estos compuestos. Incluyen cromatografía en columna, HPLC y cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCC) (Mahato et al., 2019). La cromatografía líquida de alta resolución en fase normal (NP-HPLC) utiliza resinas de sílice o alúmina como fase estacionaria, siendo esta última de naturaleza hidrófila. La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), a diferencia del NP-HPLC, emplea una fase estacionaria hidrofóbica, que consiste en cadenas de alquilo unidas covalentemente, que se unen con los compuestos hidrófobos o menos polares de la muestra, que son separados con la fase móvil (Mahato et al., 2018).

La cuantificación y caracterización de compuestos fenólicos de la piel de mandarina se realiza usualmente mediante HPLC con detector *diode-array* (HPLC-DAD) o ultravioleta visible (HPLC-UV/Vis) y acoplada a un espectrómetro de masas (HPLC-MS) es considerada selectiva para analizar flavonoides de residuos cítricos (Londoño-Londoño et al., 2010). En la Tabla 5 se resumen los sistemas cromatográficos utilizados para el análisis de compuestos fenólicos de piel de mandarina realizados durante los últimos 10 años.

Las columnas de fase reversa empleadas para el análisis cromatográfico de los compuestos fenólicos suelen ser de sílice C₁₈ con dimensiones entre 50 - 250 mm de largo × 2,1 - 4,60 mm de diámetro. La elución se realiza mediante sistemas de solventes binarios, empleando metanol o acetonitrilo (puros o acidificados) como solvente orgánico y agua acidificada (ácidos fórmico o acético entre 0,01-5%, v/v) como solvente polar. En un estudio reciente realizado por Gómez-Mejía et al. (2019) se empleó como solvente polar una solución acuosa con ácido trifluoroacético 0,1%, (v/v). La adición de ácido en la fase polar es necesaria para minimizar las colas de los picos que suprimen la ionización de los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos (Câmara et al., 2021).

La cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCC) que se utiliza para extraer y purificar flavonoides emplea sistemas solventes de dos fases, que fluyen simultáneamente en la dirección opuesta. A diferencia de los métodos anteriores, no emplea ninguna matriz de soporte sólido, descartando la pérdida de muestra en la fase sólida. Su uso se describe por primera vez para la purificación de PMF extraídas de piel de mandarina (Wang et al., 2005).

La determinación estructural de compuestos bioactivos extraídos de piel de mandarina emplea técnicas espectroscópicas como ultravioleta visible (UV-Vis) que permiten identificar una amplia gama de compuestos fenólicos como

flavonoides, antocianinas, taninos, cumarinas y ácidos fenólicos. Las técnicas de espectrometría de MS se caracterizan por someter a la molécula orgánica a procesos de ionización y fragmentación. Estos se separan en diferentes tamaños según su relación masa-carga (m/z) de acuerdo con los campos eléctricos y magnéticos. Conociendo la relación m/z , se puede deducir la masa molecular de la molécula original y la fórmula molecular exacta de la misma mediante un análisis de los tipos de fragmentos producidos durante el proceso (Mahato et al., 2019). La espectrometría MS-MS adiciona una detección más permitiendo obtener los datos en dos dimensiones. De hecho los espectros MS y MS-MS, tanto iones positivos como negativos, de los glucósidos de flavonas cítricas tienen patrones de fragmentación característicos, que dependen en gran medida del número o la naturaleza de los residuos glúcidos y sus enlaces C u O-glucosídicos (Barreca et al., 2020). El proceso de separación y purificación llevado a cabo por HPLC-MS se emplea para una identificación rápida y precisa de los compuestos, incluso cuando no se dispone de estándares purificados y ha sido utilizado en muestras de piel de mandarina (Guccione et al., 2016; Li et al., 2012; Londoño-Londoño et al., 2010). Asimismo, la ionización por electropulverización (ESI) es una herramienta de alta eficiencia de ionización para la fragmentación de compuestos fenólicos (Mahato et al., 2019).

El detector más empleado para el análisis de polifenoles de muestras de residuos de mandarina es el *diode-array*. Diversos estudios señalan la detección e identificación de compuestos fenólicos a una longitud de onda entre 240 - 285 nm, como los ácidos fenólicos a 270 - 280 nm (Hayat et al., 2010; Safdar et al., 2017), los grupos de flavonoides pueden definirse entre 280 - 370 nm, flavonas y flavonoles se identifican entre 350 - 365 nm y las antocianinas a 460 - 560 nm (Barreca et al., 2020; Câmara et al., 2021; Singanusong et al., 2015). Se utiliza HPLC con detección por *diode-array* y espectrometría de masas con ionización

por electro-pulverización (HPLC-DAD-ESI-MS/MS) para caracterizar compuestos fenólicos extraídos de tejidos (albedo, flavedo, segmentos de membrana y sáculos de zumo) de mandarina entre otros cítricos, detectándose hasta 7416 señales metabólicas (Wang et al., 2017). Los compuestos mayoritarios en residuos de mandarina son los glucósidos de flavanonas como la hesperidina, detectados a 280 nm (Hayat et al., 2010).

Tabla 5. Sistemas cromatográficos para el análisis de compuestos fenólicos de piel de mandarina.

Sistema cromatográfico	Columna	Fase móvil	Compuestos	Referencia
HPLC-UV 285 nm	C ₁₈ (100 × 4.6 mm d. i., 3,5 μm)	agua acidificada (ác. acético 0,6 %, v/v) metanol	Hesperidina, naritunina	Cheigh et al. (2012)
LC-MS/MS	C ₁₈ (50 × 4.6 mm d. i., 1,8 μm)	agua destilada (amonio formiato 5 mM)/metanol/ácido acético (29.4:70:0.6, v/v/v)		
HPLC-UV/VIS 330 nm	C ₁₈ (250 × 4.6 mm d. i., 5 μm)	agua acetonitrilo	5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona; 6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona; 3-hidroxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona ; 5,6,7,8,3',4' - hexametoxiflavona; 3,6,7,4'-tetrametoxiflavona; 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavone ; 5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona	Han et al. (2012)
HPLC-DAD-ESI/MS 254 nm	SB-Aq (150 × 4.6 mm d. i., 5 μm)	agua acidificada (ácido fórmico 0,5 %, v/v) metanol	Hesperidina, nobiletina, tangeretina	Li et al. (2012)
HPLC-DAD-ESI-MS/MS 200 - 400 nm	C ₁₈ (250 × 4.6 mm d. i., 5 μm)	agua acidificada (ácido fórmico 0,1 %, v/v) acetonitrilo	Polimetoxiflavonas (32)	Zhang et al. (2012)
RP-HPLC-ESI-MS/MS	C ₁₈ (50 × 4.6 mm d. i., 1,8 μm)	agua acidificada (ácido fórmico (0,1 %, v/v) acetonitrilo	compuestos fenólicos (41)	Zheng et al. (2013)

Tabla 5. Continuación

Sistema cromatográfico	Columna	Fase móvil	Compuestos	Referencia
HPLC-UV/VIS 280 nm	C ₁₈ (250 × 4.6 mm d. i., 5 µm)	agua acidificada (ácido acético 0,5%, v/v) acetonitrilo	Hesperidina, naringina	Singanusong et al. (2015)
HPLC	C ₁₈ (250 × 4.6 mm d. i., 5 µm)	metanol agua acidificada (ácido acético 4%, v/v)	Hesperidina	Ma et al. (2015)
HPLC-PDA 200 - 600 nm	C ₁₈ (150 × 4.6 mm d. i., 5 µm)	agua acidificada metanol acetonitrilo	Vicenina-2, naringina, hesperidina, poncirina, sinensetina nobiletina, 3,5,6,7,8,3',4'- heptametoxiflavona, tangeretina	Guccione et al. (2016)
HPLC-MS/MS				
HPLC-UV 285 nm	C ₁₈ (100 × 4.6 mm d. i., 3,5 µm)	agua acidificada (ácido acético 0,5 %, v/v) metanol	Narirutina, naringina, hesperidina, naringenina	Ko et al. (2016)
HPLC-UV/VIS 370 nm (flavonoids) 280 nm (ácidos fenólicos)	C ₁₈ (250 × 4.6 mm d. i., 5 µm)	acetonitrilo agua acidificada (ácido acético 0,1 %, v/v)	Ácido gálico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido cafeico, catequina, epicatequina, hesperidina, naringenina, quercitina, kaempferol	Safdar et al. (2017)
HPLC-UV 280 - 330 nm	C ₁₈ (250 × 4.6 mm d. i.)	acetonitrilo agua acidificada (ácido fórmico 0,4 %, v/v)	Hesperidina, sinesteina, 4',5,7,8- tetrametoxiflavona, nobiletina, tangeretina, 5- <i>O</i> -desmetil nobiletina	Fu et al. (2017)

Tabla 5. Continuación

Sistema cromatográfico	Columna	Fase móvil	Compuestos	Referencia
HPLC-PAD 280 - 330 nm	C ₁₈ (250 × 4.6 mm d. i., 5 µm)	acetonitrilo agua acidificada (ácido acético 0,5%, v/v)	Narirutina, hesperetina, hesperidina, didimina, luteolina , naringenina , naringina, sinensetin, 5,7,40- trimetoxiflavona, nobiletin, 3,5,6,7,8,30,40, hetametoxiflavona, tangeretina, 5- demetillnobiletina	Hu et al. (2017)
ULPC-DAD-LC- ESI-MS/MS 200 - 500 nm	C ₁₈ (150 × 2.1 mm d. i.)	agua acetonitrilo	Compuestos fenólicos (39)	Wang et al. (2017)
HPLC-UV/VIS 280 nm	C ₁₈ (250 × 4.6 mm d. i., 5 µm)	agua acidificada (ácido acético 0,5 %, v/v) acetonitrilo	Hesperidina	Nipornram et al. (2018)
HPLC-PDA 200 - 600 nm	C ₁₈ (250 × 4.6 mm d. i., 5 µm)	agua acidificada (ácido fórmico 5%, v/v) metanol	Hesperidina, naringina, tangeretina, rutina, quercitina, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido ferúlico, naringenina, hesperitina	Ferreira et al. (2018)
UHPLC-UV	C ₁₈ (75 × 2.0 mm d. i., 2,2 µm)	acetonitrilo agua acidificada (ácido fórmico 0,1%, v/v)	Hesperidina	Xu et al. (2019)
UPLC-qTOF-MS- UV 220 - 600 nm	T ₃ (100 × 1.0 mm d. i., 1,8 µm)	agua acidificada (ácido fórmico 0,1%, v/v) acetonitrilo acidificado (ácido fórmico 0,1 %, v/v)	Flavonoides (40), polimetoxiflavonas (7), conjugados de ácido cinámico (4), cumarinas (14)	Fayek et al. (2019)

Tabla 5. Continuación

Sistema cromatográfico	Columna	Fase móvil	Compuestos	Referencia
cLC-DAD 220 - 365 nm	C ₁₈ (150 × 0,3 mm d. i., 4 μm)	acetonitrilo agua acidificada (ácido trifluoroacético 0,1 %, v/v)	Ácido p-cumárico, ácido <i>trans</i> -ferúlico, hesperidina, rutina	Gomez-Mejia et al. (2019)
LC-MS/MS-QqQ-UV/VIS	C ₁₈ (150 × 3 mm d. i., 4 μm)			
HPLC-DAD 326 nm	C ₁₈ (150 × 3 mm d. i., 3 μm)	agua acetonitrilo	Nobiletina 3.5.6.7.8.3',4'-heptametoxiflavona tangeretina	Long et al. (2019)
LC-ESI-MS				
UPLC-qTOF-MS	C ₁₈ (100 × 2.1 mm d. i., 1,7 μm) C ₁₈ (100 × 2.1 mm d. i., 1,8 μm)	agua acetonitrilo	Compuestos fenólicos (92)	Luo et al. (2019)
UHPLC-QqQ-MS	C ₁₈ (100 × 2.1 mm d. i., 1,8 μm)	agua acidificada (ácido fórmico (0,1%, v/v) metanol	Ácido clorogénico, ácido caféico, ácido ferúlico, narirutina rutina, hesperidina, quercitina, didimina, sinestenía, nobiletina, tangeretina	Zhao et al. (2019)

Tabla 5. Continuación

Sistema cromatográfico	Columna	Fase móvil	Compuestos	Referencia
UPLC-PDA 330 nm (PMF) 283 (flavonoids)	C ₁₈ (100 × 2.10 mm d. i., 1,70 μm)	agua acidificada (ácido fórmico 0,01 %, v/v) metanol	Hesperidina, naringina, eriocitrina, neohesperidina, nobiletina, tangeretina,, 5-OH-6,7,8,3',4'- pentametoxiflavona, sinensetina, isosinensetina, 5,6,7,4'- tetrametoxiflavona, 3,5,6,7,8,3',4'- heptametoxiflavona	Chen et al. (2020)
HPLC-UV-DAD 283 - 360 nm	C ₁₈ (250 × 4.6 mm d. i., 5 μm)	agua acidificada (ácido acético 1%, v/v) metanol	Hesperidina, narirutina, rutina, ácido clorogénico, 5-hidroximetilfurfural	Šafranko et al. (2021)

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; UV: ultravioleta; d.i.: diámetro interno; VIS: visible; DAD: diode array; ESI: ionización por electropulverización; MS: masas; RP: fase reversa; PDA: foto diodo array; UPLC: cromatografía líquida de ultra resolución; LC: cromatografía líquida; qTOF: cuadrupolo tiempo-de-vuelo; cLC: cromatografía líquida capilar; QqQ: triple-cuadrupolo; SB-Aq: ligandos de alquilo enlazados en fase reversa; C₁₈: octadecilsilano; T3: trifuncionalidad.

1.4.3. Determinación de carotenoides

Los carotenoides son pigmentos liposolubles naturales metabolizados por plantas, algas y bacterias fotosintéticas, que juegan un papel muy importante durante la fotosíntesis y el proceso de fotoprotección. Se ha demostrado que una dieta rica en carotenoides tiene efecto protector contra algunos tipos de cáncer (Sharoni et al., 2012), degeneración macular relacionada con la edad, formación de cataratas (Meyers et al., 2014; Rao & Rao, 2007) y enfermedades cardiovasculares (Sun et al., 2018) debido a su actividad antioxidante. Algunos de ellos son carotenoides con carácter de provitamina A que pueden prevenir enfermedades graves como ceguera nocturna, susceptibilidad a las infecciones, piel escamosa y retraso en el desarrollo de los dientes y los huesos (Amorim-Carrilho et al., 2014). Estas propiedades hacen muy interesante su aprovechamiento en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

En la industria alimentaria los carotenoides son empleados como colorantes y aditivos alimentarios (Mahato et al., 2019; Murador et al., 2019). Debido a su carácter antioxidante, previenen la formación de radicales libres preservando la calidad y la vida útil de los productos alimenticios durante el almacenamiento y su posterior la manipulación (Costanzo et al., 2020).

El comportamiento antioxidante de los carotenoides se debe a su sistema de más de 10 enlaces de π -electrones conjugados los cuales además les confieren sus propiedades pigmentarias (Jomova & Valko, 2013; Martins & Ferreira, 2017). Específicamente su estructura está compuesta por cadenas terpenoides de enlaces dobles y simples de hasta 40 carbonos construidas a partir de 8 unidades de isoprenoides unidos por el centro de la molécula (Nakamura & Sugiura, 2019) (Figura 12). Esta estructura les permite estabilizar los electrones desapareados y por ello, eliminar el oxígeno singlete y radicales peroxilo. Así, a mayor número

de dobles enlaces conjugados mas capacidad antioxidante (Kaulmann & Bohn, 2014).

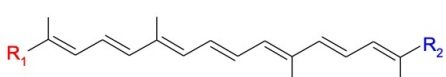
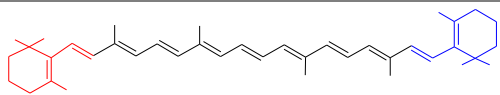
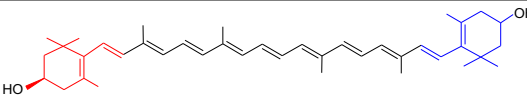
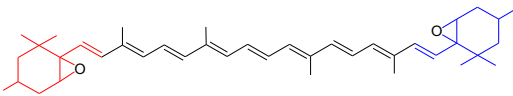
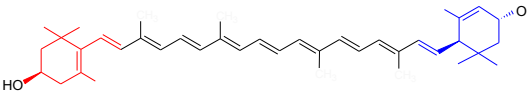
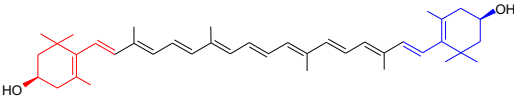
Estructura base de los carotenoides		
		
Principales carotenoides en frutos cítricos		
β-caroteno β,β-Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	
β-criptoxantina β,β-Caroteno-3-ol	C ₄₀ H ₅₆ O	
Violaxantina β,β-caroteno-3,3'-diol	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	
Luteína β,ε-Caroteno-3,3'-diol	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	
Zeaxantina β,β-Caroteno-3,3'-diol	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	

Figura 12. Estructura de los principales carotenoides en frutos cítricos (Adaptado de Amorim-Carrilho et al., 2014; Meléndez-Martínez, 2017).

Existen alrededor de 600 a 700 compuestos carotenoides conocidos en la naturaleza, los cuales se han clasificado en dos grupos (Figura 13): xantófilos o carotenoides oxigenados, que contienen oxígeno como grupo funcional y carotenoides hidrocarbonados (carotenos) (Mahato et al., 2019; Saini & Keum, 2018). Entre ambos, los xantófilos son los más complejos por el número de compuestos y variaciones en su estructura; se pueden encontrar en su forma libre o en forma esterificada con ácidos grasos más estables como mono-xantófilos o xantófilos poli-hidroxilados (Giuffrida et al., 2020; Murillo et al., 2013). Estos compuestos también pueden clasificarse según el número de anillos en su molécula, así se tienen carotenoides acíclicos, monocíclicos y

bicíclicos (Regal et al., 2020). De todos los carotenoides presentes en la naturaleza solo 50 tienen carácter de provitamina A, aproximadamente 40 son ingeridos en nuestra dieta (Kiokias et al., 2016) siendo los principales el α -caroteno, β -criptoxantina y β -caroteno, que es el que mayor actividad provitavíminica presenta (Amorim-Carrilho et al., 2014).

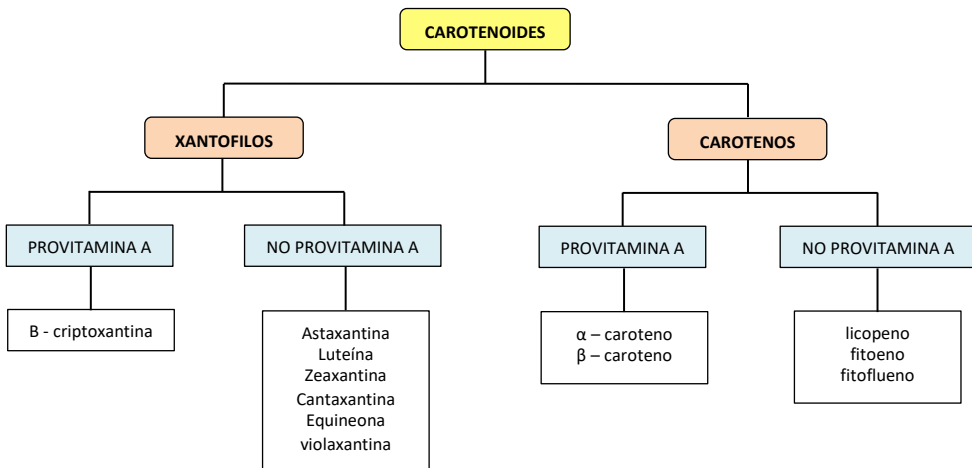


Figura 13. Clasificación de compuestos carotenoides según su estructura.

El contenido de carotenoides en muestras vegetales depende de 3 factores principales: la post-cosecha, el procesado de alimentos y el almacenamiento, con diferentes variables en cada etapa como el tiempo, temperatura, tratamiento térmico o no-térmico entre otros, sin embargo, el almacenamiento a largo plazo es el factor que mayor pérdida puede causar en el contenido de carotenoides (Nagarajan et al., 2017). Se han realizado diversos estudios para favorecer la acumulación de carotenoides en el flavedo de los cítricos como la conservación de los frutos con CO₂ (Lu et al., 2020), e incluso el uso de etileno más tratamientos con diodo emisor de luz roja que es eficaz para aumentar el contenido de β -criptoxantina y luteína en el flavedo de frutos cítricos (Ma et al., 2015). El contenido de carotenoides es mayor en la piel (flavedo) de los cítricos,

comparado con la pulpa o el zumo (Mahato et al., 2019), por ejemplo los carotenoides totales en piel de mandarinas varían de 25 a más de 300 $\mu\text{g/g}$ de piel (peso fresco) mientras que en la pulpa el contenido va de 10 a 40 $\mu\text{g/g}$ de pulpa (peso fresco). Asimismo, se encuentra mayor cantidad de carotenoides en los híbridos de mandarina que en las mandarinas comunes (Lado et al., 2016). En un estudio reciente se determinó mayor cantidad de carotenoides totales en piel de *C. Clementina*, comparado con piel *C. Reticulata* que sería la mandarina común (Costanzo et al., 2020). Los carotenoides son responsables de los diversos colores de los cítricos que van del amarillo al rojo durante la madurez y son los colorantes de origen natural preferidos para los alimentos, tanto en la industria agroalimentaria como por los consumidores (Zema et al., 2018). El color verde de la piel de los cítricos durante la primera etapa de crecimiento del fruto se debe principalmente al contenido de clorofila que posteriormente disminuye conforme el fruto alcanza la madurez y se incrementa la presencia de carotenoides (Mahato et al., 2019). Asimismo carotenoides como la β -criptoxantina, son más abundantes en frutos cítricos que otras frutas y vegetales, y pueden ser mejor absorbidos, que los carotenoides de tomates y verduras (Zhu et al., 2016).

Saini & Keum (2018) mencionan que para la extracción de carotenoides es necesario primero romper las paredes celulares de la muestra, facilitando la disociación de estos compuestos con proteínas o ácidos grasos y favoreciendo la transferencia de los carotenoides al solvente extractante. Determinados procedimientos físicos, químicos o biológicos de extracción o procesado de la muestra, facilitan esta acción y favorecen el rendimiento del extracto. La elección del solvente es un factor crítico para el proceso de extracción, solventes como la acetona y etanol son más afines a compuestos carotenoides polares (xantófilas) como violaxantina, luteína, y neoxantina, y por el contrario el hexano y acetato de etilo son más afines para carotenoides no polares (carotenos) como β -caroteno,

α -caroteno, y licopeno (Regal et al., 2020). Shukla & Thorat (2016) mencionan que el acetato de etilo es el mejor solvente para extraer carotenoides de la piel de los cítricos, seguido del etanol al 90%. Asimismo, se ha descrito una mayor extracción de *all-trans*- β -caroteno con acetato de etilo comparado con etanol y hexano (Sun et al., 2011). Por ello se utiliza más de un solvente a la vez y así se asegura el máximo rendimiento de compuestos polares y no polares en un mismo extracto. Por ejemplo mezclas como hexano:acetona:etanol (50:25:25, v:v:v) se aplica en residuos cítricos como piel de mandarina (*C. unshiu*) (Barman et al., 2020; Ma et al., 2017, 2018; Wang et al., 2008), asimismo, se emplean mezclas de isopropanol con éter de petróleo, acetona y hexano, así como dietil-éter con metanol (Mahato et al., 2019). Otro aspecto importante es que los carotenoides de los extractos deben protegerse del oxígeno presente en el ambiente, por lo que se recomienda el uso de un antioxidante, como el butilhidroxitolueno (BHT) adicionado a los solventes durante la extracción de carotenoides (Amorim-Carrilho et al., 2014).

Aunque los solventes orgánicos son efectivos para la extracción de compuestos bioactivos, su aplicación en la industria alimentaria no está aconsejada, ya que tienen su origen en fuentes no renovables (petróleo), son tóxicos, afectan el medio ambiente y su eliminación además de costosa, requiere de un máximo control. En un estudio reciente se propone el uso de solventes menos contaminantes, como los líquidos iónicos para la extracción de carotenoides de piel de naranja (*C. sinensis*), que proporcionan extractos con mejor rendimiento y más seguros para su empleo en la industria alimentaria, entre otras (Murador et al., 2019).

Una vez obtenido el extracto, y dado que éstos suelen contener compuestos complejos estructuralmente, es necesario realizar un proceso de saponificación. Este procedimiento facilita el análisis dado que permite eliminar componentes de

poco interés que perjudicarían los resultados, como clorofilas y triacilglicéridos, favoreciendo la liberación de xantófilos esterificados (Giuffrida et al., 2020; Regal et al., 2020). Asimismo, la saponificación no sólo simplifica la separación cromatográfica, también proporciona información sobre la naturaleza y distribución de los carotenoides en una matriz. La saponificación con hidróxido de potasio (KOH)-metanólico (10 - 30%) a temperatura ambiente en la oscuridad durante un tiempo prolongado, es el método de mayor eficacia para el fraccionamiento de compuestos carotenoides unidos a otros compuestos en extractos de piel de mandarina y otros cítricos (Agócs et al., 2007; Ma et al., 2017, 2018; Saini et al., 2021; Yoo & Moon, 2016). Sin embargo la tendencia reciente es analizar extractos de carotenoides sin realizar previamente la saponificación, con el fin de determinar la composición original de los carotenoides (Giuffrida et al., 2020).

La elección del sistema de cromatografía líquida más adecuado para una separación de carotenoides está muy relacionada con la matriz a analizar, desde sistemas de fase normal (NP-HPLC) para la separación simple de xantofilas hasta sistemas de fase reversa (RP-HPLC) empleados para las separaciones de carotenoides, incluidos isómeros geométricos y formas esterificadas. La técnica más empleada para el análisis de carotenos de extractos de piel de cítricos es el HPLC acoplada a un detector UV-Vis. Sin embargo, el HPLC-MS es una técnica empleada en los últimos años con resultados favorables para caracterizar carotenoides y sus derivados en muestras vegetales (Giuffrida et al., 2020), aunque los estudios con muestras de residuos de mandarina son escasos. La fase estacionaria usada con frecuencia durante el análisis de carotenoides de muestras de piel de mandarina suele ser columnas de C₁₈, que ofrecen un menor tiempo de análisis comparado con las columnas C₃₀. Sin embargo, ésta tiene mayor hidrofobicidad favoreciendo una mejor interacción con los carotenoides,

empleando metanol, metil-ter-butil éter (MTBE) y agua en gradiente de elución como fases móviles. Por su parte Saini et al. (2021) mencionan que las fases móviles más apropiadas para el análisis de carotenoides serían el metanol y el acetonitrilo debido a su alta solubilidad y baja contrapresión, protegiendo las columnas (Tabla 6).

Para la caracterización y cuantificación de carotenoides es necesario determinar la máxima longitud de onda para la absorción espectrofotométrica UV-Vis, la naturaleza de los grupos funcionales y la conjugación de dobles enlaces de los compuestos. Además, es muy importante tener en cuenta la polaridad de los compuestos de interés y el uso de patrones estándar, ya que constituyen un factor determinante en el momento de la cuantificación (Nagarajan et al., 2017). Dependiendo de las diversas fuentes de ionización que se emplean como interfaz en la HPLC-MS, la eficiencia del análisis se puede mejorar en términos de sensibilidad, lo que permite un análisis de mayor rendimiento. Una de las fuentes de ionización empleada para la fragmentación de moléculas de carotenoides con resultados eficientes es la ionización química a presión atmosférica (APCI), que proporciona una mayor sensibilidad de los iones cargados y por ello se ha convertido en la técnica más utilizada para el análisis de compuestos carotenoides tanto hidrocarbonados como xatófilos (Giuffrida et al., 2020; Mahato et al., 2019). La fragmentación de carotenoides (incluidos los ésteres de ácidos grasos) producidos en la fuente de ionización (a menudo APCI) pueden detectarse con un analizador de masas de un solo cuadrupolo. El cuadrupolo simple (Q) es probablemente el más común espectrómetro de masas utilizado en los análisis de carotenoides y se caracteriza por ser robusto y sensible, aunque tiene una resolución limitada. Mientras que el triple cuadrupolo (QqQ) y la trampa de iones (IT) proporcionan más información (Giuffrida et al., 2020). El empleo de cromatografía multidimensional ofrece importantes

alternativas (Regal et al., 2020). Recientemente Murador et al. (2019) publicaron el uso de HPLC-DAD-MS acoplado a APCI como fuente de ionización con resultados favorables para caracterizar carotenoides de piel de naranja.

Tabla 6. Sistemas cromatográficos para el análisis de carotenoides de piel de mandarina.

Sistema cromatográfico	Columna	Fase móvil	Compuestos	Referencia
HPLC-DAD-APCI-MS	C ₃₀ YMC (250 × 4.6 mm d.i., 5 μm)	metil tert-butil éter Metanol	β-criptoxantina, ζ-caroteno, todo- <i>trans</i> -luteína, todo- <i>trans</i> -β-caroteno, todo- <i>trans</i> -β-criptoxantina, violaxantina	Matsumoto et al. (2007)
HPLC-DAD 300 - 510 nm	C ₁₈ (250 × 4.6 mm d. i., 5 μm)	metanol 88 %, metanol 100 % diclorometano/metanol (30:70, v/v)	Compuestos carotenoides (18)	Agócs et al. (2007)
RP-HPLC-UV 450 nm	C ₁₈ (250 × 4.0 mm d. i., 5 μm)	acetonitrilo, metanol diclorometano	Luteína, zeaxantina, β-criptoxantina, β-caroteno	Wang et al. (2008)
HPLC-DAD	C ₃₀ YMC (250 × 4.6 mm d. i., 5 μm)	metil tert-butil éter metanol	Fitoeno, ζ-caroteno, β-caroteno, β-criptoxantina, zeaxantina, 9- <i>cis</i> -violaxantina, todo- <i>trans</i> -violaxantina, R-caroteno, luteína	Matsumoto et al. (2009)
HPLC-DAD	C ₃₀ YMC (250 × 4.6 mm d. i., 5 μm)	metanol metanol 80 % (0,2 % acetato de amonio) metil tert-butil éter	9- <i>cis</i> -violaxantina, luteína, violaxantina, β-criptoxantina, zeaxantina, fitoneo, fitoflueno, ζ-caroteno, β-caroteno, α-caroteno	Zhou et al. (2010)
HPLC- 455 - 480 nm (detector dual)	C ₃₀ YMC (250 × 4.6 mm d. i., 5 μm)	metanol diclorometano	Todo- <i>trans</i> -β-caroteno	Sun et al. (2011)
HPLC	C ₁₈ (300 × 3.9 mm d. i., 10 μm)	acetonitrilo metanol	β-criptoxantina, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina	Yoo & Moon (2016)
HPLC-UV-VIS	C ₁₈ (150 × 4.6 mm d. i., 5 μm)	metanol, acetonitrilo. trietilamina	Luteína	Saini et al. (2021)
HPLC 455 nm	RP-18 (250 × 4 mm d. i., 5 μm)	metanol, tetrahidrofurano, agua	β-caroteno	Barman et al. (2020)

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; DAD: *diode array*; APCI: ionización química a presión atmosférica; MS: masas; RP: fase reversa; UV: ultravioleta; VIS: visible; C₃₀: trimetilmonoclorosilano; d.i.: diámetro interno; C₁₈: octadecilsilano; RP-18: octadecilsilano en fase reversa.

1.5. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante denota la capacidad de un compuesto bioactivo para mantener la estructura y función celular eliminando eficazmente los radicales libres, inhibiendo las reacciones de peroxidación lipídica y previniendo otros daños oxidativos (Zou et al., 2016). En residuos cítricos los principales compuestos antioxidantes son los polifenoles y carotenoides. Otro compuesto responsable de la actividad antioxidante de los extractos de cítricos es la vitamina C, bloqueador natural de radicales libres, ya que puede eliminar de manera efectiva una variedad de especies reactivas del oxígeno (ROS) eliminando el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y reduciendo los radicales de azufre (Zou et al., 2016). Abeysinghe et al. (2007) mencionan que la vitamina C es el principal contribuyente a la capacidad antioxidante total de la mandarina (80,5%). Su contenido es mayor en la piel de mandarina y ligeramente menor en las partes comestibles disminuyendo a medida que avanza la madurez del fruto (Alós et al., 2014).

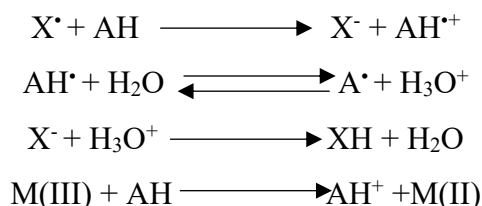
Los métodos empleados para evaluar la capacidad antioxidante de estos extractos se clasifican según el mecanismo de reacción en métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y métodos basados en la transferencia de electrones (ET) (Zulueta et al., 2009). Los principales métodos *in vitro* utilizados en muestras de cítricos son la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) del grupo HAT y, la capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC) empleando el radical ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) ($\text{ABTS}^{+\cdot}$) y el ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP) del grupo ET. El método que utiliza el radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH^{\cdot}) presenta mecanismos tanto de HAT como de ET (Zou et al., 2016).

En los métodos tipo HAT la reacción sería:



Siendo X^{\bullet} el radical libre y AH el antioxidante, y como resultado el radical A^{\bullet} es menos estable que el inicial.

Mientras que en la reacción tipo ET la transferencia de electrones reducen radicales libre, metales entre otros compuestos:



Donde X^{\bullet} es el radical libre y AH el antioxidante que posee poder reductor de metales, carbonilos y radicales libres (Prior et al., 2005).

El método ORAC determina la disminución de la fluorescencia de una proteína como consecuencia de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causado por una fuente de radicales peroxilo (ROO^{\bullet}) (Zulueta et al., 2009). Con extractos cítricos generalmente se emplea el radical 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (Ahmad & Langrish, 2012; Apraj & Pandita, 2016). El método TEAC se basa en la habilidad de los compuestos de la muestra para eliminar el radical $ABTS^{\bullet+}$. La reacción basada en la pérdida del color del radical (normalmente verde azulado) en contacto con la muestra, permite determinar la cantidad de compuestos antioxidantes presentes por los valores de absorbancia obtenidos (Zulueta et al., 2009). El método FRAP mide la reducción del 2,4,6-tripiridil-s-triacina férrica (TPTZ) por acción de los compuestos antioxidantes de las muestras, que parece estar relacionado principalmente con el grado de hidroxilación y de conjugación en los polifenoles (Prior et al., 2005). El radical DPPH $^{\bullet}$ es uno de los pocos radicales de nitrógeno orgánico estables y tiene un color

púrpura intenso. El ensayo se basa en la reducción del color del radical debido a la adición de la muestra y es cuantificable por la absorbancia de los espectros por la pérdida de color (Prior et al., 2005).

La elección del método depende de la naturaleza de los compuestos, ya que unos métodos son más afines a moléculas hidrofóbicas y otros a moléculas hidrofílicas; por ejemplo Müller Fröhlich & Böhm (2011), indicaron que los carotenoides no son adecuados para eliminar el radical DPPH[•]. Asimismo, debido a los dos mecanismos de reducción observados en los métodos (HAT y ET), se recomienda la aplicación de dos a más métodos en un mismo estudio para así tener una información más completa, tanto de antioxidantes con habilidad de transferencia de hidrógeno y otros más afines de transferencia de electrones. En diversos estudios se emplean dos a más métodos para determinar la actividad antioxidante de extractos de piel de mandarina (Apraj & Pandita, 2016; Hayat et al., 2009, 2010; Safdar et al., 2017; Singanusong et al., 2015; Zhu et al., 2020). El uso de un estándar antioxidante en diferentes concentraciones para obtener una recta de calibrado también es necesario. El estándar más empleado suele ser el ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX), un análogo hidrosoluble de vitamina E, calculando la actividad antioxidante en Trolox equivalente (Buniowska et al., 2015; Canan et al., 2016); en otros estudios también se ha empleado el ácido ascórbico como estándar antioxidante (Goulas et al., 2012). Para expresar resultados de capacidad antioxidante también se utiliza el valor IC₅₀, definido como la concentración del antioxidante que reduce el 50% del radical (Chen et al., 2013). En la Tabla 7 se resumen los métodos empleados para determinar la capacidad antioxidante de muestras de piel de mandarinas durante los últimos 10 años.

Tabla 7. Métodos empleados para determinar la capacidad antioxidante en residuos de mandarina.

Muestra	Método	Estándar antioxidante	Expresión de resultados	Referencia
Piel de mandarina	ORAC	TE	$\mu\text{M TE}/100\text{g}$	Ahmad & Langrish (2012)
Piel de <i>C. reticulatae</i> Blanco, cv. Ponkan	DPPH FRAP	TE	$\mu\text{M TE}/100\text{g}$	Barros et al. (2012)
Piel de <i>C. reticulatae</i> Blanco cv. Sainampueng	DPPH TEAC FRAP	NI TE	IC_{50}	Singanusong et al. (2015)
Piel de mandarina Kjooll (<i>C. unshiu</i> Marcow)	TEAC DPPH	Ácido ascórbico	$\text{IC}_{50}(\text{mg}/100\text{g})$	Yoo & Moon (2016)
Piel de <i>Citrus reticulatae</i> Blanco	TEAC ORAC DPPH FRAP	TE	$\mu\text{M TE}/\text{g}$	Esparza-Martínez et al. (2016)
Piel de mandarina Kinnow (<i>C. reticulatae</i> L.)	FRAP DPPH MERS	NI Ácido ascórbico	$\text{mM}/100\text{g}$ % Inhibición	Safdar et al. (2017)
Piel de <i>C. reticulatae</i>	DPPH FRAP	NI	% Inhibición	Boudries et al. (2017)
Piel de <i>C. unshiu</i>	DPPH TEAC	TE	$\mu\text{M TE}/\text{L}$	Hu et al. (2017)
Piel de <i>C. reticulatae</i>	TEAC	TE	$\text{Mmol TE}/100\text{g}$	Ferreira et al. (2018)
Piel de <i>C. reticulatae</i> Blanco	DPPH	NI	% Inhibición	Hu et al. (2019)
Piel de <i>C. reticulatae</i> Blanco	TEAC DPPH FRAP	TE	$\mu\text{mol TE}/\text{g}$	Chen et al. (2020)
Hojas de <i>C. clementina</i>	TEAC DPPH FRAP β -caroteno	Ácido ascórbico BHT NI	$\text{IC}_{50}(\mu\text{g}/\text{mL})$ $\mu\text{M Fe(II)}/\text{g}$ $\text{IC}_{50}(\mu\text{g}/\text{mL})$	Leporini et al. (2020)

DPPH: método de eliminación del radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo; ORAC: método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno; TEAC: capacidad antioxidante equivalente de Trolox; FRAP: método de poder antioxidante reductor férrico; MERS: método de eliminación del radical superóxido; NI: no se indica; BHT: butil-hidroxi-tolueno; TE: trolox equivalente; IC_{50} : concentración del antioxidante que reduce el 50% del radical.

1.6. BIBLIOGRAFÍA

- Abeysinghe, D.C., Li, X., Sun, C., Zhang, W., Zhou, C., & Chen, K. (2007). Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, 104(4), 1338–1344.
- Agócs, A., Nagy, V., Szabó, Z., Márk, L., Ohmacht, R., & Deli, J. (2007). Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), 390–394.
- Aguiar, J., Gonçalves, J.L., Alves, V.L., & Câmara, J.S. (2020). Chemical Fingerprint of Free Polyphenols and Antioxidant Activity in Dietary Fruits and Vegetables Using a Non-Targeted Approach Based on QuEChERS Ultrasound-Assisted Extraction Combined with UHPLC-PDA. *Antioxidants*, 9(4), Article 305.
- Ahmad, J., & Langrish, T.A.G. (2012). Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 162–174.
- Ahmed, D., Comte, A., Curk, F., Costantino, G., Luro, F., Dereeper, A., Mournet, P., Froelicher, Y., & Ollitrault, P. (2019). Genotyping by sequencing can reveal the complex mosaic genomes in gene pools resulting from reticulate evolution: A case study in diploid and polyploid citrus. *Annals of Botany*, 123(7), 1231–1251.
- Alós, E., Rodrigo, M.J., & Zacarías, L. (2014). Differential transcriptional regulation of l-ascorbic acid content in peel and pulp of citrus fruits during development and maturation. *Planta*, 239(5), 1113–1128.
- Amorim-Carrilho, K.T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 56, 49–73.
- Annu, Ahmed, S., Kaur, G., Sharma, P., Singh, S., & Ikram, S. (2018). Fruit waste (peel) as bio-reductant to synthesize silver nanoparticles with antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities. *Journal of Applied Biomedicine*, 16(3), 221–231.
- Anticona, M., Blesa, J., Frigola, A., & Esteve, M.J. (2020). High Biological Value Compounds Extraction from Citrus Waste with Non-Conventional Methods. *Foods*, 9(6), 811.
- Apraj, V. D., & Pandita, N. S. (2016). Evaluation of Skin Anti-aging Potential of Citrus reticulata Blanco Peel. *Pharmacognosy Research*, 8(3), 160–168.
- Babazadeh-Darjazi, B. (2017). Study on peel components and juice quality of three mandarin hybrids (*Citrus reticulata*) on sour orange rootstock cultivated in Ramsar, Iran. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromaticas*, 16(2), 110–120.
- Barboni, T., Luro, F., Chiaramonti, N., Desjobert, J.-M., Muselli, A., & Costa, J. (2009). Volatile composition of hybrids Citrus juices by headspace solid-phase micro extraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Food Chemistry*, 116(1), 382–390.
- Barman, K., Chowdhury, D., & Baruah, P.K. (2020). Development of β -carotene loaded nanoemulsion using the industrial waste of orange (*Citrus reticulata*) peel to improve in vitro bioaccessibility of carotenoids and use as natural food colorant. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(5), e14429.
- Barreca, D., Mandalari, G., Calderaro, A., Smeriglio, A., Trombetta, D., Felice, M.R., & Gattuso, G. (2020). Citrus Flavones: An Update on Sources, Biological Functions, and Health Promoting Properties. *Plants*, 9(3), 288.

- Barros, H.R. de M., Ferreira, T. A. P. de C., & Genovese, M. I. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, 134(4), 1892–1898.
- Barros, R.G.C., Andrade, J.K.S., Denadai, M., Nunes, M.L., & Narain, N. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues. *Food Research International*, 102, 84–92.
- Barry, G. H., Caruso, M., & Gmitter, F. G. (2020). Chapter 5—Commercial scion varieties. In M. Talon, M. Caruso, F.G. Gmitter (Eds.), *The Genus Citrus*, pp. 83–104. Woodhead Publishing.
- Bashandy, S. A., Salama, A., Fayed, A.-H. M., Omara, E. A., El-Toumy, S. A., & Salib, J. Y. (2020). Protective effect of mandarin (*Citrus reticulata*) peel extract on potassium dichromate induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Plant Archives*, 20, 2231–2242.
- Bátori, V., Jabbari, M., Åkesson, D., Lennartsson, P.R., Taherzadeh, M.J., & Zamani, A. (2017). Production of Pectin-Cellulose Biofilms: A New Approach for Citrus Waste Recycling. *International Journal of Polymer Science*, 2017, Article e9732329.
- Betoret, E., Sentandreu, E., Betoret, N., & Fito, P. (2012). Homogenization pressures applied to citrus juice manufacturing. Functional properties and application. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 28–33.
- Bicu, I., & Mustata, F. (2011). Cellulose extraction from orange peel using sulfite digestion reagents. *Bioresource Technology*, 102(21), 10013–10019.
- Bicu, I., & Mustata, F. (2013). Optimization of isolation of cellulose from orange peel using sodium hydroxide and chelating agents. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 341–348.
- Boudries, H., Loupassaki, S., Ladjal Ettoumi, Y., Souagui, S., Bachir Bey, M., Nabet, N., Chikhoune, A., Madani, K., & Chibane, M. (2017). Chemical profile, antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus reticulata* and *Citrus clementina* (L.) essential oils. *International Food Research Journal*, 24(4), 1782–1792.
- Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., & Chemat, F. (2017). Development of a green procedure of citrus fruits waste processing to recover carotenoids. *Resource-Efficient Technologies*, 3(3), 252–262.
- Bowman, K.D., & Joubert, J. (2020). Chapter 6—Citrus rootstocks. In M. Talon, M. Caruso, F.G. Gmitter (Eds.), *The Genus Citrus*, pp. 105–127. Woodhead Publishing.
- Buniowska, M., Carbonell-Capella, J., Zulueta, A., Frigola, A., & Esteve, M.J. (2015). Bioaccessibility of Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity from Orange Peel after Pulsed Electric Fields and High Voltage Electrical Discharges. *MOJ Food Processing Technology*, 1(3).
- Caldas, T.W., Mazza, K.E.L., Teles, A.S.C., Mattos, G.N., Brígida, A.I.S., Conte-Junior, C.A., Borguini, R.G., Godoy, R.L.O., Cabral, L.M.C., & Tonon, R.V. (2018). Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 111, 86–91.
- Câmara, J.S., Albuquerque, B.R., Aguiar, J., Corrêa, R.C., Gonçalves, J.L., Granato, D., Pereira, J.A., Barros, L., & Ferreira, I.C. (2021). Food Bioactive Compounds and Emerging Techniques for Their Extraction: Polyphenols as a Case Study. *Foods*, 10(1), 37.
- Camarda, L., Di Stefano, V., Del Bosco, S.F., & Schillaci, D. (2007). Antiproliferative activity of Citrus juices and HPLC evaluation of their flavonoid composition. *Fitoterapia*, 78(6), 426–429.

- Carrau, F. (2004). Variedades de citrus en Uruguay. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Disponible en <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/15630041107121901.pdf>. Accedido en Marzo 26, 2021.
- Casquete, R., Castro, S.M., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Saraiva, J.A., Córdoba, M.G., & Teixeira, P. (2015). Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 37–44.
- Castellanos, A. C., & Torres, G. (2017). Proteína celular en biomasa de la levadura producida a partir de residuos de cáscaras de naranja y papa para uso en la alimentación animal. *Ciencia Tecnología Sociedad y Ambiente*, 8(13), 24–49.
- Celano, M., Maggisano, V., Rose, R.F.D., Bulotta, S., Maiuolo, J., Navarra, M., & Russo, D. (2015). Flavonoid Fraction of *Citrus Reticulata* Juice Reduces Proliferation and Migration of Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells. *Nutrition and Cancer*, 67(7), 1183–1190.
- Cheigh, C.I., Chung, E.Y., & Chung, M.S. (2012). Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus unshiu* peel using subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 110(3), 472–477.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., & Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 248–263.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.
- Chen, Q., Wang, D., Tan, C., Hu, Y., Sundararajan, B., & Zhou, Z. (2020). Profiling of Flavonoid and Antioxidant Activity of Fruit Tissues from 27 Chinese Local Citrus Cultivars. *Plants*, 9(2), 196.
- Chen, X., Ting, J.L.H., Peng, Y., Tangjaidee, P., Zhu, Y., Li, Q., Shan, Y., & Quek, S.Y. (2021). Comparing Three Types of Mandarin Powders Prepared via Microfluidic-Jet Spray Drying: Physical Properties, Phenolic Retention and Volatile Profiling. *Foods*, 10(1), 123.
- Cilla, A.J. Rodrigo, M., Ancos, B.D., Sánchez-Moreno, C., Pilar Cano, M., Zacarías, L., Barberá, R., & Alegría, A. (2020). Impact of high-pressure processing on the stability and bioaccessibility of bioactive compounds in Clementine mandarin juice and its cytoprotective effect on Caco-2 cells. *Food & Function*, 11(10), 8951–8962.
- Cirmi, S., Maugeri, A., Lombardo, G.E., Russo, C., Musumeci, L., Gangemi, S., Calapai, G., Barreca, D., & Navarra, M. (2021). A Flavonoid-Rich Extract of Mandarin Juice Counteracts 6-OHDA-Induced Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells and Modulates Parkinson-Related Genes. *Antioxidants*, 10(4), 539.
- Coelho, E.M., da Silva Haas, I.C., de Azevedo, L.C., Bastos, D.C., Fedrigo, I.M.T., dos Santos Lima, M., & de Mello Castanho Amboni, R.D. (2021). Multivariate chemometric analysis for the evaluation of 22 Citrus fruits growing in Brazil's semi-arid region. *Journal of Food Composition and Analysis*, 101, 103964.
- Costanzo, G., Iesce, M.R., Naviglio, D., Ciaravolo, M., Vitale, E., & Arena, C. (2020). Comparative Studies on Different Citrus Cultivars: A Reevaluation of Waste Mandarin Components. *Antioxidants*, 9(6), 517.

- Craft, B.D., Kerrihard, A.L., Amarowicz, R., & Pegg, R.B. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148–173.
- Curk, F., Ancillo, G., Ollitrault, F., Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.P., Garcia-Lor, A., Navarro, L., & Ollitrault, P. (2015). Nuclear Species-Diagnostic SNP Markers Mined from 454 Amplicon Sequencing Reveal Admixture Genomic Structure of Modern Citrus Varieties. *PLOS ONE*, 10(5), Article e0125628.
- Cury, K., Aguas, Y., Martinez, A., Olivero, R., & Chams, L. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 9(S1), 122–132.
- Dean, A., Voss, D., & Draguljić, D. (2017). Response Surface Methodology. In A. Dean, D. Voss, D. Draguljić (Eds.), *Design and Analysis of Experiments* (pp. 565–614). Springer International Publishing.
- Duarte, A., Fernandes, M. J., Bernardes, J. P., & Miguel, M. G. (2016). Citrus as a component of the Mediterranean Diet. *Journal of Spatial and Organizational Dynamics*, 4(4), 289–304.
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E.B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A.A., Novellino, E., & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221–2243.
- Esparza-Martínez, F. J., García Solis, P., Miranda-López, R., & Peña-Caballero, V. (2019). Inhibition of Proliferation of Colorectal Cancer Cells by Phenolic Extracts of Mandarin (*Citrus reticulata*) and Lime (*Citrus aurantifolia*) Fruit Waste. *Journal of Food and Nutrition Research*, 7(8), 560–567.
- Esparza-Martínez, F. J., Miranda-López, R., Mata-Sánchez, S. M., & Guzmán-Maldonado, S. H. (2016). Extractable and Non-Extractable Phenolics and Antioxidant Capacity of Mandarin Waste Dried at Different Temperatures. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(3), 294–300.
- EUROSTAT (2020). Waste statistics. Statistical office of the European Union. Disponible en <https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/pdfscache/1183.pdf>. Accedido en Abril 22, 2021.
- FAO (2017). Citrus Fresh and Processed–Statistical Bulletin 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf>. Accedido en Enero 24, 2020.
- FAO (2019). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en <http://www.fao.org/3/ca6030es/ca6030es.pdf>. Accedido en Abril 27, 2021.
- FAO (2011). Global food losses and food waste: Extent, causes and prevention. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en <http://www.fao.org/3/i2697e/i2697e.pdf>. Accedido en Abril 22, 2021.
- Fayek, N.M., Farag, M.A., Abdel Monem, A.R., Moussa, M.Y., Abd-Elwahab, S.M., & El-Tanbouly, N. D. (2019). Comparative Metabolite Profiling of Four Citrus Peel Cultivars via Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole-Time-of-Flight-Mass Spectrometry and Multivariate Data Analyses. *Journal of Chromatographic Science*, 57(4), 349–360.
- Ferreira, S.S., Silva, A.M., & Nunes, F.M. (2018). *Citrus reticulata* Blanco peels as a source of antioxidant and anti-proliferative phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 111, 141–148.

- Fu, M., Xu, Y., Chen, Y., Wu, J., Yu, Y., Zou, B., An, K., & Xiao, G. (2017). Evaluation of bioactive flavonoids and antioxidant activity in Pericarpium Citri Reticulatae (*Citrus reticulata* 'Chachi') during storage. *Food Chemistry*, 230, 649–656.
- Generalitat Valenciana. (2020). Previsión de cosecha de Cítricos, Campaña 2020/2021, Comunitat Valenciana. Disponible en <http://agroambient.gva.es>. Accedido en Abril, 27, 2021.
- Ghorbanpour Khamseh, A. A., & Miccio, M. (2012). Comparison of batch, fed-batch and continuous well-mixed reactors for enzymatic hydrolysis of orange peel wastes. *Process Biochemistry*, 47(11), 1588–1594.
- Ghosh, P. R., Fawcett, D., Sharma, S. B., & Poinern, G. E. J. (2016). Progress towards Sustainable Utilisation and Management of Food Wastes in the Global Economy. *International Journal of Food Science*, 2016, Article e3563478.
- Giuffrida, D., Zoccali, M., & Mondello, L. (2020). Recent developments in the carotenoid and carotenoid derivatives chromatography-mass spectrometry analysis in food matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 132, Article 116047.
- Gmitter, F.G., Wu, G.A., Rokhsar, D.S., & Talon, M. (2020). Chapter 1—The citrus genome. In M. Talon, M. Caruso, F.G. Gmitter (Eds.), *The Genus Citrus*, pp. 1–8. Woodhead Publishing.
- Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., León-González, M.E., & Madrid, Y. (2019). Citrus peels waste as a source of value-added compounds: Extraction and quantification of bioactive polyphenols. *Food Chemistry*, 295, 289–299.
- Guccione, C., Bergonzi, M., Piazzini, V., & Bilia, A. (2016). A Simple and Rapid HPLC-PDA MS Method for the Profiling of Citrus Peels and Traditional Italian Liquors. *Planta Medica*, 82(11/12), 1039–1045.
- Gullón, P., Gullón, B., Astray, G., Costa, P., & Lorenzo, J. M. (2021). 2—Modeling approaches to optimize the recovery of polyphenols using ultrasound-assisted extraction. In F.J. Barba, G. Cravotto, F. Chemat, J.M. Lorenzo, P.E. Sichertti (Eds.), *Design and Optimization of Innovative Food Processing Techniques Assisted by Ultrasound*, pp. 15–38. Academic Press.
- Han, S., Kim, H. M., & Lee, S. (2012). Simultaneous determination of polymethoxyflavones in Citrus species, Kiyomi tangor and Satsuma mandarin, by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 134(2), 1220–1224.
- Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., & Xia, W. (2009). Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation and Purification Technology*, 70(1), 63–70.
- Hayat, K., Zhang, X., Chen, H., Xia, S., Jia, C., & Zhong, F. (2010). Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 73(3), 371–376.
- Hu, Y., Kou, G., Chen, Q., Li, Y., & Zhou, Z. (2019). Protection and delivery of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) peel extracts by encapsulation of whey protein concentrate nanoparticles. *LWT*, 99, 24–33.
- Hu, Y., Zhang, W., Ke, Z., Li, Y., & Zhou, Z. (2017). In vitro release and antioxidant activity of Satsuma mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Unshiu) peel flavonoids encapsulated by pectin nanoparticles. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(11), 2362–2373.
- Hunlun, C., de Beer, D., Sigge, G.O., & Wyk, J.V. (2017). Characterisation of the flavonoid composition and total antioxidant capacity of juice from different citrus varieties from the Western Cape region. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 115–125.

- Jelley, R.E., Herbst-Johnstone, M., Martin, D., Barker, D., & Fedrizzi, B. (2016). Optimization of Ecofriendly Extraction of Bioactive Monomeric Phenolics and Useful Flavor Precursors from Grape Waste. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4, 5060–5067.
- Jo, Y., Nam, H.A., Ramakrishnan, S.R., Baek, M.E., Lim, S.B., & Kwon, J.H. (2018). Postharvest irradiation as a quarantine treatment and its effects on the physicochemical and sensory qualities of Korean citrus fruits. *Scientia Horticulturae*, 236, 265–271.
- Jomova, K., & Valko, M. (2013). Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 102–110.
- Kaulmann, A., & Bohn, T. (2014). Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—Implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutrition Research*, 34(11), 907–929.
- Kawahata, I., Yoshida, M., Sun, W., Nakajima, A., Lai, Y., Osaka, N., Matsuzaki, K., Yokosuka, A., Mimaki, Y., Naganuma, A., Tomioka, Y., & Yamakuni, T. (2013). Potent activity of nobiletin-rich *Citrus reticulata* peel extract to facilitate cAMP/PKA/ERK/CREB signaling associated with learning and memory in cultured hippocampal neurons: Identification of the substances responsible for the pharmacological action. *Journal of Neural Transmission*, 120(10), 1397–1409.
- Khadhraoui, B., Fabiano-Tixier, A.S., Robinet, P., Imbert, R., & Chemat, F. (2019). 2—Ultrasound technology for food processing, preservation, and extraction. In F. Chemat, E. Vorobiev (Eds.) *Green Food Processing Techniques*, pp. 23–56. Academic Press.
- Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851–858.
- Khan, M.K., Ahmad, K., Hassan, S., Imran, M., Ahmad, N., & Xu, C. (2018). Effect of novel technologies on polyphenols during food processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45, 361–381.
- Kim, G.N., Shin, M.R., Shin, S.H., Lee, A.R., Lee, J.Y., Seo, B.I., Kim, M.Y., Kim, T.H., Noh, J.S., Rhee, M.H., & Roh, S.S. (2016). Study of Antiobesity Effect through Inhibition of Pancreatic Lipase Activity of Diospyros kaki Fruit and *Citrus unshiu* Peel. *BioMed Research International*, 2016, Article e1723042.
- Kiokias, S., Proestos, C., & Varzakas, T. (2016). A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 4, 25–37.
- Ko, M.J., Kwon, H.L., & Chung, M.S. (2016). Pilot-scale subcritical water extraction of flavonoids from satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Markovich) peel. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, 175–181.
- Kohno, H., Maeda, M., Honjo, S., Murakami, M., Shimada, R., Masuda, S., Sumida, T., Azuma, Y., Ogawa, H., & Tanaka, T. (1999). Prevention of Colonic Preneoplastic Lesions by the β -Cryptoxanthin and Hesperidin Rich Powder Prepared from *Citrus Unshiu* Marc. Juice in Male F344 Rats. *Journal of Toxicologic Pathology*, 12(4), 209–209.
- Kundu, D., Das, M., Mahle, R., Biswas, P., Karmakar, S., & Banerjee, R. (2020). Chapter 7—Citrus fruits. In C.M. Galanakis (Ed.), *Valorization of Fruit Processing By-products*, pp. 145–166. Academic Press.
- Lado, J., Cuellar, F., Rodrigo, M.J., & Zacarías, L. (2016). Chapter 18—Nutritional Composition of Mandarins. In M.S.J. Simmonds, V.R. Preedy (Eds.), *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*, pp. 419–443. Academic Press.

- Langgut, D. (2017). The Citrus Route Revealed: From Southeast Asia into the Mediterranean. *HortScience*, 52(6), 814–822.
- Lavilla, I., & Bendicho, C. (2017). Chapter 11—Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. In H.D. González and M.J. González-Muñoz (Eds.), *Water Extraction of Bioactive Compounds*, pp. 291–316. Elsevier.
- Lee, J., Yang, D.-S., Han, S.-I., Yun, J. H., Kim, I., Kim, S. J., & Kim, J. H. (2016). Aqueous Extraction of *Citrus unshiu* Peel Induces Proangiogenic Effects Through the FAK and ERK1/2 Signaling Pathway in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Journal of Medicinal Food*, 19(6), 569–577.
- Lee, S., Ra, J., Song, J.Y., Gwak, C., Kwon, H.J., Yim, S.V., Hong, S.P., Kim, J., Lee, K.H., Cho, J.J., Park, Y.S., Park, C.S., & Ahn, H.J. (2011). Extracts from *Citrus unshiu* promote immune-mediated inhibition of tumor growth in a murine renal cell carcinoma model. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 973–979.
- Leporini, M., Tundis, R., Sicari, V., Pellicanò, T.M., Dugay, A., Deguin, B., & Loizzo, M.R. (2020). Impact of extraction processes on phytochemicals content and biological activity of *Citrus × clementina* Hort. Ex Tan. leaves: New opportunity for under-utilized food by-products. *Food Research International*, 127, Article 108742.
- Li, W., Wang, Z., Wang, Y., Jiang, C., Liu, Q., Sun, Y., & Zheng, Y. (2012). Pressurised liquid extraction combining LC–DAD–ESI/MS analysis as an alternative method to extract three major flavones in *Citrus reticulata* ‘Chachi’ (Guangchenpi). *Food Chemistry*, 130(4), 1044–1049.
- Li, Z., Jin, R., Yang, Z., Wang, X., You, G., Guo, J., Zhang, Y., Liu, F., & Pan, S. (2021). Comparative study on physicochemical, nutritional and enzymatic properties of two Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) varieties from different regions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 95, Article 103614.
- Londoño-Londoño, J., Lima, V.R. de, Lara, O., Gil, A., Pasa, T.B.C., Arango, G. J., & Pineda, J. R. R. (2010). Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, 119(1), 81–87.
- Long, T., Lv, X., Xu, Y., Yang, G., Xu, L.Y., & Li, S. (2019). Supercritical fluid CO₂ extraction of three polymethoxyflavones from *Citri reticulatae pericarpium* and subsequent preparative separation by continuous high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1124, 284–289.
- Lu, Y., Li, D., Li, L., Belwal, T., Xu, Y., Lin, X., Duan, Z., & Luo, Z. (2020). Effects of elevated CO₂ on pigment metabolism of postharvest mandarin fruit for degreening. *Food Chemistry*, 318, 126462.
- Luo, Y., Zeng, W., Huang, K.E., Li, D.X., Chen, W., Yu, X.Q., & Ke, X.H. (2019). Discrimination of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus reticulata* ‘Chachi’ as well as the *Citrus reticulata* ‘Chachi’ within different storage years using ultra high performance liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 171, 218–231.
- Ma, G., Zhang, L., Iida, K., Madono, Y., Yungyuen, W., Yahata, M., Yamawaki, K., & Kato, M. (2017). Identification and quantitative analysis of β -cryptoxanthin and β -citraurin esters in Satsuma mandarin fruit during the ripening process. *Food Chemistry*, 234, 356–364.
- Ma, G., Zhang, L., Kato, M., Yamawaki, K., Kiriiwa, Y., Yahata, M., Ikoma, Y., & Matsumoto, H. (2015). Effect of the combination of ethylene and red LED light irradiation on carotenoid

- accumulation and carotenogenic gene expression in the flavedo of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 99–104.
- Ma, G., Zhang, L., Yungyuen, W., Sato, Y., Furuya, T., Yahata, M., Yamawaki, K., & Kato, M. (2018). Accumulation of carotenoids in a novel citrus cultivar “Seinannohikari” during the fruit maturation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 129, 349–356.
- Ma, Y., Chen, J., Liu, D., & Ye, X. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(1), 57–62.
- Ma, Y., Ye, X., Fang, Z., Chen, J., Xu, G., & Liu, D.H. (2008). Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5682–5690.
- Ma, Y., Ye, X., Wu, H., Wang, H., Sun, Z., Zhu, P., & Han, Z. (2015). Evaluation of the effect of ultrasonic variables at locally ultrasonic field on yield of hesperidin from penggan (*Citrus reticulata*) peels. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 1088–1094.
- Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M., & Cho, M.H. (2018). Citrus waste derived nutra-/pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives. *Journal of Functional Foods*, 40, 307–316.
- Mahato, N., Sinha, M., Sharma, K., Koteswararao, R., & Cho, M. H. (2019). Modern Extraction and Purification Techniques for Obtaining High Purity Food-Grade Bioactive Compounds and Value-Added Co-Products from Citrus Wastes. *Foods*, 8(11), 523.
- Martins, N., & Ferreira, I.C.F.R. (2017). Wastes and by-products: Upcoming sources of carotenoids for biotechnological purposes and health-related applications. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 33–48.
- Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Kuniga, T., Nakajima, N., & Yoshida, T. (2007). Quantification of Carotenoids in Citrus Fruit by LC-MS and Comparison of Patterns of Seasonal Changes for Carotenoids among Citrus Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2356–2368.
- Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Nakajima, N., & Hasegawa, Y. (2009). Effect of Postharvest Temperature and Ethylene on Carotenoid Accumulation in the Flavedo and Juice Sacs of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4724–4732.
- Meléndez-Martínez, A.J. (2017). Carotenoides en agroalimentación y salud. Editorial Terracota, SA.
- Meyers, K.J., Mares, J.A., Igo, R.P., Truitt, B., Liu, Z., Millen, A.E., Klein, M., Johnson, E.J., Engelman, C.D., Karki, C.K., Blodi, B., Gehrs, K., Tinker, L., Wallace, R., Robinson, J., LeBlanc, E.S., Sarto, G., Bernstein, P.S., SanGiovanni, J.P., & Iyengar, S.K. (2014). Genetic Evidence for Role of Carotenoids in Age-Related Macular Degeneration in the Carotenoids in Age-Related Eye Disease Study (CAREDS). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(1), 587–599.
- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), 139–148.
- Murador, D.C., Braga, A.R.C., Martins, P.L.G., Mercadante, A.Z., & de Rosso, V.V. (2019). Ionic liquid associated with ultrasonic-assisted extraction: A new approach to obtain carotenoids from orange peel. *Food Research International*, 126, 108653.

- Murillo, E., Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Torre, G., Meléndez-Martínez, A. J., & Mondello, L. (2013). Native carotenoids composition of some tropical fruits. *Food Chemistry*, 140(4), 825–836.
- Nagarajan, J., Ramanan, R.N., Raghunandan, M.E., Galanakis, C.M., & Krishnamurthy, N.P. (2017). Chapter 8—Carotenoids. In S.R. Drago (Ed.) *Nutraceutical and Functional Food Components*, pp. 259–296. Academic Press.
- Nakamura, M., & Sugiura, M. (2019). 11—Health Effects of β -Cryptoxanthin and β -Cryptoxanthin-Enriched Satsuma Mandarin Juice. In A.M. Grumezescu, A.M. Holban (Eds.), *Nutrients in Beverages*, pp. 393–417. Academic Press.
- Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P., & Singanusong, R. (2018). Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) peel. *Food Chemistry*, 241, 338–345.
- Ollitrault, P., Curk, F., & Krueger, R. (2020). Chapter 4—Citrus taxonomy. In M. Talon, M. Caruso, F.G. Gmitter (Eds.), *The Genus Citrus*, pp. 57–81. Woodhead Publishing.
- Omar, J., Alonso, I., Garaikoetxea, A., & Etxebarria, N. (2013). Optimization of Focused Ultrasound Extraction (FUSE) and Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Citrus Peel Volatile Oils and Antioxidants. *Food Analytical Methods*, 6(4), 1244–1252.
- Pagnoux, C., Celant, A., Coubray, S., Fiorentino, G., & Zech-Matterne, V. (2013). The introduction of Citrus to Italy, with reference to the identification problems of seed remains. *Vegetation History and Archaeobotany*, 22(5), 421–438.
- Peñaranda-Gonzalez, L. V. P., Gómez, S. P. M., & Abad, P. A. G. (2017). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. *RIAA*, 8(2), 141–150.
- Pérez, A. G., Luaces, P., Oliva, J., Ríos, J. J., & Sanz, C. (2005). Changes in vitamin C and flavour components of mandarin juice due to curing of fruits. *Food Chemistry*, 91(1), 19–24.
- Pérez-Gago, M. B., & Palou, L. (2020). Chapter 18.3 - Subtropical fruits: Citrus. In M.I. Gil, R. Beaudry (Eds.), *Controlled and Modified Atmospheres for Fresh and Fresh-Cut Produce*, pp. 411–419. Academic Press.
- Plazzotta, S., Manzocco, L., & Nicoli, M.C. (2017). Fruit and vegetable waste management and the challenge of fresh-cut salad. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 51–59.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Putnik, P., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Gabrić, D., Shpigelman, A., Cravotto, G., & Bursać Kovačević, D. (2017a). An Integrated Approach to Mandarin Processing: Food Safety and Nutritional Quality, Consumer Preference, and Nutrient Bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1345–1358.
- Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., Lorenzo, J. M., & Shpigelman, A. (2017b). Innovative “Green” and Novel Strategies for the Extraction of Bioactive Added Value Compounds from Citrus Wastes—A Review. *Molecules*, 22(5), Article 680.
- Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207–216.
- Reddy, A. V. B., Moniruzzaman, M., Madhavi, V., & Jaafar, J. (2020). Chapter 8—Recent improvements in the extraction, cleanup and quantification of bioactive flavonoids. In A. Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 66, pp. 197–223. Elsevier.

- Regal, P., Lamas, A., Fente, C.A., Franco, C.M., & Cepeda, A. (2020). 6—Analysis and metabolomics of carotenoids. In C.M. Galanakis (Ed.), *Carotenoids: Properties, Processing and Applications*, pp. 189–222. Academic Press.
- Rezzadori, K., Benedetti, S., & Amante, E. R. (2012). Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 606–614.
- Roussos, P. A., Flessoura, I., Petropoulos, F., Massas, I., Tsafouros, A., Ntanos, E., & Denaxa, N.K. (2019). Soil physicochemical properties, tree nutrient status, physical, organoleptic and phytochemical characteristics and antioxidant capacity of clementine mandarin (*Citrus clementine* cv. SRA63) juice under integrated and organic farming. *Scientia Horticulturae*, 250, 414–420.
- Rutkowska, M., Namieśnik, J., & Konieczka, P. (2017). Chapter 10—Ultrasound-Assisted Extraction. In F. Pena-Pereira, M. Tobiszewski (Eds.), *The Application of Green Solvents in Separation Processes*, pp. 301–324. Elsevier.
- Rutz, J.K., Borges, C.D., Zambiasi, R.C., da Rosa, C.G., & da Silva, M. M. (2016). Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. *Food Chemistry*, 202, 324–333.
- Safdar, M.N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 488–500.
- Šafranko, S., Ćorković, I., Jerković, I., Jakovljević, M., Aladić, K., Šubarić, D., & Jokić, S. (2021). Green Extraction Techniques for Obtaining Bioactive Compounds from Mandarin Peel (*Citrus unshiu* var. Kuno): Phytochemical Analysis and Process Optimization. *Foods*, 10(5), Article 1043.
- Saini, A., Panesar, P.S., & Bera, M. (2019). Comparative study on the extraction and quantification of polyphenols from citrus peels using maceration and ultrasonic technique. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 7(3), 678–685.
- Saini, A., Panesar, P.S., & Bera, M.B. (2021). Valuation of *Citrus reticulata* (kinnow) peel for the extraction of lutein using ultrasonication technique. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11, 2157–2165.
- Saini, R.K., & Keum, Y.S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90–103.
- Sammani, M.S., Clavijo, S., González, A., & Cerdà, V. (2019). Development of an on-line lab-on-valve micro-solid phase extraction system coupled to liquid chromatography for the determination of flavonoids in citrus juices. *Analytica Chimica Acta*, 1082, 56–65.
- Sharmila, G., Nikitha, V.S., Ilaiyarasi, S., Dhivya, K., Rajasekar, V., Kumar, N.M., Muthukumar, K., & Muthukumar, C. (2016). Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *Cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 84, 13–21.
- Sharoni, Y., Linnewiel-Hermoni, K., Khanin, M., Salman, H., Veprik, A., Danilenko, M., & Levy, J. (2012). Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(2), 259–269.
- Shi, J.X., Goldschmidt, E.E., Goren, R., & Porat, R. (2007). Molecular, biochemical and anatomical factors governing ethanol fermentation metabolism and accumulation of off-flavors in mandarins and grapefruit. *Postharvest Biology and Technology*, 46(3), 242–251.
- Shukla, Gawande, & Thorat. (2016). Extraction, Identification and Utilization of Pigments Extracted from Citrus Wastes. *International Journal of Science and Research*, 5, 242–251.

- Singanusong, R., Nipornram, S., Tochampa, W., & Rattanatraiwong, P. (2015). Low Power Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) and Lime (*Citrus aurantifolia*) Peels and the Antioxidant. *Food Analytical Methods*, 8(5), 1112–1123.
- Strati, I.F., & Oreopoulou, V. (2011). Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(1), 23–29.
- Sun, T., Yuan, H., Cao, H., Yazdani, M., Tadmor, Y., & Li, L. (2018). Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. *Molecular Plant*, 11(1), 58–74.
- Sun, Y., Liu, D., Chen, J., Ye, X., & Yu, D. (2011). Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-*trans*- β -carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 243–249.
- Swingle, W. T., & Reece, P. (1943). Botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily (family *Rutaceae*, subfamily *Aurantioideae*). In H.J. Webber, L.D. Batchelor (Eds.), *The Citrus Industry*, Vol. 1, pp. 190–430. University of California Press.
- Taghizadeh-Alisaraei, A., Hosseini, S.H., Ghobadian, B., & Motevali, A. (2017). Biofuel production from citrus wastes: A feasibility study in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69, 1100–1112.
- Talon, M., & Gmitter, F.G. (2008). Citrus Genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, Article e528361.
- Talon, M., Wu, G.A., Gmitter, F.G., & Rokhsar, D.S. (2020). Chapter 2—The origin of citrus. In M. Talon, M. Caruso, F.G. Gmitter (Eds.), *The Genus Citrus*, pp. 9–31. Woodhead Publishing.
- Tanaka, T. (1954). Species problem in citrus: A critical study of wild and cultivated units of Citrus, based upon field studies in their native homes. Vol., 9.
- Tanaka, T., Kohno, H., Murakami, M., Shimada, R., Kagami, S., Sumida, T., Azuma, Y., & Ogawa, H. (2000). Suppression of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by mandarin juices rich in β -cryptoxanthin and hesperidin. *International Journal of Cancer*, 88(1), 146–150.
- Testai, L., Leo, M. D., Flori, L., Polini, B., Braca, A., Nieri, P., Pistelli, L., & Calderone, V. (2021). Contribution of irisin pathway in protective effects of mandarin juice (*Citrus reticulata* Blanco) on metabolic syndrome in rats fed with high fat diet. *Phytotherapy Research*, 1–10.
- Tripodo, M. M., Lanuzza, F., Micali, G., Coppolino, R., & Nucita, F. (2004). Citrus waste recovery: A new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. *Bioresource Technology*, 91(2), 111–115.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246.
- USDA. (2020). Food and Nutrient Database for Dietary Studies 2017-2018. Ingredient Nutrient Values. Disponible en <http://www.ars.usda.gov/nea/bhnrc/fsrg>. Accedido en Junio 28, 2021.
- Verzera, A., Trozzi, A., Cotroneo, A., Lorenzo, D., & Dellacassa, E. (2000). Uruguayan Essential Oil. 12. Composition of Nova and Satsuma Mandarin Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2903–2909.
- Wang, S., Yang, C., Tu, H., Zhou, J., Liu, X., Cheng, Y., Luo, J., Deng, X., Zhang, H., & Xu, J. (2017). Characterization and Metabolic Diversity of Flavonoids in Citrus Species. *Scientific Reports*, 7(1), Article 10549.

- Wang, X., Li, F., Zhang, H., Geng, Y., Yuan, J., & Jiang, T. (2005). Preparative isolation and purification of polymethoxylated flavones from Tangerine peel using high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1090(1), 188–192.
- Wang, X., Xu, Y., Zhang, S., Cao, L., Huang, Y., Cheng, J., Wu, G., Tian, S., Chen, C., Liu, Y., Yu, H., Yang, X., Lan, H., Wang, N., Wang, L., Xu, J., Jiang, X., Xie, Z., Tan, M., Larkin, R.M., Chen, L.L., Ma, B.G., Ruan, Y., Deng, X., & Xu, Q. (2017). Genomic analyses of primitive, wild and cultivated citrus provide insights into asexual reproduction. *Nature Genetics*, 49(5), 765–772.
- Wang, Y., Qian, J., Cao, J., Wang, D., Liu, C., Yang, R., Li, X., & Sun, C. (2017). Antioxidant Capacity, Anticancer Ability and Flavonoids Composition of 35 Citrus (*Citrus reticulata* Blanco) Varieties. *Molecules*, 22(7), Article 1114.
- Wang, Y.C., Chuang, Y.C., & Hsu, H.W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 106(1), 277–284.
- Wei, Y., Fang, Z., Zheng, L., Tan, L., & Tsang, E.P. (2016). Green synthesis of Fe nanoparticles using *Citrus maxima* peels aqueous extracts. *Materials Letters*, 185, 384–386.
- Wu, G. A., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., ... Rokhsar, D. (2014). Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotechnology*, 32(7), 656–662.
- Wu, G.A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., Domingo, C., Tadeo, F.R., Carbonell-Caballero, J., Alonso, R., Curk, F., Du, D., Ollitrault, P., Roose, M.L., Dopazo, J., Gmitter, F.G., Rokhsar, D.S., & Talon, M. (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*, 554(7692), 311–316.
- Xi, W., Zhang, Y., Sun, Y., Shen, Y., Ye, X., & Zhou, Z. (2014). Phenolic composition of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Balnco.) pulps and their antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 52, 466–474.
- Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y., & Shi, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106(2), 545–551.
- Xu, M., Ran, L., Chen, N., Fan, X., Ren, D., & Yi, L. (2019). Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent. *Food Chemistry*, 297, Article 124970.
- Ye, X.Q., Chen, J.C., Liu, D.H., Jiang, P., Shi, J., Xue, S., Wu, D., Xu, J.G., & Kakuda, Y. (2011). Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*, 124(4), 1561–1566.
- Yoo, K.M., & Moon, B. (2016). Comparative carotenoid compositions during maturation and their antioxidative capacities of three citrus varieties. *Food Chemistry*, 196, 544–549.
- Yu, X., Zhang, X., Jiang, D., Zhu, S., Cao, L., Liu, X., Shen, W., Zhao, W., & Zhao, X. (2021). Genetic diversity of the ease of peeling in mandarins. *Scientia Horticulturae*, 278, Article 109852.
- Zanella, K., Gonçalves, J., & Taranto, O. (2016). Charcoal Briquette Production Using Orange Bagasse and Corn Starch. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 313–318.
- Zema, D. A., Calabrò, P. S., Folino, A., Tamburino, V., Zappia, G., & Zimbone, S. M. (2018). Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste Management*, 80, 252–273.
- Zhang, H., Chen, J., Li, J., Yan, L., Li, S., Ye, X., Liu, D., Ding, T., Linhardt, R.J., Orfila, C., & Chen, S. (2018). Extraction and characterization of RG-I enriched pectic polysaccharides from mandarin citrus peel. *Food Hydrocolloids*, 79, 579–586.

- Zhang, J.Y., Zhang, Q., Zhang, H.X., Ma, Q., Lu, J.Q., & Qiao, Y.J. (2012). Characterization of Polymethoxylated Flavonoids (PMFs) in the Peels of “Shatangju” Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) by Online High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Photodiode Array Detection and Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9023–9034.
- Zhao, X.J., Chen, D., Kilmartin, P.A., & Jiao, B.N. (2019). Simultaneous Determination of Phenolics and Polymethoxylated Flavones in Citrus Fruits by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled with Triple-Quadrupole Mass Spectrometry (UHPLC-QqQ-MS). *Analytical Letters*, 52(12), 1926–1938.
- Zheng, G.D., Zhou, P., Yang, H., Li, Y., Li, P., & Liu, E.H. (2013). Rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry method for identification of chemical constituents in *Citri Reticulatae* Pericarpium. *Food Chemistry*, 136(2), 604–611.
- Zhou, J.-Y., Sun, C.-D., Zhang, L.-L., Dai, X., Xu, C.-J., & Chen, K.-S. (2010). Preferential accumulation of orange-colored carotenoids in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit peel following postharvest application of ethylene or ethephon. *Scientia Horticulturae*, 126(2), 229–235.
- Zhu, C.H., Gertz, E.R., Cai, Y., & Burri, B.J. (2016). Consumption of canned citrus fruit meals increases human plasma β -cryptoxanthin concentration, whereas lycopene and β -carotene concentrations did not change in healthy adults. *Nutrition Research*, 36(7), 679–688.
- Zhu, C., Zhou, X., Long, C., Du, Y., Li, J., Yue, J., & Pan, S. (2020). Variations of Flavonoid Composition and Antioxidant Properties among Different Cultivars, Fruit Tissues and Developmental Stages of Citrus Fruits. *Chemistry & Biodiversity*, 17(6), Article e1900690.
- Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chemistry*, 196, 885–896.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316.
- Zuorro, A., Maffei, G., & Lavecchia, R. (2016). Reuse potential of artichoke (*Cynara scolimus* L.) waste for the recovery of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*, 111, 279–284

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es el estudio de la caracterización del zumo y los extractos de piel obtenidos por ultrasonidos, de tres variedades de mandarinas híbridas (Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique).

Para conseguir el objetivo principal se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Revisión bibliográfica de métodos no-convencionales para la extracción de compuestos bioactivos de residuos cítricos.
- Determinación de los parámetros físico-químicos, contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante del zumo de las mandarinas híbridas.
- Determinación de los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante en los extractos, obtenidos mediante ultrasonidos, de la piel de las mandarinas híbridas.
- Caracterización de compuestos fenólicos y carotenoides mediante HPLC-UV y UPLC-qTOF-MS/MS.

PLAN DE TRABAJO

Para alcanzar los objetivos propuestos se propone el siguiente plan de trabajo:

1. Obtención del zumo de tres variedades de mandarinas híbridas (Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique) durante dos temporadas de cosecha.
 - Evaluación de los parámetros físico-químicos, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.
 - Estudio de las diferencias entre las variedades híbridas y temporada de cosecha.
2. Obtención del extracto de piel de las mandarinas (flavedo y albedo) mediante la aplicación de ultrasonidos (400 W, <40°C) en etanol 50% v/v.
 - Efecto del tiempo de extracción sobre los parámetros físico-químicos, contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.
 - Comparación de la extracción con ultrasonidos y convencional (<40°C, etanol 50% v/v) mediante el índice de extracción.
3. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos y carotenoides mediante HPLC-UV y UPLC-qTOF-MS/MS, previa purificación de los extractos de piel de mandarinas híbridas obtenidos por ultrasonidos.

En la figura 14 se presenta el plan de trabajo desarrollado.

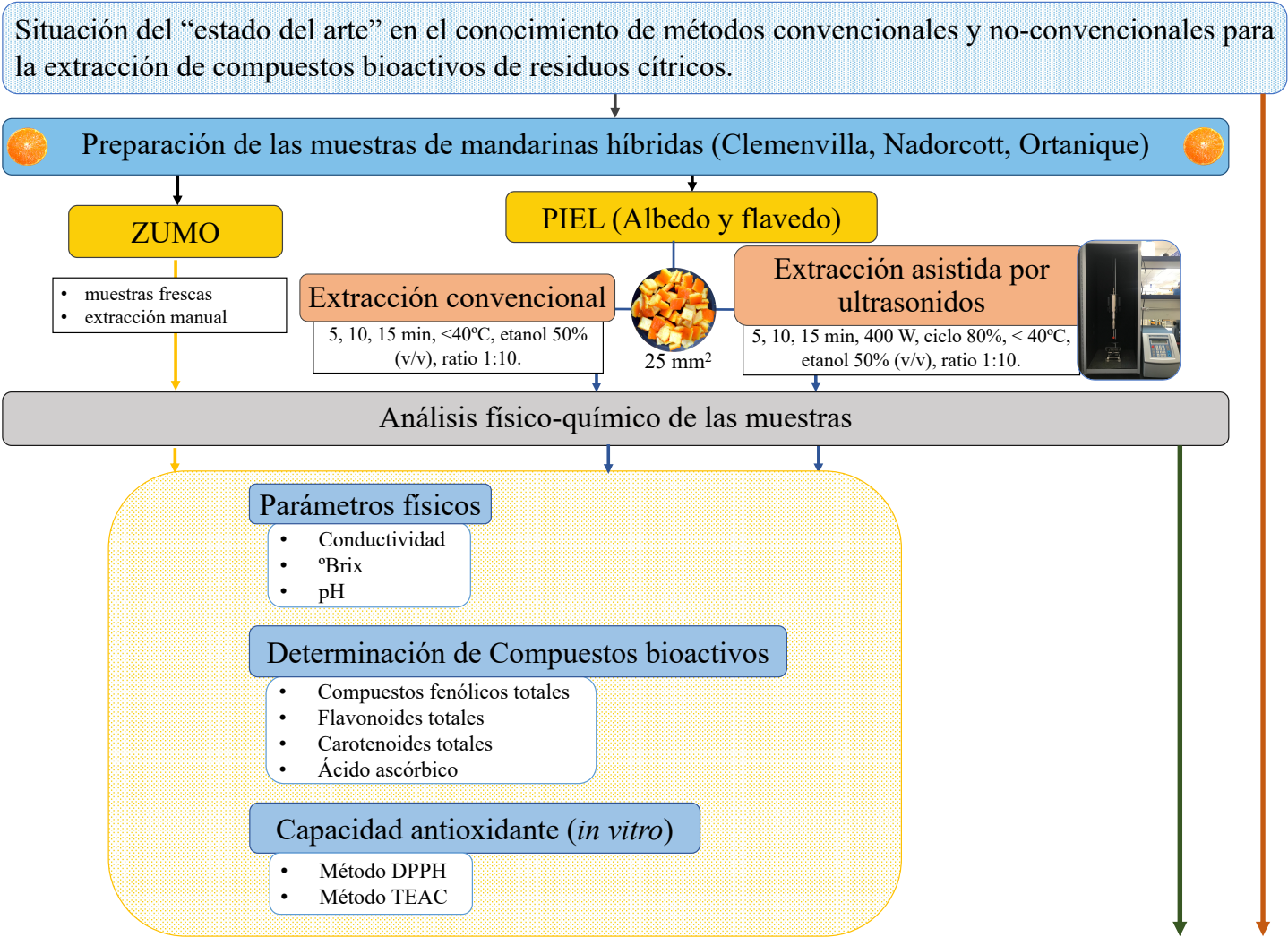


Figura 14. Diseño del experimento y plan de trabajo

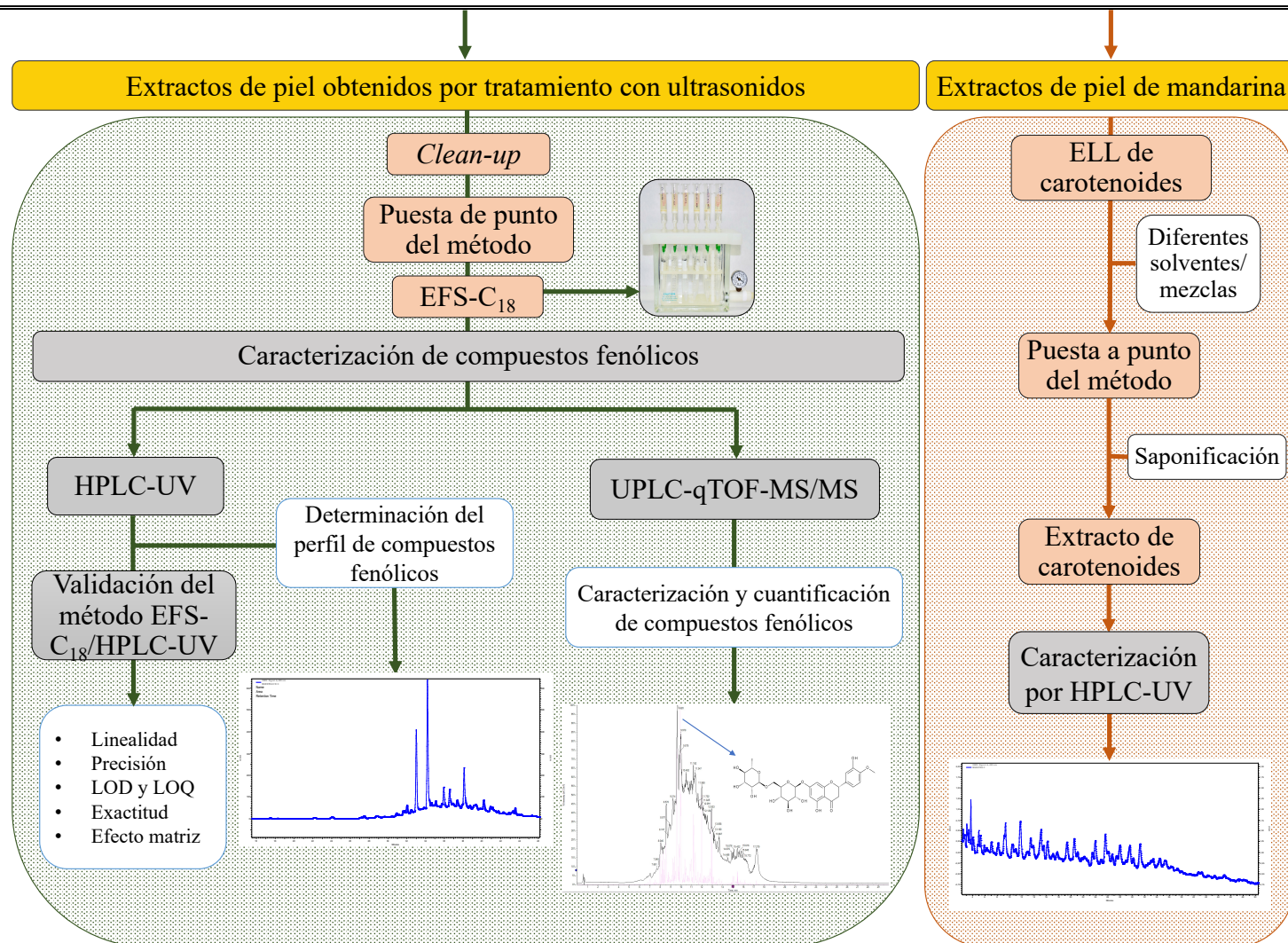


Figura 14. Diseño del experimento y plan de trabajo (continuación).

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS

Se seleccionan mandarinas de tres cultivos híbridos: Clemenvilla (Nova) (*C. clementina* Hort x (*C. paradisi* Macf. x *C. tangerina* Hort)), Nadorcott (Afourer) ((*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck) x *C. reticulata*) y Ortanique (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck) (Figura 15) que son aleatoriamente recolectadas durante los meses de diciembre, enero, febrero, marzo y abril de dos temporadas (2017-2018 y 2018-2019).



Figura 15. Variedades de mandarinas incluidas en el estudio.

Las muestras se recogen aleatoriamente de diferentes campos de cítricos de la provincia de Valencia (España) en la etapa de madurez comercial. Cronológicamente las mandarinas de la variedad Clemenvilla se obtienen desde las últimas dos semanas de noviembre hasta los primeros días de febrero, las de la variedad Ortanique desde principios de enero hasta los primeros días de abril y las de la variedad Nadorcott durante los últimos días de febrero hasta finales de marzo. Se realizan 35, 22 y 31 tomas de muestras de mandarinas Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique, respectivamente, siendo el número de mandarinas de cada

toma de 15 a 20 unidades (véase Tabla 8). Las mandarinas se transportan inmediatamente al laboratorio tras su recolección para realizar su análisis. La temperatura durante el transporte (4°C) se mantiene a su llegada al laboratorio y hasta el momento de su análisis.

Tabla 8. Muestras según variedad y temporada (2017-2018 y 2018-2019)

Temporada de cosecha	Variedad		
	Clemenvilla	Nadorcott	Ortanique
2017-2018	10	10	13
2018-2019	25	12	18
Total	35	22	31

3.1.1. Obtención de zumo

Se seleccionan las muestras según su tamaño, se limpian con agua destilada, se secan con papel y se cortan por la mitad. Para la obtención del zumo se emplea un exprimidor de cocina eléctrico. A continuación, el zumo se centrifuga (5 min, 4000 r.p.m a temperatura ambiente) (Eppendorf 5810R, Alemania) y se filtra a través de un filtro de membrana Whatman no. 1 para eliminar restos de pulpa y semillas, y se separa en alícuotas según los parámetros a analizar.

Durante la obtención del zumo se determina la relación zumo/peso (v/p) de las muestras, para ello se pesan las mandarinas (g) y se mide el volumen (mL) del zumo extraído. Los datos se expresan en mL/100g.

3.1.2. Obtención de extractos de piel de mandarinas híbridas

Las muestras se agrupan en base a la uniformidad de color y el calibre externo según cada variedad. Después de un adecuado lavado con agua destilada, la piel se separa de forma manual de la pulpa y se corta en tamaño de 25 mm² con un cortador de cocina (Figura 16).



Figura 16. Piezas de piel de mandarina para elaborar los extractos

3.1.2.1. Extracción control (EC)

Se utiliza un mezclador magnético IKA, modelo C-MAG HS 7 (Staufen, Alemania) para agitar la muestra (6 g de piel troceada) en el solvente (60 mL de etanol acuoso 50%, v/v) a $< 40^{\circ}\text{C}$. Los extractos se filtran a través de un filtro de membrana Whatman no. 1 y se recogen en un tubo graduado protegido de la luz, para ser almacenados a -20°C hasta su análisis.

3.1.2.2. Extracción asistida por ultrasonidos

Para la extracción asistida por ultrasonidos se emplea un procesador ultrasónico Q500 (Qsonica, EE. UU.) (Figura 17) con una frecuencia de trabajo fijada en 20 kHz. Las condiciones de extracción se realizan según el estudio de Montero-Calderón et al. (2019):

- 400 W de potencia,
- 80 % (v/v) de ciclo de trabajo y
- $< 40^{\circ}\text{C}$ de temperatura de extracción
- ratio 1:10 (g/mL)

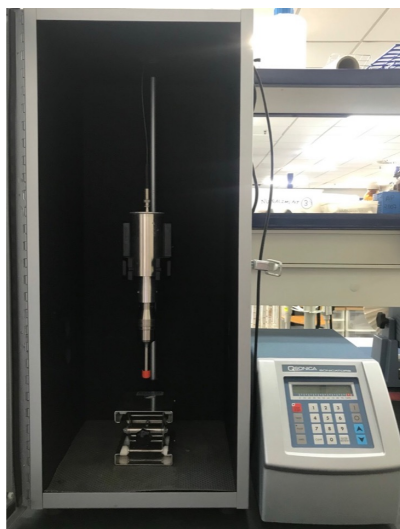


Figura 17. Equipo de ultrasonidos empleado en el estudio

Se pesan 6 g de piel troceada de mandarina y se colocan en un vaso de precipitado con 60 mL de etanol acuoso (50 %, v/v). Las muestras se tratan por ultrasonidos durante tres tiempos de extracción: 5, 15 y 30 min. Después de los tratamientos, los extractos se filtran a través de un filtro de membrana Whatman no. 1 y se recogen en un tubo graduado protegido de la luz. Todos los extractos se almacenan a -20 °C hasta el momento de su análisis.

3.2. ANÁLISIS DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

3.2.1. Conductividad

Instrumentación y material:

- Conductímetro HANNA HI 5321 (Woonsocket RI, EE. UU.).
- Material de uso corriente en el laboratorio.

Reactivos:

- Disoluciones de calibración: 84, 1413 y 12880 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (conservar a 4 °C).

Modo operatorio:

Se inicia con la calibración del instrumento empleando las disoluciones de calibración a temperatura ambiente. Se toman 30 mL de la muestra en un tubo graduado y se procede a la medida de la conductividad. En el caso de los extractos de piel, la conductividad se mide antes (C0) y después (C1) de la extracción control y de los tratamientos con ultrasonidos, y con estos valores se calcula el incremento de conductividad (IC) siendo la diferencia entre ambos (C1 – C0). Las mediciones se realizan por duplicado y los resultados se expresan en mS/cm.

3.2.2. °Brix: Sólidos solubles totales

Instrumentación y material:

- Refractómetro digital Atago MASTER-T (Atago Company Ltd., Tokio, Japón)
- Material de uso corriente en el laboratorio

Modo operatorio:

Se añaden un par de gotas de la muestra homogenizada sobre el portamuestras del instrumento cuidando de cubrir toda la superficie. Se cierra el prisma, se enfoca y se anota la medida. Los sólidos solubles totales se miden como °Brix. La medida se realiza por duplicado para cada muestra de zumo y de los extractos de la piel.

3.2.3. pH

Instrumentación y material:

- pH-metro Sension TM + MM 340 (HACH-LANGE, S.L.U., Barcelona, España).
- Material de uso corriente en el laboratorio.

Reactivos:

- Disoluciones amortiguadoras a pH 4, 7 y 10 (conservar a 4 °C)

Modo operatorio:

La determinación se basa en una medición potenciométrica a 25 °C. Debe realizarse la calibración empleando las disoluciones amortiguadoras (pH 4, 7 y 10) a temperatura ambiente. Se toman 25 mL de la muestra problema y se procede a la medida del pH. Las medidas se realizan por duplicado.

3.2.4. Color

Instrumentación y material:

- Colorímetro espectrofotométrico Hunter Labscan II (Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA., EE. UU.)
- Cubeta de cuarzo de 5,4 x 5,7 x 1,9 cm de largo, alto y ancho, respectivamente.

Modo operatorio:

El color se mide utilizando un colorímetro controlado por ordenador que calcula las ordenadas de color mediante el programa EasyMatch® QC *software* v. 4.81, a partir del espectro de reflectancia en base a la metodología triestímulo planteada por Clydesdale & Ahmed (1978). Los resultados se expresan de acuerdo con el sistema de la Comisión Internacional d'Eclairage (CIE-L*a*b*) con referencia al iluminante D65 y con un ángulo visual de 10°. Los parámetros que se determinan automáticamente son:

- L* (luminosidad) = de negro (0) a blanco (100)
- a* = color de rojo (positivo) a verde (negativo)
- b* = color de amarillo (positivo) a azul (negativo)

Como se observa en la Figura 18, las coordenadas a^* y b^* (+100 a -100) permiten ubicar el color de la muestra en un punto perpendicular al eje L dentro de un plano cromático (CIE, 1978).

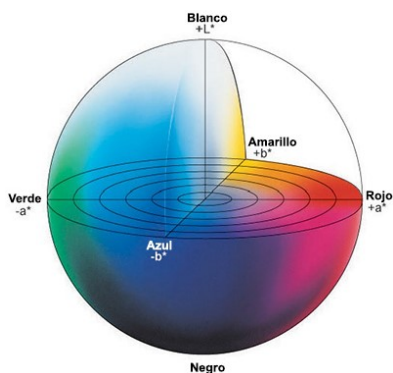


Figura 18. Gráfico de las coordenadas de medición de color (Comisión Internacional d'Eclairage)

Método operatorio:

Una vez calibrado el equipo se procede a la medida de color de las muestras. Las medidas se realizan por triplicado.

3.3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

3.3.1. Compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) del zumo y los extractos de piel de mandarinas se determina de acuerdo con el método descrito de Singleton & Rossi (1965), basado en una reacción colorimétrica de oxidación/reducción del fenol, empleando el reactivo de *Folin-Ciocalteu*.

Reactivos:

- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) 99,5%, VWR Chemicals (Leuven, Bélgica). Se prepara una disolución al 2% (p/v) con agua destilada. La solución se conserva en una botella ámbar a temperatura ambiente.

- *Folin-Ciocalteu* , Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Se prepara una disolución al 50% (v/v) con agua destilada. Esta solución se mantiene un mes en nevera en una botella ámbar.
- Ácido gálico 99%, Panreac (Barcelona, España). La disolución madre (10 mg/mL) se prepara por disolución de 250 mg de ácido gálico en 20 mL de agua destilada y 5 mL de etanol. Esta solución se conserva en refrigeración y protegida de la luz, siendo estable hasta un mes en estas condiciones. La disolución de trabajo (1 mg/mL) se prepara diariamente. Con esta disolución se prepara la curva de calibrado de concentraciones entre 0 y 0,8 mg/mL ($n = 7$), por dilución de una cantidad necesaria de ácido gálico (solución de trabajo) en agua destilada.
- Etanol absoluto grado análisis, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos).

Instrumentación y material:

- Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 2 (Perkin Elmer, EE.UU.).
- Cubetas, DELTALAB (Barcelona, España).
- Material de uso corriente en laboratorio.

Modo operatorio:

Se introducen en tubos de ensayo 100 μ L de muestra y se adicionan 3 mL de la disolución de carbonato de sodio 2% (p/v), se añaden 100 μ L del reactivo de *Folin-Ciocalteu* al 50% (v/v) y se mezcla con la ayuda de un vórtex. La mezcla se deja en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad. Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia a $\lambda=765$ nm. El análisis se realiza por triplicado. La determinación cuantitativa se realiza por interpolación de los valores de las muestras en una curva de calibrado con ácido gálico y el contenido de CFT se expresa como mg de ácido gálico equivalente (GAE, *gallic acid equivalent*)/100 mL de zumo y mg GAE/100 g de peso fresco (PF) de piel.

3.3.2. Flavonoides Totales

El contenido de flavonoides totales (FT) de las muestras se determina según el método descrito por Zhishen et al. (1999) y optimizado por Alberti et al. (2014) con ligeras modificaciones.

Reactivos:

- Nitrito de sodio (NaNO_2) $\geq 97,0\%$, VWR Chemicals (Leuven, Bélgica). Se prepara una disolución de 0,5 mol/L con agua destilada. La disolución se conserva en una botella ámbar a temperatura ambiente.
- Cloruro de aluminio (AlCl_3) $>95\%$, Acofarma (Terrasa, Barcelona). Se prepara una disolución 0,3 mol/L con agua destilada. La disolución se conserva en una botella ámbar a temperatura ambiente.
- Hidróxido de sodio (NaOH) $\geq 98\%$, Panreac (Barcelona, España). Se prepara una disolución 1 mol/L con agua destilada. La disolución se conserva en una botella ámbar a temperatura ambiente.
- Catequina $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Se emplea como estándar para la curva de calibrado. La disolución madre de catequina (2 mg/mL) se prepara por disolución 100 mg del estándar en 45 mL de agua destilada y 5 mL de etanol. Esta disolución se conserva en refrigeración y protegida de la luz, siendo estable hasta un mes. La disolución de trabajo (0,2 mg/mL) se prepara diariamente, para ello se toma 1 mL de la disolución madre y se lleva a 10 mL con agua destilada. Con esta disolución se prepara la curva de calibrado con concentraciones entre 0 y 0,20 mg/mL ($n = 7$), por dilución de una cantidad necesaria del estándar de catequina (solución de trabajo) en agua destilada.
- Etanol absoluto grado análisis, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos). Se prepara una disolución de etanol al 30% (v/v) con agua destilada.

Instrumentación y material:

- Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 2 (Perkin Elmer, EE.UU.).
- Cubetas, DELTALAB (Barcelona, España).
- Material de uso corriente en el laboratorio.

Modo operatorio:

Se mezcla 100 μL de la muestra, adecuadamente diluida, con 1,088 mL de etanol (30%, v/v) y 48 μL de la disolución de nitrito de sodio (0,5 mol/L) y se agita en vórtex. Después de 5 min, se añaden 48 μL de cloruro de aluminio (0,3 mol/L). La mezcla se agita y se deja durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregan 320 μl de hidróxido de sodio (1 mol/L) y se agita la mezcla nuevamente. Se mide la absorbancia a $\lambda=510$ nm inmediatamente. El análisis se realiza por triplicado. La determinación cuantitativa se realiza por interpolación de los valores de las muestras en la curva de calibrado y los resultados de FT se expresan como mg de catequina equivalente (CE, *catequin equivalent*)/100 mL de zumo y mg CE/100g PF de piel.

3.3.3. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico (AA) es la principal isoforma de la vitamina C, presente en muestras de mandarina (Cebadera, 2017). La cuantificación de AA se realiza por volumetría (AOAC, 2000).

Reactivos:

- Disolución 2,6-diclorofenolindofenol (2,6-DCPI) >99%, Panreac (Barcelona, España) y sodio hidrogenocarbonato (NaHCO_3) >99,7%, Scharlau (Senmanat, España). Se prepara una disolución de 0,25 mg/mL de 2,6-DCPI- NaHCO_3 , para ello se disuelven 62,5 mg de 2,6-DCPI en 50 mL de disolución de NaHCO_3 (se disuelven 52,5 mg en 50 mL de agua

destilada), se agita y se completa a 250 mL con agua destilada. Se filtra y se conserva en nevera (4 °C).

- Disolución extractante de ácido metafosfórico (HPO_3) 99,0%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y ácido acético 96,0% (J.T. Baker Chemical Co, Deventer, Países Bajos). La disolución de HPO_3 -ácido acético se prepara por disolución de 3 g de HPO_3 en 8 mL de ácido acético, se lleva a 100 mL con agua destilada y se filtra.
- Ácido L-ascórbico 99,0%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Se emplea como estándar de 1 mg/mL. Para ello se disuelven 10 mg de ácido ascórbico en 10 mL de la disolución HPO_3 -ácido acético. Esta disolución se conserva en nevera (4 °C) y protegida de la luz.

Instrumentación y material:

- Material de uso corriente en el laboratorio.

Modo operatorio:

El método se basa en la reacción por decoloración de la disolución 2,6-DCPI- NaHCO_3 (azul) por el ácido ascórbico de la muestra. Para ello se mezcla 1 mL de la muestra con 1 mL de la disolución extractante (HPO_3 -ácido acético). La mezcla se titula con la disolución 2,6-DCPI- NaHCO_3 hasta el cambio de color (de azul a rosa). El análisis se realiza por duplicado y los resultados se expresan como mg AA/100 mL de zumo y mg AA/100g PF de piel.

3.3.4. Carotenoides totales

La extracción de carotenoides totales (CT) del zumo y de los extractos se realiza de acuerdo con el método descrito por Buniowska et al. (2015), con algunas modificaciones.

Reactivos:

- Hexano grado análisis, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos).
- Acetona grado análisis, VWR Chemicals (Leuven, Bélgica).
- Etanol absoluto grado análisis, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos).

Se prepara una mezcla con hexano, acetona y etanol en una proporción 50:25:25 (v/v/v).

Instrumentación y material:

- Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 2, Perkin Elmer (EE.UU.).
- Cubeta de cuarzo, Hellma Analytics (Müllheim, Alemania).
- Centrífuga 5810 R, Eppendorf (Alemania)
- Material de uso corriente en el laboratorio

Modo operatorio:

Se homogenizan 2 mL de muestra con 5 mL de la disolución de extracción (hexano/acetona/etanol, 50:25:25, v/v/v) en tubos de cristal. Se centrifuga durante 5 min a 4000 r.p.m a 5 °C. Se recupera la fase superior de hexano (que contiene los carotenoides) en un tubo ámbar y se mide la absorbancia a $\lambda=450$ nm. El contenido de CT se calcula de acuerdo con De Ritter & Purcell (1981) utilizando el coeficiente de extinción de β -caroteno, $E^{1\%}=2505$. El análisis se realiza por triplicado y los resultados se expresan como μg de β -caroteno/100 mL de zumo y μg de β -caroteno/100g PF de piel.

3.4. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante total de las muestras se determina mediante métodos *in vitro* DPPH y TEAC.

3.4.1. Método DPPH

La capacidad antioxidante se determina por el método del secuestro del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) según el método descrito por Brand-Williams et al. (1995) (Figura 19). El radical DPPH[•] puede reducirse mediante reacciones con compuestos antioxidantes que pueden donar hidrógeno, para crear la forma no radical (Kumaran & Karunakaran, 2007). La piel de mandarina se considera un fuerte donante de hidrógeno antioxidante (Singanusong et al., 2015).

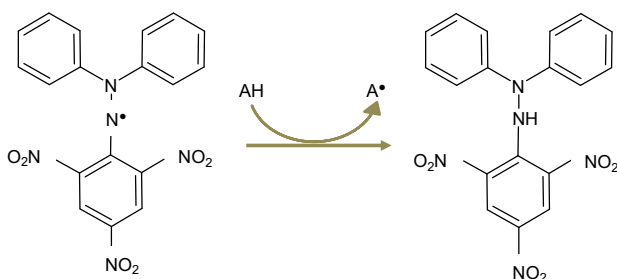


Figura 19. Reacción del radical DPPH[•] por captación del antioxidante (adaptado de Cebadera, 2017)

Reactivos:

- Trolox (ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) 97%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Se disuelven 5 mg del reactivo en 1 mL de metanol para obtener una disolución 20 mM, y a partir de esta se realiza una dilución 1/10 con metanol para tener una disolución 2 mM. Estas diluciones se conservan a -20 °C. Con esta disolución se

- prepara una curva de calibrado con concentraciones entre 0 y 0,8 mM (n=7), por dilución de una cantidad necesaria del Trolox 2 mM en metanol.
- 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*), Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Se prepara una disolución 0,06 mM. Para ello se disuelven 2,3 mg del radical en 100 mL de metanol. Una vez preparada la disolución es estable durante 2 días a temperatura ambiente.
 - Metanol grado análisis, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos).

Instrumentación y material:

- Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 2 (Perkin Elmer, EE.UU.).
- Cubetas, DELTALAB (Barcelona, España).
- Material de uso corriente en el laboratorio.

Modo operatorio:

Se añaden 1,45 mL de radical DPPH* (0,06 mM) en la cubeta de medida y se mide la absorbancia inicial a $\lambda=515$ nm (A_0). A continuación, se añaden 50 μ l de la muestra adecuadamente diluida y se anota el valor de absorbancia a los 30 min (A_1). El porcentaje de inhibición (% I) se calcula usando la siguiente ecuación:

$$\%I = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde A_0 es la absorbancia del control (radical DDPH) y A_1 es la absorbancia en presencia de la muestra. El análisis se realiza por triplicado. La determinación cuantitativa se realiza por interpolación de los valores de las muestras en la curva de calibrado y los resultados se expresan como mM de Trolox equivalente (mM TE) en las muestras de zumo y mM TE/100g PF de piel.

3.4.2. Método TEAC

Se utiliza el método descrito por Re et al. (1999) modificado por Zulueta et al. (2009), basado en la capacidad de los antioxidantes de una muestra para inhibir el radical $ABTS^{+\bullet}$ en comparación con un patrón antioxidante de referencia (Trolox) (véase Figura 20). El radical $ABTS^{+\bullet}$ reacciona con compuestos antioxidantes de las muestras y puede usarse para determinar moléculas hidrofílicas y lipofílicas (Prior et al., 2005).

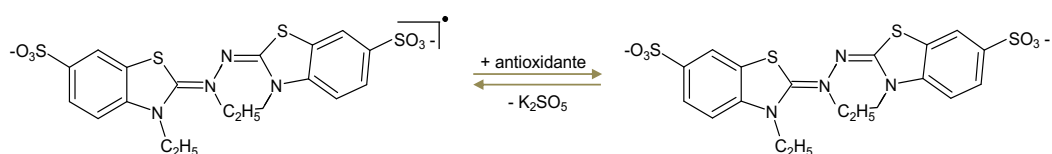


Figura 20. Reacción del radical $ABTS^{+\bullet}$ por captación del antioxidante durante el ensayo (adaptado de Zulueta et al., 2009).

Reactivos:

- Sal de diamonio de 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) $\geq 98\%$. Se prepara una disolución 7 mM, para ello se disuelven 0,096 mg de ABTS en 25 mL agua destilada.
- Persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 99,0%, Panreac (Barcelona, España). Se prepara una disolución 140 mM, para ello se disuelven 0,96 g en 25 mL con agua destilada.

El radical $ABTS^{+\bullet}$ se prepara mezclando 440 μ L de $K_2S_2O_8$ (140 mM) con 25 mL de ABTS (7mM). La mezcla se deja reposar entre 12 y 16 h a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad. La solución de trabajo se prepara por dilución del radical $ABTS^{+\bullet}$ en etanol hasta que su absorbancia a $\lambda=734$ nm sea $0,70 \pm 0,02$ a 30 °C.

- Trolox (ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) 97%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Este reactivo se emplea como

una disolución estándar antioxidante de 5 mM. Para ello se disuelven 31,25 mg de Trolox en 25 mL de etanol y se conserva a -20 °C. Con esta solución se prepara una curva de calibrado con concentraciones entre 0 y 350 μ M (n=8), por dilución de una cantidad necesaria del Trolox 5 mM en etanol.

- Etanol absoluto grado análisis, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos).

Instrumentación y material:

- Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 2 (Perkin Elmer, EE.UU.) conectado a un baño termostatzado JULABO 5B (Seelbach/Black Forest, Alemania) a 30 °C.
- Cubetas, DELTALAB (Barcelona, España).
- Material de uso corriente en el laboratorio

Modo operatorio:

El ensayo se inicia con la medición de la absorbancia inicial de 2 mL del radical ABTS^{•+} en la cubeta (A_0), se añaden directamente 100 μ L de la muestra adecuadamente diluida. La mezcla se deja reposar durante 3 min y se mide la absorbancia final (A_1). El porcentaje de inhibición (% I) se calcula usando la fórmula de la Ecuación 1. El análisis se realiza por triplicado. La determinación cuantitativa se realiza por interpolación de los valores de las muestras en la curva de calibrado y los resultados se expresan como mM TE en las muestras de zumo y mM TE/100g PF de piel.

3.5. CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La puesta a punto y validación de los métodos que se describen a continuación se detalla en la sección 4.3.

3.5.1. Método de purificación para la determinación de compuestos fenólicos en los extractos de piel mandarina

El procedimiento para purificar los extractos de piel de mandarina y hacer posible la determinación de los polifenoles se basa en un método de Extracción en Fase Sólida (EFS) empleando cartuchos C₁₈ de 200 mg, según Gonzales et al. (2015) con algunas modificaciones.

Reactivos:

- Ácido fórmico grado HPLC, PanReac AppliChem (Darmstadt, Alemania).
- Ácido clorhídrico (HCl) grado análisis, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos). Se prepara una solución metanol:HCl 0.6 M, 75:25, v/v.
- Metanol (MeOH) grado HPLC, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos). Se prepara una solución metanol:ácido fórmico, 99,9: 0,1, v/v.
- Acetona grado análisis, VWR Chemicals (Leuven, Bélgica).
- Acetonitrilo grado HPLC, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos).
- Acetato de etilo grado análisis, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos).
- Sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄) 98%, Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, España).
- Sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) 99,0%, PanReac AppliChem (Barcelona, España).

- Cloruro de sodio (NaCl) 99,5%, Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, España).
- Amina primaria-secundaria (PSA) (50 μ m, 70Å), Merck KGaA, Darmstadt, Alemania.
- Agua ultrapura (18,2 M Ω cm). Se obtiene mediante el sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia). Se prepara una solución agua:ácido fórmico, 99,9:0,1, v/v.

Instrumentación y material:

- Cartuchos C₁₈ (200 mg/6 mL) (55 μ m, 70Å), Phenomenex (Steinheim, Alemania).
- Cartuchos de estirenodivinilbenceno (200 mg/6 mL) (55 μ m, 70Å), Scharlau (Sentmenat, Barcelona).
- Tubos DisQUE™ (2 mL) con 150 mg MgSO₄/25 mg PSA/25 mg C₁₈ (WATERS, Irlanda).
- Sistema distribuidor de vacío con capacidad de hasta 12 cartuchos (Phenomenex, Steinheim, Alemania), conectado a un sistema de vacío controlado.
- Filtros de membrana de nailon de 0,22 μ m, Millex, Millipore (Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda).
- Viales ámbar para análisis cromatográfico, 2 mL de capacidad, Agilent Technologies (Estados Unidos).
- Material de uso corriente en el laboratorio.

Modo operatorio:

Se diluyen 5 mL del extracto obtenido por ultrasonidos hasta 20 mL con agua:ácido fórmico (99,9:0,1, v/v). Los cartuchos se pre-acondicionan 2 veces con 3 mL de metanol y a continuación 2 veces con 3 mL de agua, antes de pasar las muestras (20 mL). Los disolventes y las muestras se dejan reposar en las

jeringas de carga durante 2 minutos antes de hacerlos pasar a través de los cartuchos de fase sólida mediante el uso del sistema de vacío. Posteriormente, los cartuchos se lavan con 5 mL de agua:ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) y los polifenoles retenidos en la fase sólida, se eluyen con 3 mL de metanol:ácido fórmico (99,9:0,1, v/v). Todo el proceso se realiza aplicando unas condiciones de vacío que determinen un goteo de una o dos gotas por segundo. Los extractos metanólicos obtenidos se someten a evaporación bajo corriente ligera de nitrógeno, se re-disuelven con 1 mL de metanol:HCl 0.6 M (75:25, v/v), se filtran con filtro de 0,22 μm y se guardan en viales ámbar en refrigeración para el análisis cromatográfico posterior. Todo el proceso se describe en la Figura 21.

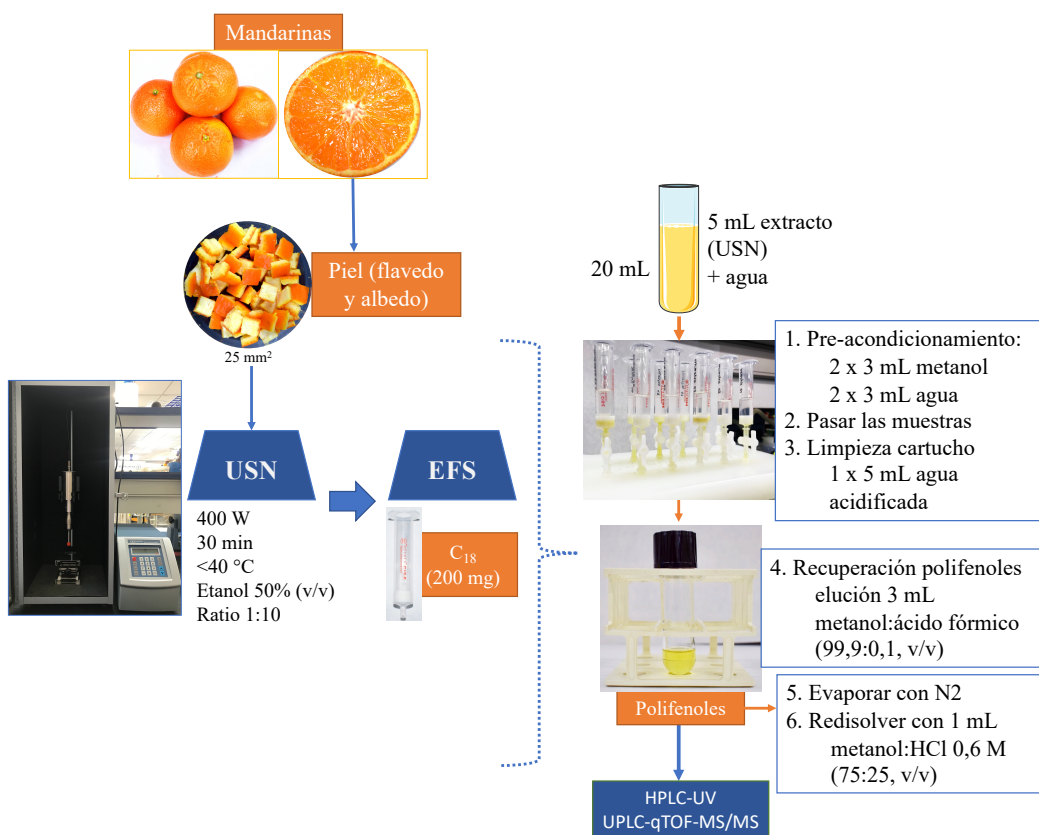


Figura 21. Proceso de análisis de polifenoles en piel de mandarina. USN: ultrasonidos, EFS: extracción en fase sólida, C₁₈: octadecil sílice.

3.5.2. Detección de compuestos fenólicos por HPLC-UV

Los compuestos fenólicos de los extractos purificados de piel de mandarina se analizan por cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV) según el método descrito por Montero-Calderon et al. (2019), con algunas modificaciones.

Reactivos:

- Acetonitrilo grado HPLC, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos).
- Agua ultrapura (18,2 MΩ cm). se obtiene mediante el sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia).
- Ácido fórmico grado HPLC, PanReac AppliChem (Darmstadt, Alemania).
- Patrones de ácido 4-hidroxibenzoico (99%), catequina ($\geq 99,0\%$), ácido vanílico ($\geq 97,0\%$), ácido clorogénico ($\geq 95,0\%$), narirutina ($\geq 98\%$), ácido cafeico ($\geq 99,0\%$), naringina ($\geq 95,0\%$), hesperidina ($\geq 97,0\%$), ácido p-cumárico ($\geq 98,0\%$), ácido ferúlico ($\geq 99,0\%$), naringenina ($\geq 95\%$), kaempferol ($\geq 90\%$), hesperitina ($\geq 98,0\%$) y ácido transcinámico ($\geq 98,0\%$), Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Patrones de agigenina (96,86%), quercitina dihidrato (97,02%) y rutina trihidrato (97,67%), HWI Analytik GmbH (Ruelzheim, Alemania).
- Metanol (MeOH) grado HPLC, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos). Se prepara una solución metanol:ácido fórmico (99,8:0,2; v/v).
- Ácido clorhídrico (HCl) grado análisis, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos). Se prepara una solución metanol:HCl 0.6 M (75:25, v/v).

Preparación de la disolución estándar de patrones:

- Se preparan disoluciones 'madre' de patrones de polifenoles a una concentración de 400 µg/mL. Para ello se disuelven 2 mg del patrón en 5

mL de metanol:ácido fórmico (99,8:0,2; v/v). Después de agitar con vórtex, se almacenan a -20°C.

- Para obtener las disoluciones de trabajo (50 µg/mL), se diluyen 0,625 mL de cada disolución patrón 'madre' en 5 mL de metanol:HCl 0.6 M (75:25, v/v).

Para las curvas de calibrado, en un intervalo entre 0 y 400 µg/mL dependiendo del patrón, se realizan diluciones seriadas en metanol:HCl 0.6 M (75:25, v/v) hasta la concentración deseada. Estas disoluciones se filtran (0,22µm, Millex de Millipore) antes de ser inyectadas en el cromatógrafo.

Instrumentación y material:

- Sistema HPLC Agilent Technologies 1120 Compact LC (Estados Unidos) (Figura 22a) equipado con detector de UV.
- Columna C₁₈ (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm), Phenomenex (Estados Unidos).
- Filtros de membrana de nailon de 0,22µm, Millex de Millipore (Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda).
- Viales ámbar para análisis cromatográfico, 2 mL de capacidad, Agilent Technologies (Estados Unidos).
- Material de uso corriente en el laboratorio.

Modo operatorio:

- Preparación de las fases móviles

En los antecedentes bibliográficos (Tabla 5) se muestra que la fase móvil más empleada, en la determinación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida, es una solución polar acidificada y un solvente orgánico de menor polaridad. Se emplea como solvente polar una solución acuosa acidificada (agua:ácido fórmico, 95:5, v/v) como Fase A y

acetonitrilo diluido en la solución polar (acetonitrilo:Fase A, 60:40, v/v) como Fase B. La distribución del gradiente de las fases móviles (A y B) se detalla en la Tabla 9.

Tabla 9. Gradiente de fase móvil para la determinación de polifenoles por HPLC-UV

Tiempo min	Fase A	Fase B
0	100	0
10	85	15
20	82	18
50	0	100
70	0	100
75	100	0
80	100	0

- Método cromatográfico

El análisis se realiza con las siguientes condiciones:

- Flujo: 0,8 mL/min
- Absorbancia: 280 nm
- Volumen de inyección: 20 µL
- Tiempo: 80 min
- Temperatura de columna: 25 °C

La identificación de los compuestos fenólicos se realiza por comparación de los tiempos de retención de los estándares de patrones en las mismas condiciones cromatográficas.

3.5.3. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por UPLC-qTOF-MS/MS

Para identificar y cuantificar los compuestos fenólicos en muestras de piel de mandarina se emplea un sistema de cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a un espectrómetro de masas híbrido con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (UPLC-qTOF-MS/MS).

Reactivos:

- Metanol grado HPLC, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos).
- Agua ultrapura (18,2 MΩ cm). Se obtiene mediante el sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia).
- Ácido fórmico grado HPLC, PanReac AppliChem (Darmstadt, Alemania).

Preparación de la solución estándar de patrones

- véase apartado 3.5.2.

Instrumentación y material:

- Sistema Triple-TOF™ 5600 LC/MS/MS (SCIEX) (Figura 22b).
- Columna ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 μm), Waters (Estados Unidos)
- Filtros de membrana de nailon de 0,22μm, Millex de Millipore (Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda).
- Viales ámbar para análisis cromatográfico, 2 mL de capacidad, Agilent Technologies (Estados Unidos).
- Material de uso corriente en el laboratorio.



(a)

(b)

Figura 22. Equipos cromatográficos HPLC (a) y UPLC (b) empleados en el estudio.

Modo operatorio:

- Preparación de las fases móviles

Se emplea como solvente polar agua:ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) como Fase A y metanol: ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) como Fase B. El gradiente de concentración de las fases móviles (A y B) se detalla en la Tabla 10.

Tabla 10. Gradiente de fase móvil para la determinación de polifenoles por UPLC-qTOF-MS/MS

Tiempo min	Fase A	Fase B
0	70	30
5	70	30
12	5	95
18	5	95
18,5	70	30
20	70	30

- Método cromatográfico:

Se utiliza un sistema UPLC-qTOF-MS/MS. El fragmentador de MS emplea un método de adquisición dependiente de información con un tipo de exploración de reconocimiento (TOF-MS) y un tipo de exploración dependiente (ion producto) usando -30V de energía de colisión. La adquisición de los datos se realiza en modo negativo, en un rango de masa/carga de 100-950 m/z , utilizando la siguiente configuración del instrumento:

- Gas de fuente de iones 1: 50 psi
- Gas de fuente de iones 2: 50 psi
- Cortina de gas 1: 25 psi
- Voltaje de pulverización de iones: -4500 V
- Energía de colisión: -30 V
- Temperatura: 450 °C
- Flujo: 0,4 mL/min
- Volumen de inyección: 5 μ L
- Tiempo: 25 min

La calibración automatizada se realiza utilizando un sistema de suministro de calibrador externo que infunde la solución de calibración. Para la recta de calibrado se utilizan estándares de polifenoles entre 1 y 5 μ g/mL. Los datos se evalúan cualitativamente mediante el software PeakViewTM, y se utiliza el software Multiquant v. 3.0.3 para cuantificar los compuestos fenólicos detectados en base a la biblioteca de compuestos y el método puesto a punto en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València. Los resultados se expresan como μ g/g de PF.

3.6. CARACTERIZACIÓN DE CAROTENOIDES

Se realiza una revisión bibliográfica de los métodos de extracción de carotenoides en muestras de piel de cítricos, principalmente mandarinas. Se realizan ensayos de extracción líquido-líquido empleando solventes o mezclas de solventes, en diferentes volúmenes y etapas de extracción. Asimismo, se realizan ensayos con y sin proceso de saponificación. La puesta a punto de los métodos de extracción y saponificación se detalla en la sección 4.4.2.

3.6.1. Método de extracción y saponificación para la determinación de carotenoides en los extractos de piel de mandarina

El procedimiento de extracción de carotenoides se basa en una extracción líquido-líquido, descrito por Lee et al. (2001) con algunas modificaciones. El método de saponificación de los extractos de piel de mandarina para la determinación y caracterización de los carotenoides se realiza según el método descrito por Cortés et al. (2004) con algunas modificaciones.

Reactivos:

- Dietil-éter, grado análisis, Labkem (Barcelona, Spain).
- Metanol (MeOH) grado HPLC, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos).
- Hidróxido de potasio (KOH) 85,0%, Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, España). Se prepara una solución de KOH (0,5 M) en metanol.
- Cloruro de sodio (NaCl) 99,5%, Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, España).
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) 99,0%, PanReac AppliChem (Barcelona, España).
- Agua ultrapura (18,2 $\text{M}\Omega$ cm). Se obtiene mediante el sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia).

Instrumentación y material:

- Filtros de membrana de nailon de 0,22 μ m, Millex, Millipore (Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda).
- Viales ámbar para análisis cromatográfico, 2 mL de capacidad, Agilent Technologies (Estados Unidos).
- Material de uso corriente en el laboratorio.

Modo operatorio:

Se mezclan 5 mL de extracto obtenido por ultrasonidos de piel de mandarina y 3 mL de dietil-éter durante 1 min en un mezclador vórtex y se centrifugan a 4000 r.p.m., 4 °C durante 5 min. El sobrenadante de dietil-éter (que contiene los carotenoides) se recupera en un tubo ámbar. El extracto resultante se mezcla con 0,5 mL de dietil-éter en vórtex durante 1 min y se centrifuga en las mismas condiciones. Este proceso se repite dos veces. Los sobrenadantes de dietil-éter se recuperan en el mismo tubo. Se elimina la fase sólida resultante. Los extractos finales se reducen con N₂ hasta 2 mL.

La saponificación de carotenoides de extractos de piel de mandarina se inicia mezclando 2 mL de extracto de carotenoides con 2 mL de KOH (0,5 M) en metanol durante 30 min con agitación magnética. A continuación, se añaden 4 mL de 4 mL de dietil-éter y se agita. Para la purificación, la mezcla se lleva a un embudo de decantación y se lava 2 veces con 8 mL de NaCl al 10% (p/v) y 1 vez con 8 mL de agua desionizada. Las fases acuosas se eliminan. Se recoge el sobrenadante, se agrega 1 g de Na₂SO₄, se agita durante 1 min y se centrifuga a 4000 r.p.m., 4 °C durante 5 min.

La fase orgánica se recoge en un tubo ámbar y se evapora bajo corriente de N₂. El residuo se disuelve con un 1 mL de fase móvil B (véase sección 3.6.2). Las muestras se filtran con un filtro de 0,22 μ m antes del análisis cromatográfico. El proceso se describe en la Figura 23.

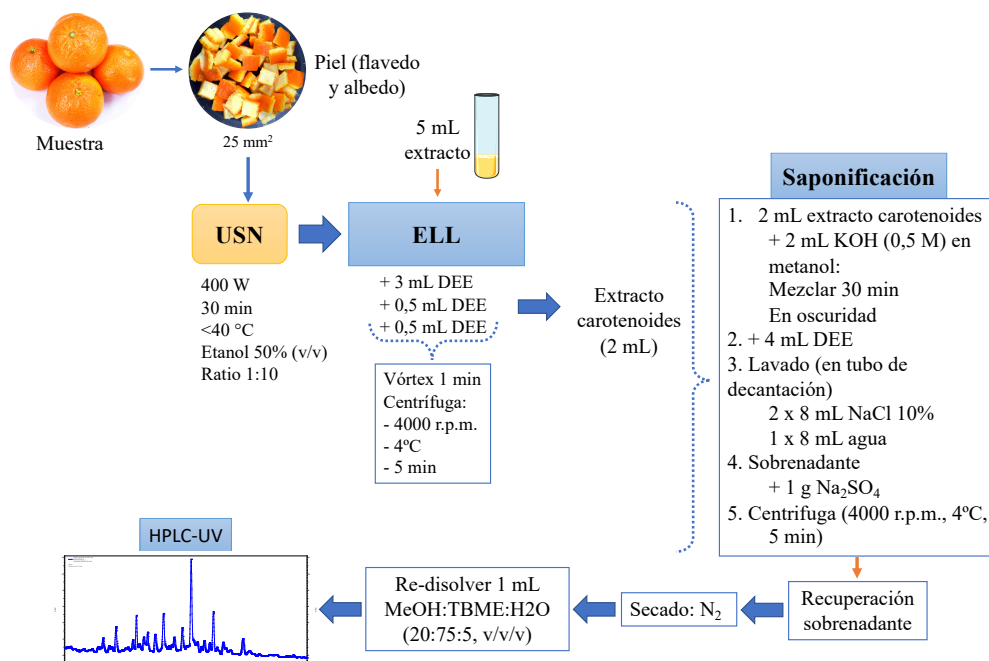


Figura 23. Proceso de análisis de carotenoides en piel de mandarina. USN: ultrasonidos, ELL: extracción líquido-líquido, DEE: dietil-éter, TBME: tert-butil-metil-éter.

3.6.2. Detección de carotenoides por HPLC-UV

Los compuestos carotenoides de los extractos de piel de mandarina se analizan por HPLC-UV según el método descrito por Agócs et al. (2007) con algunas modificaciones.

Reactivos:

- Agua ultrapura (18,2 MΩ cm), se obtiene mediante el sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia).
- Butilhidroxitolueno (BHT) (2,[6]-Di-ter-Butil-p-cresol), Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Cloroformo grado análisis, Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, España). Se prepara una solución cloroformo-BHT 0,1% (v/v).

- Metanol (MeOH) grado HPLC, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos).
- Patrones de β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina, Extrasynthese - GENAY Cedex (Francia).
- Ter-butil-metil-éter (TBME) grado HPLC, J.T. Baker Chemical Co. (Deventer, Países Bajos).

Preparación de la disolución estándar de patrones:

- Se preparan disoluciones 'madre' de patrones de carotenoides a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$. Para ello se disuelven 1 mg del patrón en 5 mL de cloroformo-BHT 0,1% (v/v). Después de agitar con vórtex, se almacenan a -20°C .
- Para obtener las disoluciones de trabajo (10 $\mu\text{g/mL}$), se diluyen 50 μL de cada disolución patrón 'madre' en 1 mL de cloroformo-BHT 0,1% (v/v). Se calcula la concentración para cada solución patrón tras aplicar la siguiente ecuación:

$$C(\mu\text{g/mL}) = [A * V * 1000 / E^{1\%} * 100] \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde C es concentración, A es absorbancia, V es volumen y $E^{1\%}$ es coeficiente de extinción (véase Tabla 11).

Tabla 11. Coeficientes de extinción de los patrones de carotenoides

Carotenoide	Solvente	λ (nm)	$E^{1\%}$
Luteína	etanol	445	2550
Zeaxantina	éter de petróleo	449	2348
β -criptoxantina	éter de petróleo	449	2386
β -caroteno	cloroformo	465	2396
Licopeno	éter de petróleo	470	3450

Fuente: Rodríguez-Amaya, (2001)

λ : longitud de onda; $E^{1\%}$: coeficiente de extinción.

Para la curva de calibrado se diluyen las disoluciones de trabajo en cloroformo-BHT 0,1% (v/v) hasta la concentración deseada en un intervalo entre 0,025 y 1 $\mu\text{g/mL}$. Estas disoluciones se filtran (0,22 μm , Millex de Millipore) antes de ser inyectadas en el cromatógrafo.

Instrumentación y material:

- Sistema HPLC Agilent Technologies 1120 Compact LC (Estados Unidos) (Figura 22a) equipado con detector de UV.
- Columna YMC Carotenoid (150 x 3,0 mm, tamaño de partícula 3 μm), YMC (Estados Unidos).
- Filtros de membrana de nailon de 0,22 μm , Millex de Millipore (Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda).
- Viales ámbar para análisis cromatográfico, 2 mL de capacidad, Agilent Technologies (Estados Unidos).
- Material de uso corriente en el laboratorio.

Modo operatorio:

- Preparación de las fases móviles

Para la selección del gradiente de fase móvil se tienen en cuenta características propias de los solventes y de los patrones a emplear. En el caso del solvente principal, se selecciona el metanol dado que es levemente orgánico y presenta poca viscosidad, permitiendo buena solubilidad de los carotenoides. El TBME favorece la elución de los compuestos más apolares, sin embargo se observa mejor resolución de picos cuando éste se emplea junto a un solvente más polar como el metanol y agua.

Se emplea como solvente polar una solución de metanol 100% como Fase A y MeOH:TBME:H₂O (20:75:5, v/v/v) como Fase B. La distribución del gradiente de las fases móviles (A y B) se detalla en la Tabla 12.

Tabla 12. Gradiente de fase móvil para la determinación de carotenoides por HPLC-UV.

Tiempo min	Fase A	Fase B
0	99	1
30	66	34
35	66	34
50	40	60
55	1	99
60	99	1
65	99	1

- Método cromatográfico

El análisis se realiza con las siguientes condiciones:

- Flujo: 0,9 mL/min
- Absorbancia: 450 nm
- Volumen de inyección: 20 μ L
- Tiempo: 65 min
- Temperatura de columna: 30 °C

La identificación de los compuestos carotenoides se realiza por comparación de los tiempos de retención de los estándares de patrones en las mismas condiciones cromatográficas.

RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN ZUMO DE TRES VARIEDADES DE MANDARINAS HÍBRIDAS

Las mandarinas incluyen una serie de variedades comerciales, como las mandarinas Satsuma y Clementina entre otras, siendo las últimas mandarinas (*C. clementina* Hort. Ex Tan) las principales variedades cultivadas en la Comunidad Valenciana. Por otro lado, dado que las principales variedades se cosechan en un período de tiempo específico, los productores de cítricos han introducido cultivos de mandarina más resistentes frente a factores ambientales (variedades de híbridos y mandarinas tangor) para proporcionar mandarinas durante un periodo más largo de tiempo.

Numerosos estudios describen la extracción de compuestos bioactivos de la mayoría de los zumos de variedades de mandarina, por el contrario, pocos estudios han analizado las características físico-químicas y nutricionales de mandarinas híbridas. Por otro lado, estudios recientes se centran en aspectos agrarios y en la calidad organoléptica de la producción de cítricos híbridos (Fernández et al., 2019; Gonzalez-Dugo et al., 2018). En este contexto, se plantea el objetivo de evaluar las propiedades físico-químicas, el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del zumo de tres cultivos híbridos de mandarina (Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique), con el fin de establecer las diferencias entre las muestras según las variedades y entre dos temporadas de cosecha (2017 - 2018 y 2018 - 2019).

4.1.1. Material y Métodos

Muestras

La selección y preparación de las muestras se describe en la sección 3.1.1.

Parámetros físico-químicos

- Conductividad (ver sección 3.2.1.)
- °Brix: Sólidos solubles totales (ver sección 3.2.2.)
- pH (ver sección 3.2.3.)
- Color (ver sección 3.2.4.)

Contenido de compuestos bioactivos

- Compuestos fenólicos totales (ver sección 3.3.1.)
- Flavonoides totales (ver sección 3.3.2.)
- Ácido ascórbico (ver sección 3.3.3.)
- Carotenoides totales (ver sección 3.3.4.)

Determinación de capacidad antioxidante

- Método DPPH (ver sección 3.4.1.)
- Método TEAC (ver sección 3.4.2.)

Análisis estadístico

Las muestras de zumo se analizan por triplicado, para cada fecha de recolección y variedad; los datos se expresan como la media \pm desviación estándar (DE). Se realiza un análisis de la varianza (ANOVA) con el fin de verificar si existen diferencias significativas en cada una de las variables según la variedad y temporada. Se considera que existen diferencias significativas cuando $p < 0,05$, en este caso y para comprobar que variedades difieren se aplica un *test* de Tukey. Se realiza un análisis de regresión múltiple para estudiar la influencia de los factores estudiados sobre cada una de las variables. Los coeficientes de correlación de Pearson se obtienen usando el software R, versión 1.4.1717 (R Core Team, 2020) y se emplea el paquete “corrplot” (Wei et al., 2021) para graficar las correlaciones y su significancia. El análisis de funciones discriminantes se realiza para estimar las variables que permiten clasificar las muestras según la variedad. El ANOVA y el análisis de funciones discriminantes

se realizan empleando el software Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc., EE. UU.).

4.1.2. Resultados y discusión

Análisis de parámetros físico-químicos de zumos de mandarinas híbridas

Los resultados de los parámetros físico-químicos (conductividad, sólidos solubles totales, pH y color) pueden verse en la Tabla 13. Al-Juhaimi & Ghafoor (2013) indican que los zumos de mandarina muestran mejores características de calidad según los parámetros físico-químicos, en comparación con otros cítricos como pomelos o limones. La relación zumo/peso (v/p) de las muestras es de 48, 44 y 36 ml/100g para las mandarinas Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique, respectivamente.

Los resultados de conductividad son los valores más influenciados por la variedad ($p < 0,05$) siendo los zumos de mandarinas Nadorcott las muestras con los valores más altos en cada temporada de cosecha ($3,47 \pm 0,47$ y $3,37 \pm 0,41$ mS/cm, 2017-2018 y 2018-2019, respectivamente). Estos valores están incluidos en los obtenidos por Dragull et al. (2008) (1,89 - 4,57 mS/cm) en zumos de Satsuma (*C. unshiu* Marcovitch).

Tabla 13. Conductividad, sólidos solubles totales, pH y color de zumos de mandarina según temporada de cosecha.

Parámetros físico-químicos (media ± DE)	2017-2018 ⁺			2018-2019 ⁺⁺		
	Clemenvilla	Nadorcott	Ortanique	Clemenvilla	Nadorcott	Ortanique
Conductividad (mS/cm)	3,10 ± 0,53 ^{a1}	3,47 ± 0,47 ^{a1}	3,33 ± 0,50 ^{a1}	3,05 ± 0,61 ^{A1}	3,37 ± 0,41 ^{B1}	3,31 ± 0,42 ^{B1}
°Brix	13,4 ± 1,20 ^{a1}	13,5 ± 1,20 ^{a1}	13,2 ± 1,30 ^{a1}	12,8 ± 2,00 ^{A1}	13,3 ± 1,80 ^{A1}	13,4 ± 0,90 ^{A1}
pH	3,64 ± 0,28 ^{a1}	4,40 ± 0,25 ^{b1}	3,28 ± 0,10 ^{4c1}	4,14 ± 0,39 ^{A2}	4,21 ± 0,25 ^{A2}	3,71 ± 0,18 ^{B2}
L*	4,27 ± 0,39 ^{a1}	3,55 ± 0,46 ^{b1}	4,22 ± 0,26 ^{a1}	4,56 ± 0,52 ^{A2}	3,63 ± 0,36 ^{B1}	4,04 ± 0,39 ^{C2}
a*	6,05 ± 0,30 ^{a1}	5,94 ± 0,39 ^{a1}	5,94 ± 0,18 ^{a1}	6,32 ± 0,30 ^{A2}	6,17 ± 0,40 ^{B2}	6,04 ± 0,33 ^{B1}
b*	7,10 ± 0,57 ^{a1}	6,02 ± 0,76 ^{b1}	7,12 ± 0,43 ^{a1}	7,46 ± 0,70 ^{A2}	6,15 ± 0,59 ^{B1}	6,82 ± 0,65 ^{C2}

DE: desviación estándar. L*, a* y b* parámetros de medición de color.

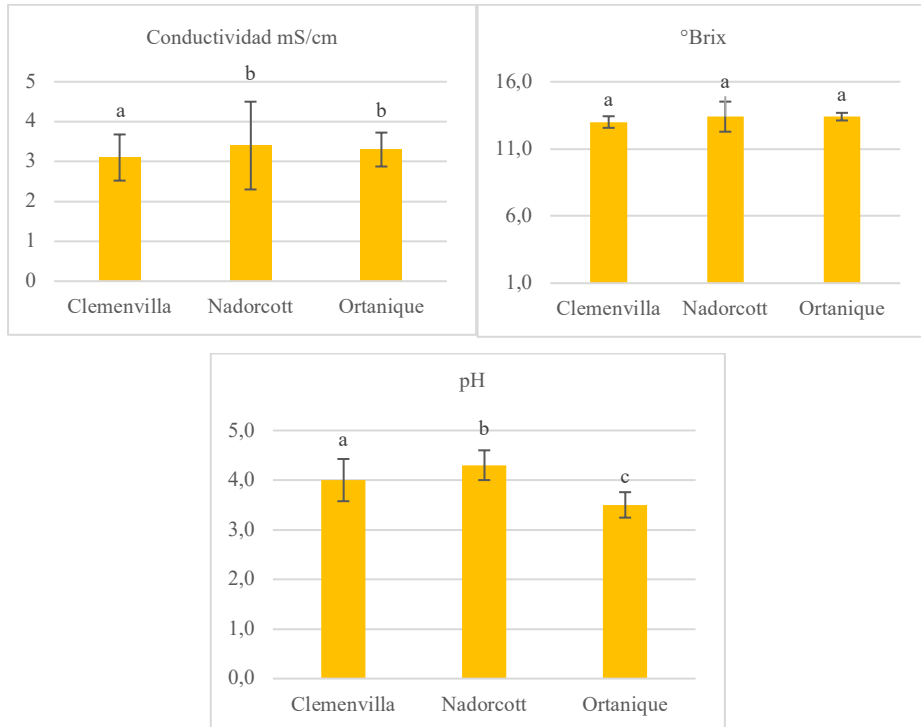
⁺a-c: En la misma fila, diferentes superíndices indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada variedad en la temporada 2017-2018.

⁺⁺A-C: En la misma fila, diferentes superíndices indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada variedad en la temporada 2018-2019.

1-2: En la misma fila, distintos superíndices indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada temporada en cada una de las variedades.

* Muestras analizadas: véase Tabla 8.

En la Figura 24 se pueden observar las diferencias entre los valores medios de los parámetros analizados según las variedades.



Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 24. Valores medios de parámetros físico-químicos en zumo de mandarinas híbridas.

No se observan diferencias significativas en el contenido de °Brix de las muestras, determinando los valores más altos en los zumos de Nadorcott ($13,5 \pm 1,20$) y Ortanique ($13,4 \pm 0,90$) de la primera y segunda temporada de cosecha, respectivamente. Los valores de °Brix obtenidos en nuestro estudio son similares a los referenciados por Betoret et al. (2012) en zumo fresco de mandarina Ortanique (12,8 °Brix); Álvarez et al. (2012) en zumos de Clementina (*C. clementina* Hort. Ej. Tanaka) (12,5 °Brix). Mientras que Li et al. (2021) observan un intervalo entre 9,1 y 13,9 °Brix en zumos de mandarina Satsuma (*C. unshiu*

Marc.), Legua et al. (2014) obtienen valores entre 12,2 y 14,2 °Brix en muestras de zumos de mandarina Clemenules.

El análisis de la varianza muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de pH del zumo de mandarina de las variedades analizadas. El intervalo de valores de pH que se obtiene en el presente estudio es de 3,28 a 4,40, siendo el zumo de la variedad Ortanique el de pH más ácido. Estos resultados son similares a los determinados por algunos autores como Betoret et al. (2012) quienes observan un pH de 3,23 en zumo fresco de Ortanique. Kelebek & Selli, (2014) obtienen valores de pH similares en zumos de mandarina Satsuma, Robinson y Fremont (3,5; 3,6 y 3,4; respectivamente). Así como Hunlun et al. (2017) quienes determinan valores de pH de 3,46 y 3,37 en zumos de Clementina (*C. clementina* Hort. Ex Tan.) y Satsuma (*C. unshiu*), respectivamente. En un estudio reciente, Li et al. (2021) muestran un intervalo de pH de 3,58 a 4,06 en zumos de mandarina Satsuma (*C. unshiu* Marc.). Mientras que Legua et al. (2014) obtienen un intervalo de pH más alto (3,82 - 4,62) en zumos de mandarina Clemenules. Estas diferencias de pH podrían deberse a variaciones en la composición química de los zumos de mandarina acorde con las variedades. En el presente estudio, los zumos de variedad Nadorcott presentan valores mayores (4,40 y 4,21 en las temporadas 2017-2018 y 2018-2019, respectivamente) con respecto a las otras variedades analizadas.

El color de los zumos de cítricos es uno de los parámetros considerados para la aceptación comercial del producto relacionándose con su calidad (Li et al., 2021). Por su parte, el característico color naranja-rojizo del zumo de mandarina lo convierte en un alimento muy atractivo, siendo habitual la práctica de añadir zumo de mandarina para realzar el color de los zumos de naranja comerciales. El ANOVA realizado determina diferencias significativas ($p < 0,05$) en los parámetros de color analizados para cada variedad en ambas temporadas de

cosecha. Según los valores de luminosidad (L^*), los zumos de mandarina Nadorcott son las muestras más oscuras. Asimismo, como se observa en la Tabla 13, todos los valores obtenidos de las coordenadas a^* y b^* en cada una de las muestras analizadas son positivos, es decir, con tendencia a los tonos rojo y amarillo, respectivamente, algo característico en zumos de cítricos. Los zumos de mandarinas Ortanique muestran valores mayores de la coordenada a^* (entre 5,94 y 6,04) en comparación con los resultados obtenidos por Beltrán et al. (2008) en la misma variedad (-1,53). Valores más bajos de a^* fueron observados por Li et al. (2021) en zumos de mandarina Satsuma (de -0,23 a 2,0). Los zumos de mandarinas Ortanique ($7,12 \pm 0,43$) y Clemenvilla ($7,46 \pm 0,70$) muestran los valores más altos de la coordenada b^* , en la primera y segunda temporada de cosecha, respectivamente. De acuerdo con los valores obtenidos en la evaluación de color se puede decir que los zumos de mandarina Clemenvilla serían los más adecuados para realzar el color de los zumos de cítricos comerciales, por sus características más rojizas.

La composición del zumo de diferentes variedades de cítricos puede afectar las características de color (Li et al., 2021). Asimismo, en anteriores investigaciones se señala que los valores obtenidos mediante la evaluación del color con la escala CIELAB están relacionados con la presencia de compuestos bioactivos como los carotenoides y polifenoles en zumos de frutas (Cesa et al., 2017; Meléndez-Martínez et al., 2011). En el presente estudio, el análisis de correlación indica que la coordenada de color a^* se relaciona significativamente ($p < 0,05$) y de forma positiva con el contenido de compuestos fenólicos totales, y tiene una fuerte correlación negativa con los flavonoides totales (véase Figura 25).

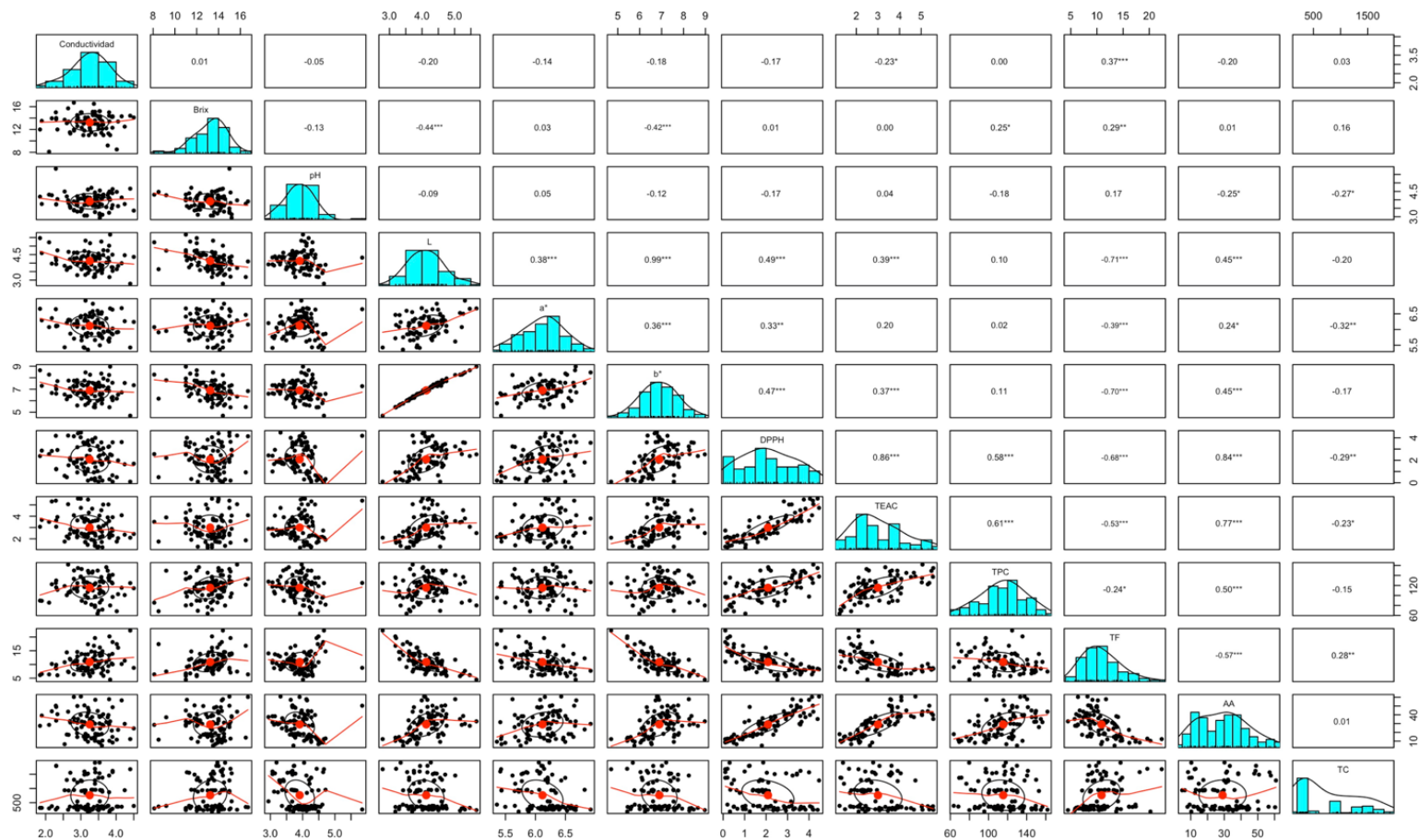


Figura 25. Histogramas de correlación de los parámetros físico-químicos de zumo de mandarinas híbridas.

El histograma de correlaciones (Figura 25) refleja la distribución de las variables en grupos según los valores observados. En la parte superior se aprecian los coeficientes de correlación de los parámetros analizados, en la parte central se muestra la distribución de los resultados según el diagrama de Gauss, y en la parte inferior se observa la linealidad de los valores según las variables evaluadas.

Los resultados obtenidos sobre las características físico-químicas indican que los parámetros evaluados en el presente estudio pueden ser utilizados para evaluar la calidad en zumos de mandarinas híbridas.

Contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, ácido ascórbico y carotenoides totales en zumos de mandarinas híbridas

En la Tabla 14 se muestran los resultados del contenido de CFT, FT, AA y CT según variedad y temporada de cosecha.

Las mandarinas son una buena fuente de compuestos fenólicos, cuya concentración influye en las características gustativas y la calidad organoléptica (Kelebek & Selli, 2014). El contenido medio de CFT en zumo de mandarina Clemenvilla es significativamente ($p < 0,05$) más alto ($127 \pm 21,2$ mg GAE/100 mL) que el de los zumos de Nadorcott y Ortanique ($98,5 \pm 20,8$ y $116 \pm 17,1$ mg GAE/100mL, respectivamente) (véase Figura 26). Los resultados obtenidos concuerdan con Xu et al. (2008) quienes obtienen entre 77,5 y 155,5 mg GAE/100mL en diferentes zumos de mandarina de China. Al-Juhaimi & Ghafoor (2013) obtienen 91,2 mg GAE/100 mL en zumo de mandarinas Kinnow (*C. nobilis* × *C. deliciosa*) de origen saudí, similares a los referenciados por Sicari et al. (2016) en zumo de mandarina italiana (*C. reticulata*) (92,0 mg GAE/100 mL). Mayores valores de CFT observan Roussos et al. (2019), quienes obtienen 132 y 135 mg GAE/100 mL en zumos de Clementina (*C. clementina* SRA63) provenientes de un sistema de cultivo orgánico e integrado, respectivamente.

Asimismo, Pyo et al. (2014) determinan 211 mg GAE/100 mL en zumo con pulpa de mandarina *C. unshiu*. Cheng et al. (2020) obtienen 43,8 mg GAE/100 mL en zumos de mandarina *C. unshiu*, siendo menor a lo observado en el presente estudio. Concentraciones inferiores también se observan en el estudio realizado por Legua et al. (2014) en diferentes variedades de mandarinas híbridas (3,5 a 5,9 mg GAE/ 100 mL); así como Kelebek & Selli (2014) que determinan 42,6, 48,6 y 75,0 mg GAE/100 mL en zumo de mandarinas Robinson, Fremont y Satsuma, respectivamente. Estas diferencias en las concentraciones de CFT en los zumos de mandarina sugieren que este compuesto bioactivo depende de la constitución genética y origen geográfico (Hunlun et al., 2017).

Con relación al contenido de flavonoides, el zumo de mandarinas Nadorcott presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) en comparación con Clemenvilla y Ortanique, sobre todo durante la primera temporada. Valores inferiores de flavonoides se obtienen en el estudio de Tounsi et al. (2011) en zumo de mandarina Elarbi (*C. reticulata* Blanco) (8,5 mg CE/100 mL). Hunlun et al. (2017) señalan que la genética de las especies cítricas influye en el contenido de polifenoles y flavonoides del zumo, y es posible que estas diferencias puedan ser debidas a factores propios como el origen geográfico de las muestras. Por otro lado, según se observa en los antecedentes bibliográficos, la determinación del contenido total de flavonoides de algunos estudios en zumo de mandarina se expresa en diferentes unidades: Sicari et al. (2016) obtienen 11 mg de equivalente de rutina/100 mL de zumo de *C. reticulata*, Roussos et al. (2019) determinan 1,6 y 1,2 mg de equivalente de ácido cafeico/100 mL en zumos clementinas (*C. clementine* SRA63) de cultivo orgánico e integrado, respectivamente. La estandarización en la determinación del contenido total de flavonoides en muestras de frutos cítricos es necesaria para eliminar este problema.

Tabla 14. Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de zumos de mandarina según variedad y temporada de cosecha.

Parámetros (mean ± DE)	2017-2018 ⁺			2018-2019 ⁺⁺		
	Clemenvilla	Nadorcott	Ortanique	Clemenvilla	Nadorcott	Ortanique
CFT (mg GAE/100 mL)	125 ± 13,0 ^{a1}	89,1 ± 16,5 ^{b1}	117 ± 15,5 ^{c1}	127 ± 22,6 ^{A1}	102 ± 21,4 ^{B2}	115 ± 17,8 ^{C1}
FT (mg CE/100 mL)	9,68 ± 1,19 ^{a1}	16,1 ± 3,49 ^{b1}	10,9 ± 1,87 ^{c1}	7,45 ± 1,46 ^{A1}	13,6 ± 3,50 ^{B1}	11,5 ± 2,07 ^{C2}
AA (mg AA/100mL)	49,1 ± 9,70 ^{a1}	11,9 ± 2,90 ^{b1}	31,9 ± 3,80 ^{c1}	39,2 ± 8,50 ^{A1}	13,2 ± 3,60 ^{B2}	22,3 ± 7,10 ^{C1}
CT (µg β-caroteno/100 mL)	1461 ± 361 ^{a1}	1349 ± 423 ^{ab1}	1219 ± 400 ^{b1}	306 ± 49,2 ^{A2}	415 ± 225 ^{B2}	619 ± 327 ^{C2}
DPPH (mM TE)	2,88 ± 1,25 ^{a1}	0,25 ± 0,14 ^{b1}	1,94 ± 0,39 ^{b1}	3,31 ± 0,63 ^{A2}	0,82 ± 0,34 ^{B2}	1,86 ± 0,36 ^{C1}
TEAC (mM TE)	3,61 ± 0,62 ^{a1}	1,81 ± 0,50 ^{b1}	2,82 ± 0,55 ^{c1}	4,24 ± 0,87 ^{A2}	1,85 ± 0,32 ^{B1}	2,52 ± 0,35 ^{C2}

DE: desviación estándar; CFT: Compuestos fenólicos totales; GAE: ácido gálico equivalente; CFT: compuestos flavonoides totales; CE: catequina equivalente; AA: ácido ascórbico; CT: carotenoides totales; DPPH: ensayo de eliminación de 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo; TE: trolox equivalente; TEAC: capacidad antioxidante equivalente de Trolox.

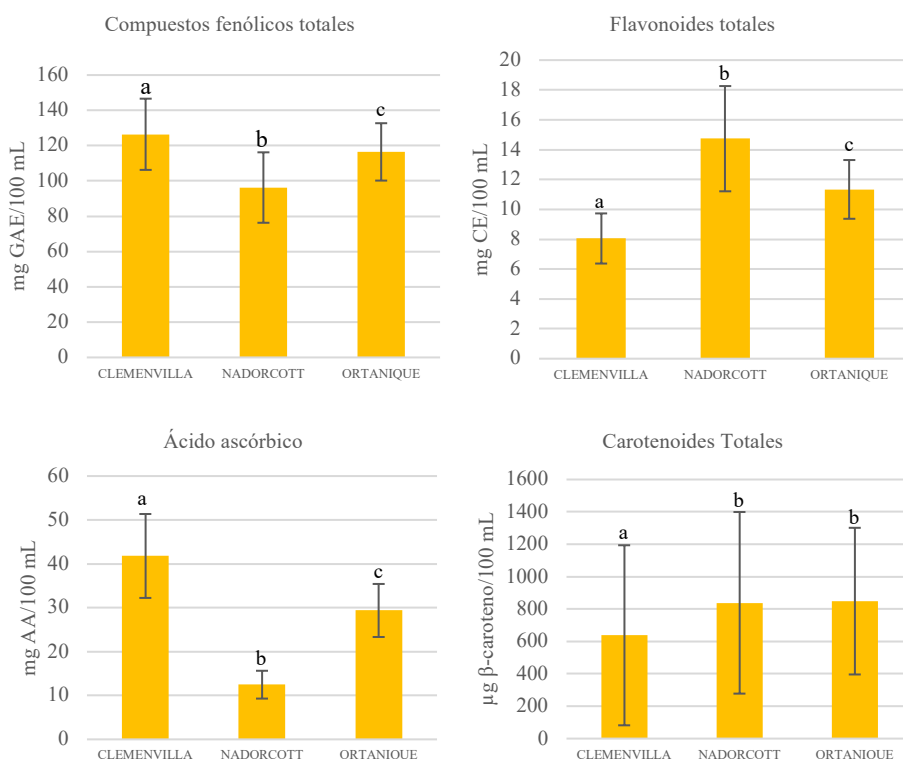
⁺a-c: En la misma fila, diferentes superíndices indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada variedad en la temporada 2017-2018.

⁺⁺A-C: En la misma fila, diferentes superíndices indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada variedad en la temporada 2018-2019.

1-2: En la misma fila, diferentes superíndices indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada temporada por cada variedad.

* Muestras analizadas: véase Tabla 8.

El zumo de mandarina es una buena fuente de AA, que se utiliza como indicador de la calidad del zumo de naranjas y mandarinas (Kelebek & Selli, 2014). En la Tabla 14 se observa que el contenido de AA en los zumos de mandarina difiere significativamente ($p < 0,05$) entre las variedades, en ambas temporadas de cosecha. El zumo de mandarinas Clemenvilla tiene mayor ($p < 0,05$) concentración media de AA que las otras dos variedades ($41,8 \pm 9,7$, $12,5 \pm 7,9$ y $26,3 \pm 7,9$ mg/100 mL, para Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique, respectivamente) (Véase Figura 26). Estos resultados son similares a los obtenidos en zumo de mandarina Clemenvilla (de 46,2 a 54,4 mg/100 mL) por Torregrosa (2005).



*Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

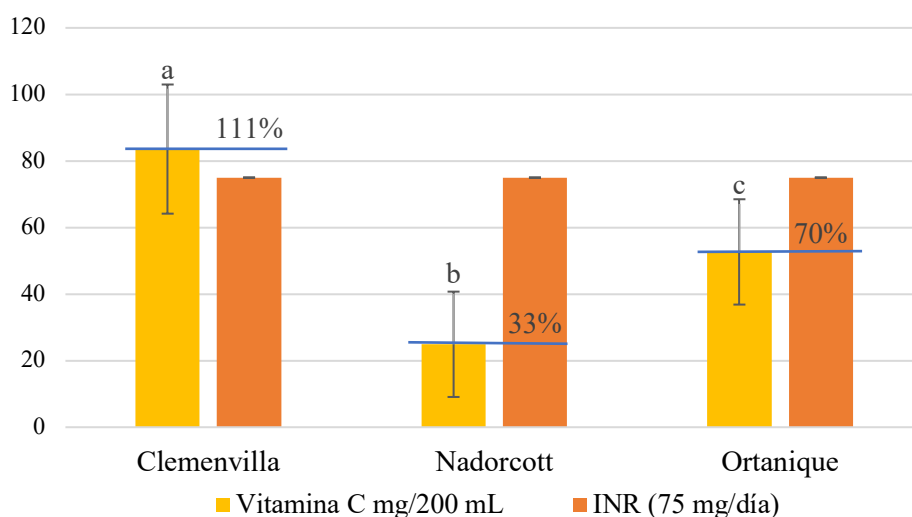
Figura 26. Valores medios del contenido de compuestos bioactivos en zumo de mandarinas híbridas

Los resultados del presente estudio, en las tres variedades estudiadas, son semejantes a los obtenidos por Pérez et al. (2005) en zumo fresco de mandarinas Hernandinas (*C. reticulata* blanco cv. Fina) (42,0 mg/100 mL). Así como los referenciados en el estudio realizado por Baswal et al. (2020) en mandarina Kinnow (*C. nobilis* L. x *C. deliciosa* L.) (33,9 mg AA/100 mL) y por Kelebek & Selli (2014) que obtienen 37,2, 39,8 y 49,6 mg AA/100 mL en mandarinas Satsuma, Fremont y Robinson, respectivamente. Mientras que Morales et al. (2021) estiman una concentración entre 24,7 y 28,1 mg AA/100 mL en zumos de mandarinas híbridas Tangor.

Los resultados muestran que los zumos de Clemenvilla y Ortanique serían una buena opción para aumentar la concentración de Vitamina C de los zumos de naranja comerciales, que es de 36,0 mg/100 mL según indica la Asociación Europea de Zumos de Frutas (AIJN). El consumo de 200 mL (porción de referencia) de zumo de Clemenvilla suple satisfactoriamente la Ingesta Nutricional de Referencia (INR) de Vitamina C para población adulta (75 mg/día) en España (AESAN, 2019) (véase Figura 27).

Los valores de CT encontrados en este estudio en la segunda temporada de cosecha (306 - 619 μg de β -caroteno/100 mL) concuerdan con los resultados encontrados por Xu et al. (2008) (292-1002 μg de β -caroteno/100 mL) en 7 variedades de mandarinas cultivadas en China, Giuffrida et al. (2019) en diferentes variedades de *C. reticulata* (279 - 808 μg /100 mL de zumo) y Baswal et al. (2020) en mandarinas Kinnow (*C. nobilis* x *C. deliciosa*) (420 μg de β -caroteno/100 mL). Sin embargo, la concentración de CT en las mandarinas recolectadas en la primera temporada es mayor (1219 - 1461 μg de β -caroteno/100 mL), siendo similar a los resultados de Cheng et al. (2020), quienes obtienen una concentración de 1220 μg de β -caroteno/100 mL en zumo de

mandarina (*C. unshiu*). Estas diferencias se deben a las características propias de las variedades de cítricos analizadas.



*Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). El valor de Ingesta Nutricional de Referencia está indicada para población < 18 años (AESAN, 2019).

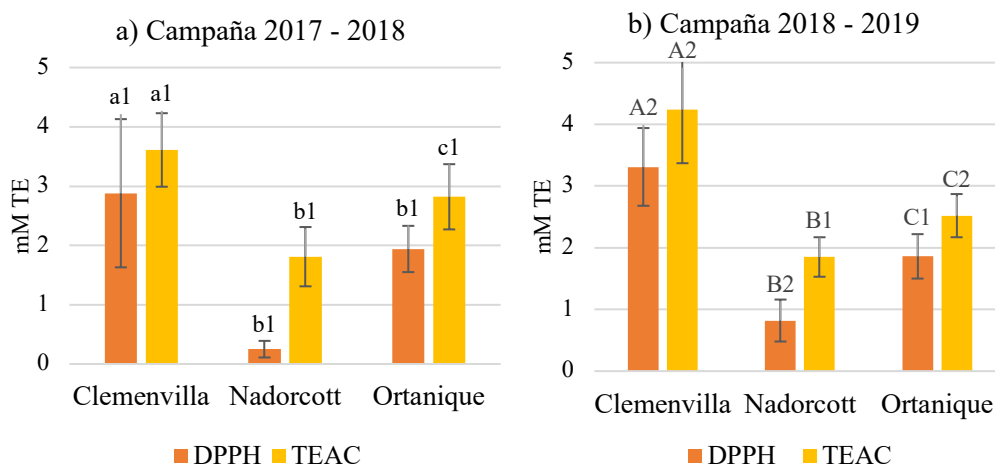
Figura 27. Aporte de Vitamina C del zumo de mandarina a los requerimientos a la Ingesta Nutricional de Referencia.

Capacidad antioxidante en zumo de mandarinas híbridas

Los métodos DPPH y TEAC son los más utilizados para evaluar la capacidad antioxidante en frutas (Betoret et al., 2017; Lafuente et al., 2011). Según se muestra en la Tabla 14, los valores de DPPH y TEAC en los zumos Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique, muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) en ambas temporadas de cosecha. Como se ve en la Figura 28, los zumos de Clemenvilla tienen los valores más altos de capacidad antioxidante (mM TE), por ambos métodos y para las dos campañas. Estos resultados, en el caso del método DPPH, son superiores a los valores obtenidos (0,212 mM TE) por Hunlun et al. (2017) en mandarinas Clementina (*C. clementina*) y Satsuma (*C. unshiu*) en la temporada 2014. En esta línea Pyo et al. (2014) determinan aproximadamente

2,000 mM TE en zumos con pulpa de mandarinas Satsuma (*C. unshiu*). En el caso del método TEAC, se obtienen valores de actividad antioxidante más altos que por DPPH para los zumos analizados. Los resultados TEAC obtenidos son aproximados a los de Legua et al. (2014) quienes obtienen menos de 0,200 mM TE en zumos de 14 portainjertos para mandarinas Clemenules (*C. clementina*). Además, Betoret et al. (2017) obtienen un contenido de 0,700 mM TE en zumos de mandarina Ortanique (*C. reticulata* x *C. sinensis* Osbeck).

Dado que la capacidad antioxidante está influenciada por diferentes variables, se recomienda el uso de dos o más métodos para evaluar la capacidad antioxidante en frutas (Tounsi et al., 2011). Los métodos de DPPH y TEAC se encuentran entre los ensayos de antioxidantes más empleados (Betoret et al., 2017). El método DPPH es más sensible a los compuestos hidrófobos, mientras que el método TEAC lo es para los antioxidantes hidrófilos como el ácido ascórbico y los polifenoles (Lafuente et al., 2011). Como se observa en la Figura 28, los zumos de mandarina presentan una mayor capacidad antioxidante con el método TEAC que los valores obtenidos por el método DPPH, estos resultados son acordes a los del estudio de Zhang et al. (2018) en diferentes zumos de *C. reticulata*. En esta línea, los resultados sugieren que en los zumos analizados la composición hidrófila contribuye a la capacidad antioxidante en una mayor proporción que la composición hidrófoba. Por el contrario, Sicari et al. (2016) determinan valores de capacidad antioxidante más altos en el zumo de mandarina (*C. reticulata*) analizado mediante el método DPPH en comparación con el método TEAC.



TE: trolox equivalente; DPPH: método de eliminación del radical 2,2'-difetil-1-picrilhidrazilo; TEAC: capacidad antioxidante equivalente de trolox.

a-c: en barras del mismo color, letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de DPPH.

A-C: en barras del mismo color, diferentes letras mayúsculas indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de TEAC.

1-2: en barras del mismo color, diferentes superíndices indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada temporada por cada variedad.

Figura 28. Capacidad antioxidante del zumo de mandarina según variedad y temporada de cosecha.

El estudio de regresión múltiple muestra que la capacidad antioxidante está significativamente influenciada ($p < 0,05$) por el contenido de compuestos bioactivos (CFT, FT, AA y CT) de los zumos de mandarina analizados, estos resultados están de acuerdo con investigaciones previas (Betoret et al., 2012; Xu et al., 2008). Sin embargo, el análisis de regresión realizado muestra que solo el contenido de AA contribuye en más del 50% a la capacidad antioxidante de los zumos evaluados (70,3% y 58,3% analizados por DPPH y TEAC, respectivamente); resultados similares son observados por Xu et al. (2008). Los coeficientes de correlación y el grado de significancia se muestran en la Tabla 15. Los gráficos de dispersión evidencian una correlación lineal entre los valores de AA, DPPH y TEAC (véase Figura 29).

Tabla 15. Coeficientes de correlación de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.

Variable	M	DE	DPPH	TEAC	CFT	FT	AA
DPPH	2,09	1,21					
TEAC	3,00	1,11	0,86** [0,79; 0,90]				
CFT	115	22,4	0,58** [0,42; 0,70]	0,61** [0,46; 0,73]			
FT	10,9	3,57	-0,68** [-0,78; -0,55]	-0,53** [-0,67; -0,36]	-0,24* [-0,43; -0,03]		
AA	29,0	14,1	0,84** [0,7; 0,89]	0,77** [0,66; 0,84]	0,50** [0,32; 0,64]	-0,57** [-0,69; -0,40]	
CT	762	536	-0,29** [-0,47; -0,08]	-0,23* [-0,42; -0,03]	-0,15 [-0,34; 0,07]	0,28** [0,08; 0,46]	0,01 [-0,20, 0,22]

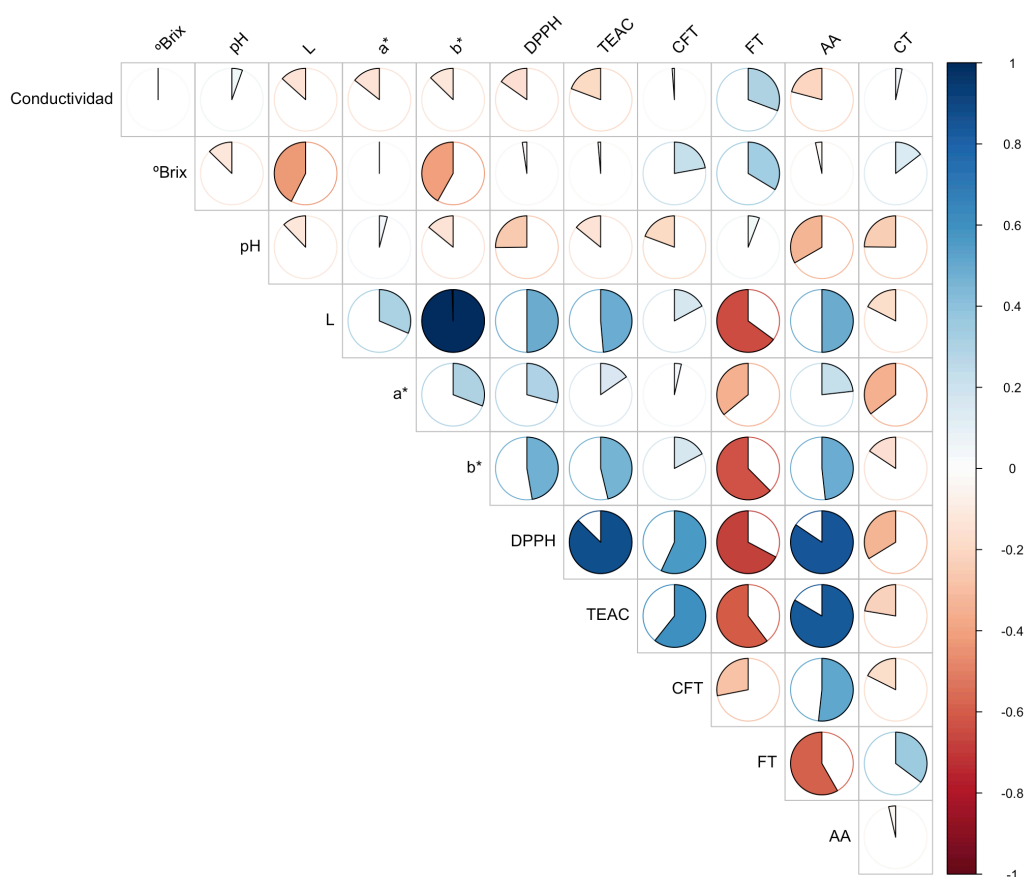
M: media; DE: desviación estándar; DPPH: ensayo de eliminación de 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo; TEAC: capacidad antioxidante equivalente de Trolox; CFT: compuestos fenólicos totales; FT: flavonoides totales; AA: Ácido ascórbico; CT: carotenoides totales.

+ Los valores entre corchetes indican un intervalo de confianza del 95% para cada correlación.

* indica $p < 0,05$.

** indica $p < 0,01$.

Roussos et al. (2019) mencionan en su estudio, con zumo de un híbrido de Clementina (*C. clementine* SRA63), que solo un flavonoide específico (hesperidina) está fuertemente correlacionado ($p < 0,05$) con la capacidad antioxidante evaluada por DPPH. Zhang et al. (2018) indican que el contenido CFT y FT se correlaciona significativamente ($p < 0,01$) con los valores de capacidad antioxidante obtenidos en el método DPPH en zumos de mandarina (*C. reticulata* Blanco). La correlación (Figura 29) entre los valores (mM TE) de DPPH y TEAC es significativa ($p < 0,05$), estando de acuerdo con los resultados obtenidos por Floegel et al. (2011) en muestras de vegetales y zumos de frutas. Esto sugiere que ambos métodos (DPPH y TEAC) son adecuados para la evaluación de la capacidad antioxidante de los zumos de mandarina.



DPPH: método de eliminación del radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo; TEAC: capacidad antioxidante equivalente de Trolox; CFT: compuestos fenólicos totales; FT: flavonoides totales; AA: Ácido ascórbico; CT: carotenoides totales. Los gráficos circulares y los degradados de color muestran la fuerza de cada una de las correlaciones. (p.e., DPPH y TEAC).

Figura 29. Gráficos circulares de correlación estadística entre las características físico-químicas, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de los zumos de mandarinas híbridas.

Evolución de los parámetros durante las temporadas de cosecha

Se realiza un análisis de regresión múltiple con las variables analizadas de cada variedad para estudiar su evolución durante las dos temporadas de cosecha. Las ecuaciones para cada variable y variedad se muestran en la Tabla 16. El análisis de regresión revela que en la mayoría de los casos existe una correlación

entre los parámetros y el tiempo de recolección en ambas temporadas de cosecha, con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 16. Estudio de la evolución de las variables durante las temporadas de cosecha.

Variables	Ecuación [R ² , error] ⁺		
	Clemenvilla	Ortanique	Nadorcott
Conductividad (mS/cm)	2,68 + 7,8·10 ⁻³ t [7,20; 0,57]*	3,35 - 6,2·10 ⁻⁴ t [0,16; 0,44]	3,32 + 2,8·10 ⁻³ t [6,70; 0,41]
°Brix	12,9 + 5,5·10 ⁻⁴ t [0,01; 1,83]	12,8 + 1,2·10 ⁻² t [8,52; 1,07]*	13,4 + 1,8·10 ⁻³ t [0,24; 1,54]
pH	3,84 + 3,3·10 ⁻³ t [3,08; 0,42]	3,27 + 5,2·10 ⁻³ t [26,34; 0,25]*	4,17 + 2,7·10 ⁻³ t [20,70; 0,23]*
CFT (mg GAE/100 mL)	112 + 0,29 t [10,78; 19,31]*	121 - 0,09 t [2,58; 16,28]	103 - 0,14 t [8,58; 19,40]*
FT (mg CE/100 mL)	6,23 + 0,04 t [24,94; 1,48]*	11,5 - 4,3·10 ⁻³ t [0,36; 1,99]	12,9 + 0,04 t [18,47; 3,24]*
AA (mg AA/100mL)	36,5 + 0,11 t [6,65; 9,48]*	33,7 - 0,15 t [28,11; 6,70]*	14,6 - 0,04 t [24,59; 2,91]*
CT (µg/100 mL)	654 - 0,35 t [0,02; 651]	700 + 3,09 t [3,55; 449]	309 + 10,8 t [64,23; 340]*
DPPH (mM TE)	2,57 + 1,29·10 ⁻³ t [11,43; 0,08]*	2,22 - 6,25·10 ⁻⁴ t [21,86; 0,03]*	0,91 - 7,31·10 ⁻⁴ t [62,38; 0,02]*
TEAC (mM TE)	3,51 + 1,12 t [8,75; 81,18]*	3,09 - 0,93 t [30,56; 39,07]*	1,88 - 0,11 t [1,28; 39,17]

t: tiempo de recolección (la primera fecha de recolección se considera 0); CFT: compuestos fenólicos totales; GAE: Gallic acid equivalent; FT: flavonoides totales, CE: catequina equivalente; AA: ácido ascórbico, CT: carotenoides totales; DPPH: método de eliminación del radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo; TE: trolox equivalente; TEAC: capacidad antioxidante equivalente de trolox.

⁺Los valores entre corchetes indican 1: el valor R² que explica la variabilidad (%) de los resultados y 2: desviación estándar (para los límites de predicción).

*indica *p* < 0,05, existe una relación estadísticamente significativa

Las propiedades físico-químicas de las variedades estudiadas son diferentes según el tiempo de recolección, sin embargo, el porcentaje que explica la variabilidad en los parámetros analizados es bajo (<30%). En los compuestos bioactivos de los zumos de Clemenvilla y Nadorcott existe una relación significativa (*p* < 0,05) entre el CFT y FT con el tiempo de recolección en ambas

temporadas. En cuanto a la capacidad antioxidante, se observan interacciones en los zumos de las variedades de mandarina analizadas según los valores de DPPH y tiempo de recolección ($p < 0,05$). Solo los zumos Clemenvilla y Ortanique revelan interacciones significativas ($p < 0,05$) entre los valores de TEAC y el tiempo de recolección. Sin embargo, el modelo permite explicar la correlación significativa entre los valores de capacidad antioxidante y tiempo de recolección, por debajo del 50% en la mayoría de los casos observados. Sólo el modelo obtenido en las muestras de Nadorcott ($0,91 - 7,31 \cdot 10^{-4} t$) explica el 62,4% de la variabilidad de los valores de DPPH sugiriendo que es un método útil para evaluar la capacidad antioxidante en los zumos de Nadorcott según el tiempo de recogida.

Clasificación de los zumos de mandarina por variedad según características físico-químicas, contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.

Para estudiar los datos obtenidos y agruparlos de acuerdo con sus características, se realiza un análisis discriminante para estimar los parámetros que permiten clasificar las muestras según la variedad. El análisis realizado indica que sólo 5 variables (pH, TF, AA, DPPH y TEAC) permiten diferenciar las tres variedades estudiadas (Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique). En la Tabla 17 se muestran los coeficientes (estadísticamente significativos) de las funciones de clasificación.

Tabla 17. Coeficientes de la función de clasificación según la variedad

	Clemenvilla	Nadorcott	Ortanique
pH	46,7	49,3	41,9
FT	-1,05	-0,03	-0,14
AA	0,80	0,46	0,53
DPPH	-9,10	-58,9	-19,6
TEAC	$-6,52 \cdot 10^{-3}$	-0,06	-0,04
Constant	-166,33	-196,64	-141,85

FT: flavonoides totales; AA: ácido ascórbico; DPPH: método de eliminación del radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo; TEAC: capacidad antioxidante equivalente de trolox.

La Tabla 18 muestra las dos funciones discriminantes estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Aplicando estas funciones se obtiene un modelo con el que es posible clasificar correctamente el 98,59% de los casos (Tabla 19). El modelo ajustado obtenido para las funciones discriminantes es:

$$\text{Función 1: } 0,065 \cdot \text{pH} + 0,382 \cdot \text{FT} - 0,402 \cdot \text{AA} - 0,393 \cdot \text{DPPH} - 0,457 \cdot \text{TEAC}$$

$$\text{Función 2: } -0,927 \cdot \text{pH} + 0,427 \cdot \text{FT} - 0,342 \cdot \text{AA} - 0,394 \cdot \text{DPPH} - 0,165 \cdot \text{TEAC}$$

Dónde, FT son flavonoides totales (mg CE/100g PF), AA es ácido ascórbico (mg/100g PF), DPPH es el método de eliminación del radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (mM TE); y TEAC es la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (mM TE).

Tabla 18. Coeficientes estandarizados de la función discriminante por variedad

Variables	1	2
pH	0,065	-0,927
FT	0,382	0,427
AA	-0,402	-0,342
DPPH	-0,393	0,394
TEAC	-0,457	-0,165

1, 2: funciones estadísticamente discriminantes; FT: flavonoides totales; AA: ácido ascórbico; DPPH: método de eliminación del radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo; TEAC: capacidad antioxidante equivalente de trolox.

La Figura 30 muestra la capacidad de las dos funciones para diferenciar las variedades estudiadas. Como se observa, las muestras de Nadorcott son claramente diferentes, debido a su alto contenido de FT y menor concentración de AA y capacidad antioxidante (valores DPPH y TEAC) en comparación con las muestras de Clemenvilla y Ortanique.

Tabla 19. El pH, flavonoides totales, ácido ascórbico, DPPH, TEAC: Clasificación de las variedades y el porcentaje de aciertos en la predicción.

	Tamaño de Grupo	Clemenvilla	Nadorcott	Ortanique
Clemenvilla	35	34 (97,14 %)	0 (0,00 %)	1 (2,86 %)
Nadorcott	22	0 (0,00 %)	22 (100,00 %)	0 (0,00 %)
Ortanique	31	1 (3,22 %)	3 (9,69 %)	27 (87,09 %)

* Porcentaje de casos correctamente clasificados: 98,59%

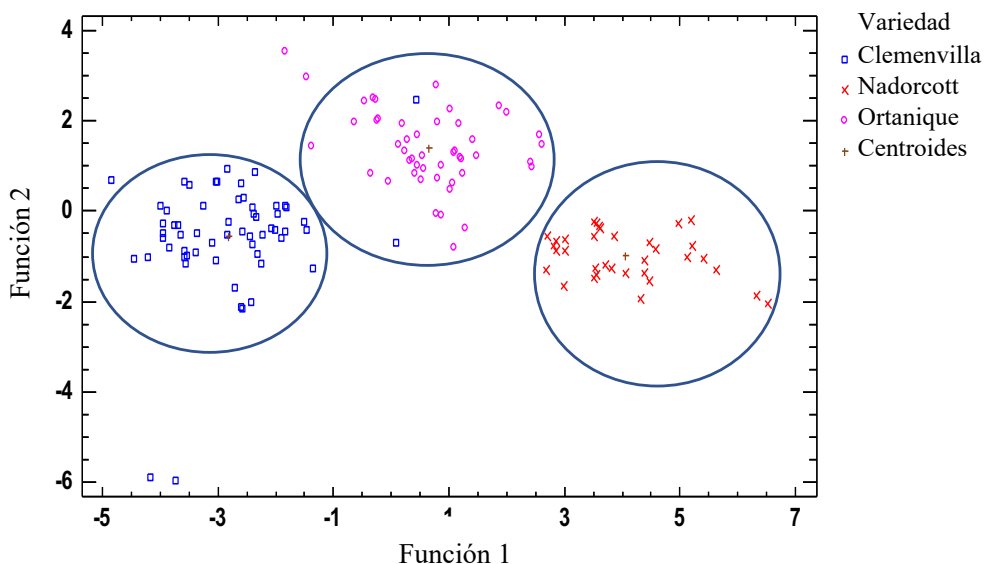


Figura 30. Diferenciación de variedades de mandarinas según las funciones discriminantes.

4.1.3. Conclusiones

Los zumos de mandarina Clemenvilla muestran el mayor contenido de CFT y AA, y una alta actividad antioxidante en los dos métodos empleados. Los zumos de Nadorcott presentan las concentraciones más altas de FT y, en los zumos Ortanique de la segunda temporada de cosecha se obtiene el contenido más alto de CT. La variedad y la temporada de cosecha influyen significativamente ($p < 0,05$) en el contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de los zumos. Además, los compuestos bioactivos se correlacionan significativamente ($p < 0,05$) con la capacidad antioxidante evaluada mediante los métodos DPPH y TEAC. La relación de cada método con la fracción hidrófoba e hidrófila será muy útil en futuras investigaciones. El pH, FT, AA, DPPH y TEAC son los parámetros predictores para clasificar las mandarinas y agruparlas según la variedad. Esta información podría ser útil a productores y consumidores, para elegir variedades de híbridos con altas propiedades nutraceuticas con potenciales beneficios para la salud.

4.2. EFECTOS DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PIEL DE MANDARINAS HÍBRIDAS

La piel de los cítricos (flavedo y albedo) es el principal componente de los residuos y constituye una fuente rica de antioxidantes naturales (carotenoides, polifenoles, aceites esenciales, pectina, entre otros compuestos) (Putnik et al., 2017a; Rafiq et al., 2018; Ruviano et al., 2020).

La preparación de extractos de piel de mandarina tiene como principal objetivo la obtención de los compuestos bioactivos de este tipo de tejidos vegetales (Nipornram et al., 2018). En este contexto, los ultrasonidos son una tecnología clave para lograr el objetivo de extracción de forma sostenible (Chemat et al., 2017).

El objetivo de este estudio es determinar los efectos de las ondas ultrasónicas como método de obtención de extractos a partir de la piel de tres cultivos de mandarinas híbridas de la provincia de Valencia (España), mediante el análisis de las características físico-químicas, el contenido de compuestos bioactivos, así como de la capacidad antioxidante. Se evalúa la correlación entre los diferentes tiempos de extracción, la variedad de las mandarinas y los valores de las propiedades físico-químicas, los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante.

4.2.1. Material y Métodos

Muestras

La selección y preparación de las muestras se describe en la sección 3.1.2.

Parámetros físico-químicos

- Conductividad (ver sección 3.2.1.)
- °Brix: Sólidos solubles totales (ver sección 3.2.2.)
- pH (ver sección 3.2.3.)

Contenido de compuestos bioactivos

- Compuestos fenólicos totales (ver sección 3.3.1.)
- Flavonoides totales (ver sección 3.3.2.)
- Ácido ascórbico (ver sección 3.3.3.)
- Carotenoides totales (ver sección 3.3.4.)

Determinación de capacidad antioxidante

- Método DPPH (ver sección 3.4.1.)
- Método TEAC (ver sección 3.4.2.)

Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizan por triplicado con tres muestras independientes según cada variedad y tiempo de extracción. Se realiza un análisis de la varianza (ANOVA) para verificar si existen diferencias significativas entre los resultados de las variedades estudiadas (Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique), y conocer las posibles interacciones entre los factores (variedad, tiempo de extracción). Asimismo, se aplica el *test* de Tukey para indicar las muestras en las que se observan diferencias significativas. Se realiza un análisis de regresión múltiple para estudiar la influencia de los parámetros sobre la capacidad antioxidante. Todos los análisis estadísticos se realizan utilizando el software Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc., EE. UU.) y las diferencias de $p < 0,05$ se consideran significativas.

4.2.2. Resultados y discusión

Diferencias en las características físico-químicas de la piel de mandarina tratadas por ultrasonidos.

Después de preparar los extractos de piel de mandarina, se realiza un análisis de las características físico-químicas que incluye el IC, °Brix y pH (véase Tabla 20). El valor de IC se determina porque la conductividad representa el contenido electrolítico de los extractos, por tanto, indica la salida de electrolitos del interior de las células vegetales (Montero-Calderon et al., 2019). Los valores de conductividad eléctrica están relacionados con la morfología y la estructura cristalina del recubrimiento en películas (*films*) de la piel de mandarina (Durmuş et al., 2019). Como se observa en la Tabla 20, el valor del IC de las variedades analizadas aumenta según el incremento de los tiempos de extracción (5, 15 y 30 min). Al realizar el análisis de varianza multifactorial se observa que la variedad de mandarina y el tiempo de extracción influyen significativamente ($p < 0,01$) en los valores de IC. Obteniendo los valores de IC más altos en el extracto de piel de Nadorcott tratado por ultrasonidos durante 30 min ($0,30 \pm 0,07$ mS/cm). Montero-Calderon et al. (2019) obtienen un IC de 0,45 mS/cm en el extracto de piel de naranja Navel (*C. sinensis* Osbeck) tratado por ultrasonidos en las mismas condiciones (400 W, 30 min).

El valor medio de °Brix en los extractos obtenidos es de $16,2 \pm 0,6$. Al realizar el ANOVA, se observa una influencia significativa ($p < 0,01$) del tiempo de extracción, sin embargo, no se observan diferencias significativas según la variedad. En el caso del pH, los valores medios difieren significativamente ($p < 0,01$) entre los extractos de las variedades de Clemenvilla ($5,99 \pm 0,20$), Nadorcott ($6,20 \pm 0,17$) y Ortanique ($5,72 \pm 0,20$), sin embargo, no se observan diferencias significativas en los valores de pH según el tiempo de extracción.

Irkin et al. (2015) obtienen un valor de pH más alto de 6,58 en el extracto de piel de mandarina obtenido mediante un método convencional.

Tabla 20. Diferencias de las propiedades fisicoquímicas de extractos de piel de mandarinas según tiempo de extracción y variedad.

Propiedades fisico-químicas	Tiempo de extracción (min)	Clemenvilla	Nadorcott	Ortanique
IC (mS/cm±DE)	5	0,21 ± 0,10 ^{a1}	0,22 ± 0,05 ^{a1}	0,14 ± 0,04 ^{b1}
	15	0,26 ± 0,12 ^{a2}	0,27 ± 0,09 ^{a2}	0,16 ± 0,07 ^{b2}
	30	0,32 ± 0,13 ^{a3}	0,30 ± 0,07 ^{a3}	0,26 ± 0,07 ^{b3}
°Brix	5	16,5 ± 0,4 ^{a1}	16,2 ± 0,6 ^{a1}	16,4 ± 0,6 ^{a1}
	15	16,3 ± 0,5 ^{a1}	16,2 ± 0,7 ^{a1}	16,3 ± 0,5 ^{a1}
	30	15,8 ± 0,7 ^{a2}	16,2 ± 0,6 ^{a2}	16,1 ± 0,6 ^{a1}
pH	5	6,03 ± 0,20 ^{a1}	6,25 ± 0,17 ^{b1}	5,71 ± 0,24 ^{c1}
	15	6,00 ± 0,18 ^{a1}	6,19 ± 0,18 ^{b1}	5,76 ± 0,18 ^{c1}
	30	5,95 ± 0,23 ^{a1}	6,16 ± 0,16 ^{b1}	5,69 ± 0,19 ^{c1}

IC: incremento de conductividad; DE: desviación estándar

a-c: en la misma fila, letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada variedad.

1-3: en la misma columna, números diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada tiempo de extracción.

* Muestras analizadas: véase Tabla 8.

Contenido de compuestos bioactivos de la piel de mandarina tratada por ultrasonidos

Se aplica un tratamiento de ultrasonidos para extraer los compuestos bioactivos de la piel de mandarina. Se realiza una extracción control de las muestras en solución acuosa de etanol (50:50, v/v) a la misma temperatura (< 40 °C) y tiempos de extracción (como la extracción sin la aplicación de ultrasonidos) para comparar los resultados y establecer el efecto del método de extracción en la recuperación de compuestos bioactivos de la piel de mandarinas híbridas (en la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos). El valor medio de CFT en las muestras es de 862 mg GAE/100g PF. Según la variedad, la piel de mandarinas

Ortanique presenta la mayor concentración ($p < 0,05$) en comparación con los extractos de pieles de Clemenvilla y Nadorcott. El contenido promedio de CFT en los extractos de piel de Ortanique tratados por ultrasonidos fue 1022 ± 306 mg GAE/100g PF. En todas las muestras, el valor de CFT aumenta a medida que aumenta el tiempo de extracción ($p < 0,05$) de 5 a 30 min (685 ± 175 a 1059 ± 274 mg GAE/100g PF). Este incremento del contenido de polifenoles según el tiempo de extracción también es observado por Khan et al. (2010) quienes obtienen valores comprendidos entre 150 y 250 mg GAE/100g PF en piel de naranja (*C. sinensis* L.).

Por otro lado, Esparza-Martínez et al. (2016) obtienen 1826 mg GAE/100g PF de CFT en desechos cítricos. La diferencia en el contenido de polifenoles se debe a la constitución de las muestras de residuos de cítricos analizadas que incluyeron piel, membranas capilares y residuos de pulpa, mientras que en el presente estudio sólo se selecciona piel de mandarina. Además, Kour et al. (2014) determinan 1 710 mg GAE/100g de CFT en residuos secos de Kinnow (*C. nobilis* Lour x *C. deliciosa* Tenora). También se observan diferencias importantes según las diferentes especies de cítricos. Por ejemplo, Montero-Calderón et al. (2019) estiman 106 mg GAE/100 g PF en piel de naranja (*C. Sinensis*) tratada por ultrasonidos en las mismas condiciones de nuestro estudio (potencia de 400W, un tiempo de 30 min y 50% de etanol en agua), mientras que Nayak et al. (2015) obtienen concentraciones más altas de CFT en piel de *C. sinensis* tratada por ultrasonidos (1 035 mg GAE/100g).

Tabla 21. Contenido de compuestos bioactivos en extractos de piel de mandarinas según tiempo de extracción y variedad.

Compuestos bioactivos	Tiempo de extracción (min)	Clemenvilla	Nadorcott	Ortanique
CFT (mg GAE/100g PF)	5	602 ± 99 ^{a1}	611 ± 113 ^{a1}	809 ± 193 ^{b1}
	15	770 ± 178 ^{a2}	714 ± 115 ^{a2}	1047 ± 251 ^{b2}
	30	952 ± 168 ^{a3}	945 ± 215 ^{a3}	1230 ± 310 ^{b3}
FT (mg CE/100g PF)	5	43,2 ± 13,8 ^{a1}	41,7 ± 8,4 ^{a1}	44,0 ± 13,1 ^{a1}
	15	58,5 ± 22,4 ^{a2}	57,6 ± 10,8 ^{a2}	59,0 ± 17,0 ^{a2}
	30	76,7 ± 22,4 ^{a3}	69,0 ± 13,3 ^{a3}	67,4 ± 17,7 ^{a3}
CT (µg β-carotene/100g PF)	5	2852 ± 1372 ^{a1}	3662 ± 1729 ^{b1}	3222 ± 1214 ^{a1}
	15	3860 ± 1930 ^{a2}	6250 ± 3191 ^{b2}	5191 ± 1385 ^{a2}
	30	5245 ± 2180 ^{a3}	8173 ± 4547 ^{b3}	5909 ± 2638 ^{a3}
AA (mg/100g PF)	5	105 ± 50 ^{a1}	63,4 ± 22,2 ^{b1}	72,0 ± 32,3 ^{c1}
	15	124 ± 59 ^{a12}	75,0 ± 21,0 ^{b12}	88,5 ± 32,3 ^{b12}
	30	136 ± 56 ^{a2}	76,0 ± 24,0 ^{b2}	92,7 ± 42,1 ^{c2}

TPC: compuestos fenólicos totales; GAE: equivalente de ácido gálico; PF: peso fresco; DE: desviación estándar, FT: flavonoides totales, CE: equivalente de catequina; TC: carotenoides totales; AA: ácido ascórbico.

a-c: en la misma fila, letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada variedad.

1-3: en la misma columna, números diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada tiempo de extracción.

* Los valores están expresados en peso fresco (PF)

** Muestras analizadas: véase Tabla 8.

Ma et al. (2009) mencionan que la extracción asistida por ultrasonidos es un método eficaz para la obtención de compuestos fenólicos de la piel de los cítricos en comparación con los métodos convencionales. En el presente estudio, el contenido de CFT obtenido por ultrasonidos es 1,92 veces mayor que el método de extracción convencional. Este valor es similar a los resultados de Nipornram et al. (2018) quienes obtienen un contenido de CFT 1,77 más alto por ultrasonidos que un método convencional. Además, Wang et al. (2018) observan que el contenido de flavonoides extraídos de *C. reticulata* Blanco tratado por ultrasonidos fue 1,50 mayor que el de extracción convencional. Por su parte,

Boukroufa et al. (2015) mencionan que la extracción con ultrasonidos mejora el rendimiento de CFT en extractos de piel *C. sinensis* L. Osbeck obteniendo un contenido 1,42 veces mayor (41,2 y 58,6 mg GAE/100g PF para la extracción convencional y con ultrasonidos, respectivamente).

En general, se obtiene un intervalo de 602 ± 99 a $1\ 230 \pm 310$ mg GAE/100g PF de CFT en muestras tratadas por ultrasonidos. Para poder comparar con los resultados encontrados en la bibliografía, la concentración de CFT se expresa en peso seco (2406 a 4913 mg GAE/100g de CFT, aproximadamente). Estos resultados son similares a los obtenidos por Safdar et al. (2017), 2 439 y 3 248 mg de GAE/100g en polvo de piel de mandarina. Sin embargo, Nipornram et al. (2018) obtienen concentraciones mayores en piel en polvo de *C. reticulata* Blanco cv. Sainampueng tratada por ultrasonidos (14899 mg GAE/100g).

Además del método de extracción aplicado, los resultados muestran que las principales diferencias se observan según el tiempo de extracción. Estudios previos indicaron que a temperaturas relativamente más bajas (15 y 30 °C), los rendimientos de ácidos fenólicos aumentan con un mayor tiempo de extracción (de 10 a 40 min) (Ma et al., 2009). Además, Ferreira et al. (2018) determinan 1220 mg GAE/100 g de CFT en piel de mandarina (*C. reticulata*) mediante extracción con etanol acuoso (72%, v/v) (hirviendo 60 min), mientras que Ho & Lin (2008) obtienen concentraciones de 4080 mg GAE/100g sin calentamiento y de 5410 mg GAE/100g de CFT del extracto de polvo de piel de mandarina (*C. reticulata*) mediante extracción por calentamiento durante 180 min. Valores inferiores (121 mg GAE/100g PF) fueron obtenidos por Li et al. (2006) en muestras de piel de mandarinas (*C. reticulata* cv. Ellendale) obtenidos por extracción con etanol acuoso (72%, v/v) durante 180 min (20 - 80 °C).

El contenido de FT varía de $41,7 \pm 8,4$ a $76,7 \pm 22,4$ mg CE/100g PF en la piel tratada por ultrasonidos. Como se muestra en la Tabla 21, la concentración de FT

en piel de mandarina Clemenvilla, aumenta según se incrementa el tiempo de extracción. Además, las muestras tratadas por ultrasonidos durante 30 min presentan el mayor contenido ($p < 0,05$) de FT (valor medio de $71,5 \pm 19,2$ mg CE/100g PF de piel). Por su parte Ho & Lin (2008) obtienen un contenido de FT de 790 mg CE/100g en extracto de piel en polvo de mandarina (*C. reticulata*) mediante extracción en caliente con el mismo tiempo de extracción (30 min). Asimismo, las concentraciones de flavonoides son diferentes según las especies de cítricos, en esta línea Chen et al. (2011) determinan 13,0 mg CE/g de FT en piel fresca liofilizada de naranja (*C. sinensis* (L.) Osbeck). Otros autores indican la concentración de FT en piel de cítricos utilizando diferentes estándares de flavonoides como Ghasemi et al. (2009) que obtienen valores entre 30 y 3110 mg de equivalente de quercetina (EQ)/100g de PS en variedades de piel de mandarina (*C. reticulata* y *C. unshiu*) y Gómez-Mejía et al. (2019) determinan un contenido de FT de 1650 mg EQ/100g PS en piel de Clementina (*C. clementina*). En un estudio de Huang & Ho (2010) se obtienen 193 y 478 mg de equivalente de rutina/g PS de FT en polvo de piel de mandarina Murcott (*C. reticulata* x *C. sinensis*) y Ponkan (*C. reticulata* Blanco), respectivamente.

En las muestras estudiadas, las concentraciones más altas de CT ($p < 0,05$) se determinan en extractos de piel de mandarinas Nadorcott (5797 ± 3641 μ g de β -caroteno/100 g de PF). Como se observa en la Tabla 21, el contenido de CT en las muestras estudiadas varía de 2852 ± 1372 a 8173 ± 4547 μ g de β -caroteno/100g de PF. Estos resultados están de acuerdo con los valores obtenidos por Lado et al. (2019) que oscilan entre 3000 y 4000 μ g β -caroteno/100g PF. La mayor extracción se produce al tratar las muestras con ultrasonidos durante 30 min ($p < 0,05$). Sun et al. (2011) observan que el rendimiento de extracción de todo-trans- β -caroteno mejora con el tiempo de extracción aumentado de 20 a 40 min por ultrasonidos. Este tratamiento facilita la liberación de carotenoides de la

matriz al medio de extracción, así como también puede mejorar el poder de extracción porque pueden conducir el solvente al interior de la matriz para extraer los carotenoides. Por su parte, Yoo & Moon (2016) obtienen 60 100 μg β -caroteno/100g de CT en piel pulverizada de mandarina Kjooll (*C. unshiu* Marcow) por extracción con acetona (maceración), mientras que Wang et al. (2008) obtienen un contenido de CT de 204 000 μg β -caroteno/100g PS por extracción soxhlet en piel de mandarina Ponkan (*C. reticulata* Blanco).

Las concentraciones de AA que se obtienen en las muestras estudiadas se muestran en la Tabla 21. La concentración media de AA es mayor en extractos de piel de Clemenvilla ($122 \pm 55,2$ mg AA/100g PF) que en Nadorcott y Ortanique ($70,8 \pm 22,5$ y $84,0 \pm 36,3$ mg AA/100g PF, respectivamente). Estos resultados son mayores al contenido de AA (24,4 - 65,6 mg/100g) determinado por Canan et al. (2016) en diferentes variedades de mandarinas (Robinson, Clementine, Kara) y algunos híbridos (híbridos clementina \times Kara).

Capacidad antioxidante de la piel de mandarina tratada por ultrasonidos

La capacidad antioxidante de los extractos se evalúa mediante los métodos DPPH y TEAC. En la Tabla 22 puede observarse, que si las muestras se tratan por ultrasonidos durante 30 min, se obtienen los extractos con mayor actividad antioxidante ($p < 0,05$), debido a las altas cantidades de compuestos bioactivos en estas muestras, tal como ya se ha descrito anteriormente. Los valores promedio del método DPPH para las muestras tratadas por ultrasonidos y EC durante 30 min son $11,2 \pm 4,0$ y $6,3 \pm 3,2$ mmol TE/100g PF, respectivamente y para el método TEAC son $29,2 \pm 5,6$ y $16,8 \pm 4,2$ mmol TE/100g, respectivamente.

Tabla 22. Capacidad antioxidante de piel de mandarinas tratadas por ultrasonidos.

Método	Tiempo de extracción (min)	Clemenvilla	Nadorcott	Ortanique
DPPH (mmol TE/100g PF)	5	9,4 ± 2,7 ^{a1}	6,0 ± 1,8 ^{b1}	5,7 ± 1,9 ^{b1}
	15	12,9 ± 4,4 ^{a12}	7,9 ± 2,0 ^{b12}	8,0 ± 2,3 ^{b12}
	30	14,2 ± 4,0 ^{a2}	9,0 ± 1,4 ^{b2}	9,1 ± 2,6 ^{b2}
TEAC (mmol TE/100g PF)	5	20,2 ± 4,3 ^{ab1}	18,1 ± 4,3 ^{a1}	21,2 ± 5,2 ^{b1}
	15	25,2 ± 5,9 ^{ab2}	20,9 ± 3,2 ^{a2}	24,9 ± 5,5 ^{b2}
	30	30,4 ± 5,7 ^{ab3}	26,9 ± 6,2 ^{a3}	29,2 ± 5,6 ^{b3}

DPPH: método de eliminación del radical 2,2'-difetil-1-picirilhidrazilo; TE: Trolox equivalente; DE: desviación estandar, TEAC: capacidad antioxidante equivalente de trolox.

a-b: en la misma fila, letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada variedad.

1-3: en la misma columna números diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de cada tiempo de extracción.

* Los valores están expresados en peso fresco (PF)

** Muestras analizadas: véase Tabla 8.

Como se observa en la Figura 31a, con la EC se obtiene la capacidad antioxidante más baja ($p < 0,05$) según los métodos DPPH y TEAC. Hayat et al. (2009) obtuvieron resultados similares, dado que observan una mayor captación de radicales ($p < 0,05$) en la piel de mandarina tratadas por ultrasonidos que con un método convencional (extracción rotatoria). Montero-Calderon et al. (2019) obtienen $3,97 \pm 0,2$ mmol TE/100g en muestras en piel de naranja tratadas por ultrasonidos (400 W, 30 min, etanol al 50%).

En la Figura 31b se observa que los extractos de piel de Clemenvilla y Ortanique obtenidos por ultrasonidos son las muestras con mayor actividad antioxidante según los métodos DPPH y TEAC respectivamente ($12,2 \pm 4,3$ y $25,7 \pm 6,4$ mmol TE/100g PF, respectivamente). Esto puede ser debido a que en el caso de los extractos de piel de Clemenvilla, los flavonoides y el ácido ascórbico son los principales compuestos antioxidantes, mientras que las muestras de Nadorcott y Ortanique presentan un mayor contenido de

carotenoides que las muestras de Clemenvilla. Los valores de la capacidad antioxidante son más bajos en el método DPPH que con el método TEAC (véase Figura 31), según Müller et al. (2011) los carotenoides no pueden captar el radical DPPH[•]. Gironés-Vilaplana et al. (2014) obtienen resultados similares en muestras de mandarina Murcott. Los diferentes valores de capacidad antioxidante total obtenidos en los ensayos realizados pueden reflejar una diferencia relativa en la capacidad de los compuestos bioactivos en las muestras para conjugar los radicales peroxilo acuosos y reducir los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} en métodos *in vitro*.

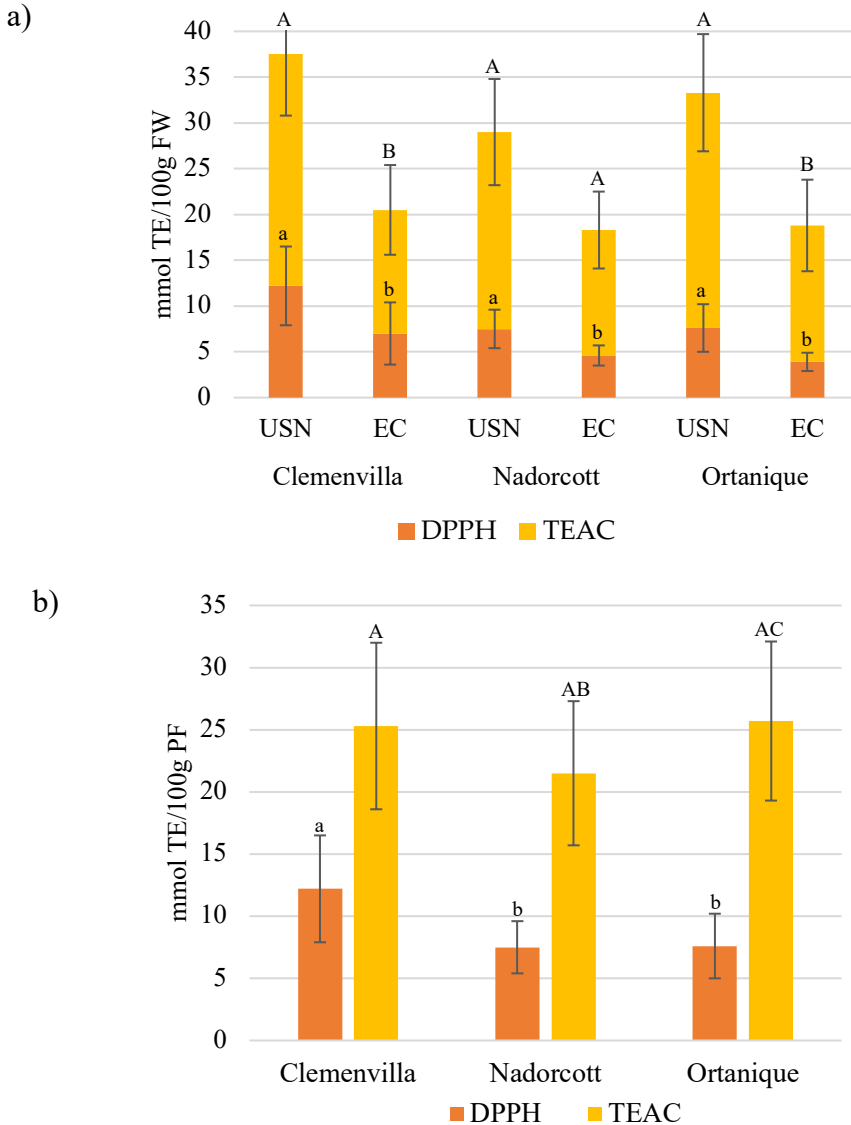
Para analizar la influencia de compuestos bioactivos (CFT, FT, CT y AA) sobre la capacidad antioxidante (mmol TE/100g PF) evaluada por los métodos DPPH y TEAC se realiza un análisis de regresión múltiple. Los resultados se ajustan a un modelo lineal que se muestran en la Ecuación 3 ($R^2 = 17,9$, error estándar= 0,58) para el método DPPH y Ecuación 4 ($R^2 = 57,9$, error estándar= 454) para el método TEAC:

$$\text{DPPH} = 2,42 \cdot 10^{-3} + 7,76 \cdot 10^{-3} \cdot \text{FT} + 4,37 \cdot 10^{-3} \cdot \text{AA} - 2,60 \cdot 10^{-5} \cdot \text{CT} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\text{TEAC} = 545 + 9,4 \cdot \text{FT} + 3,5 \cdot \text{AA} + 1,2 \cdot \text{CFT} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Dónde, FT son flavonoides totales (mg CE/100g PF), AA es ácido ascórbico (mg/100g PF), CT son carotenoides totales ($\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/100g PF}$) y CFT son compuestos fenólicos totales (mg GAE/100g PF).

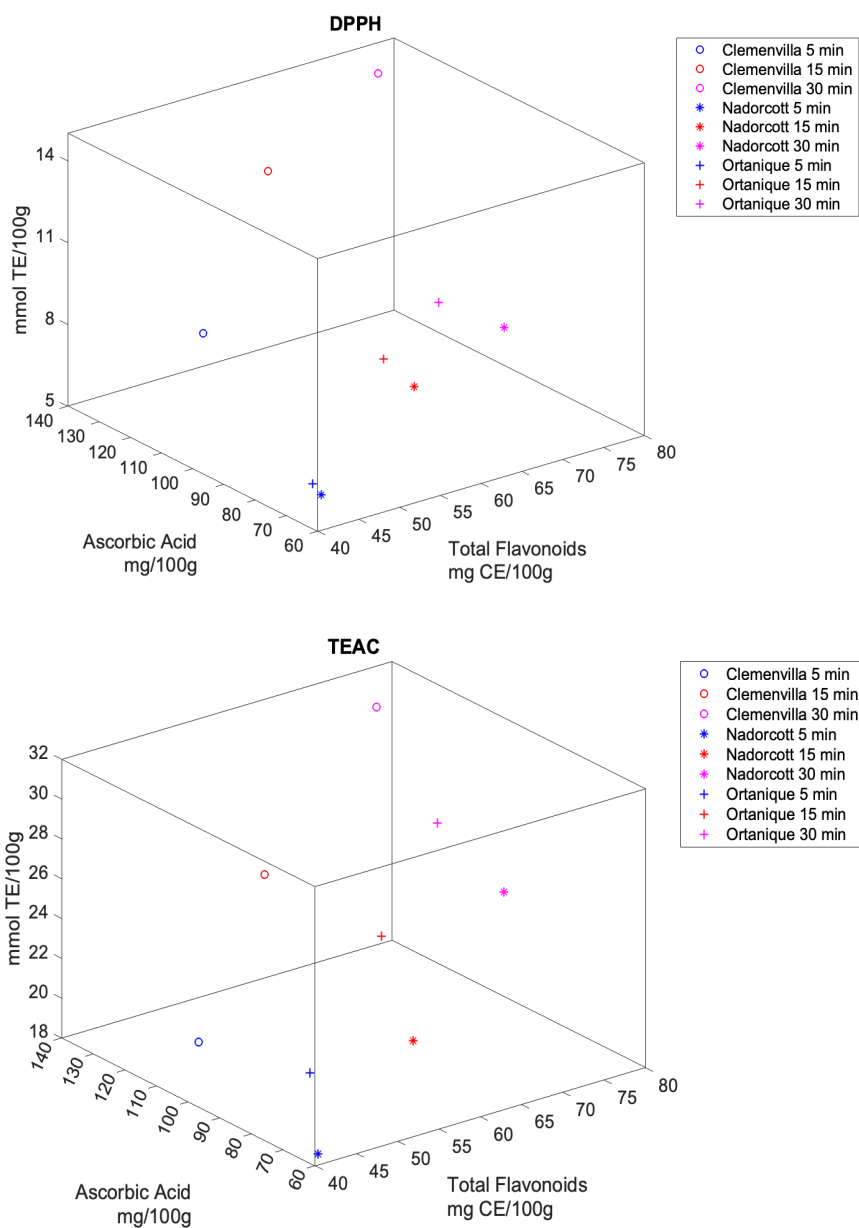
El ajuste es significativo en ambos casos ($p < 0,01$). Se puede observar que tanto el contenido de FT como el de AA influyen en la capacidad antioxidante determinada por los métodos DPPH y TEAC ($p < 0,01$) (véase Figura 32). Singanusong et al. (2015) observan en su estudio, que el contenido de FT obtenido de piel de mandarina, tiene una correlación significativa ($p < 0,01$) con la capacidad antioxidante obtenida por DPPH y TEAC.



USN: extracción asistida por ultrasonidos; EC: extracción control; DPPH: método de eliminación del radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo; TEAC: capacidad antioxidante equivalente de trolox. a-c: en la misma fila, letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de DPPH.

A-C: en la misma fila, diferentes letras mayúsculas indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de TEAC.

Figura 31. Diferencias de capacidad antioxidante evaluadas por métodos DPPH y TEAC según a) variedades de piel de mandarinas tratadas por ultrasonidos y b) métodos antioxidantes aplicados.



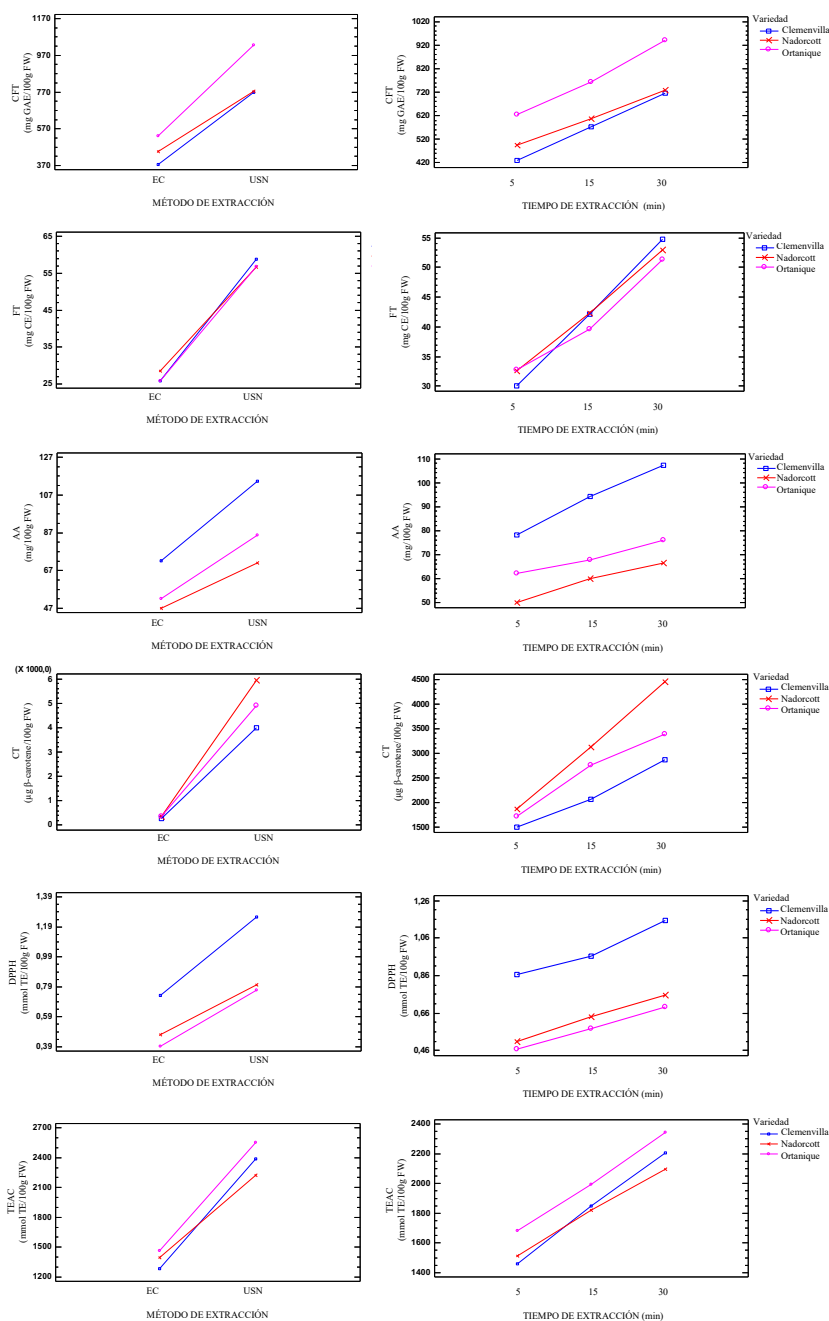
TE: equivalente de trolox, CE: equivalente de catequina.

Figura 32. Ácido ascórbico, Flavonoides totales y valores de DPPH y TEAC de piel de mandarinas híbridas tratadas por ultrasonidos durante 5, 15 y 30 min.

Efecto del método de extracción y el tiempo de extracción sobre las propiedades fisicoquímicas y la recuperación de compuestos bioactivos

En la Figura 33 se observa que el tiempo de extracción afecta a los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de la piel de mandarinas híbridas. Como se observa, los valores obtenidos aplicando ultrasonidos durante 5 min son superiores a los valores de la EC durante 30 min. En este sentido, la aplicación de ultrasonidos permite maximizar la recuperación de compuestos antioxidantes con menor tiempo de extracción. El análisis ANOVA muestra que el método y el tiempo de extracción tienen una influencia significativa ($p < 0,05$) en los valores de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante con un nivel de confianza del 95%. Además, la interacción variedad/método de extracción influye significativamente en los valores medios. La mayor recuperación de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante se obtiene con la extracción por ultrasonidos durante 30 min.

La extracción de CFT, CT y AA también está influenciada significativamente ($p < 0,05$) por la variedad de mandarinas. Los extractos de piel de mandarina Clemenvilla tienen las mayores cantidades de CFT, FT, AA ($p < 0,05$) en cada tiempo de extracción (5, 15 o 30 min). La interacción del método de extracción/tiempo influye de forma significativa ($p < 0,05$) en CFT, FT y CT. Además, el análisis de la varianza confirma un aumento significativo de la capacidad antioxidante cuando las pieles son tratadas por ultrasonidos ($p < 0,05$). Asimismo se observa que los valores de DPPH y TEAC son fuertemente influenciados por la variedad de mandarinas y por la interacción entre el método de extracción/tiempo ($p < 0,05$).



CFT: compuestos fenólicos totales; GAE: equivalente de ácido gálico, EC: extracción convencional; USN: extracción asistida por ultrasonidos, FT: flavonoides totales, CE: equivalente de catequina, AA: ácido ascórbico, CT: carotenoides totales.

Figura 33. Análisis de la varianza de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de extractos piel de mandarinas híbridas.

Efecto de los ultrasonidos sobre el índice de extracción

Como se observa, la aplicación de ultrasonidos potencia la recuperación de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de piel de mandarina. Se calcula el índice de extracción con la siguiente ecuación:

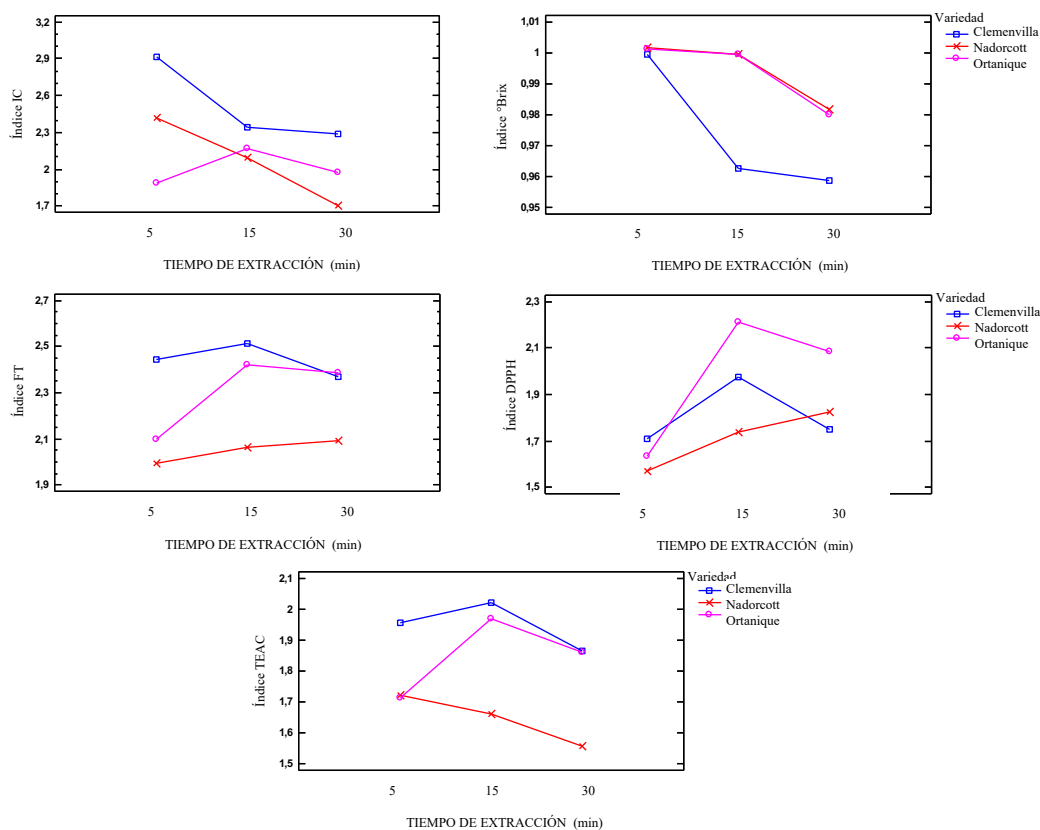
$$\text{Índice de extracción} = \frac{C_{USN}}{C_U} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Dónde C_U es el valor de la variable estudiada sin la aplicación del ultrasonidos y C_{USN} es el valor obtenido después del tratamiento de las muestras con ultrasonidos.

Se puede observar, en la Figura 34, que el índice de extracción de los parámetros físico-químicos, el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante, mejora a medida que aumenta el tiempo de extracción de 5 min a 30 min. Sin embargo, se observa que el incremento de los valores de °Brix e IC ocurre durante los primeros 5 min de extracción ($p < 0,05$), lo que indica que el tratamiento con ultrasonidos no influye en los valores finales obtenidos a los 30 min. En la mayoría de los casos, los valores del índice de extracción de las propiedades físico-químicas, las concentraciones de compuestos bioactivos y los valores de capacidad antioxidante disminuyen hasta alcanzar los 30 min de tratamiento. Kumari et al. (2017) observaron en su estudio que la tasa de extracción de algunos polifenoles de muestras de piel de patata es mayor al inicio del tratamiento, pero con mesetas hacia el final del tiempo de extracción.

El tratamiento con ultrasonidos tiene un efecto sobre las propiedades estructurales de cada variedad de muestras en diferente intensidad y esto puede afectar la difusión del soluto en las muestras de piel en diferentes grados según la variedad (Wang et al., 2018). Se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) para el incremento del índice de extracción en los valores de IC, °Brix, FT, DPPH

y TEAC de la piel de las mandarinas (Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique) analizadas, reflejandose la diferente estructura de su piel. En particular, los valores más altos de conductividad durante el tratamiento se observan a los 15 min de tratamiento en las muestras de Ortanique. El índice de extracción de los valores de FT, DPPH y TEAC también se incrementa a los 15 min de extracción, siendo influenciado por la variedad de las muestras ($p < 0,05$).



IC: incremento de conductividad, FT: flavonoides totales.

Figura 34. Índice de extracción de Incremento de Conductividad, °Brix, Flavonoides Totales, DPPH y TEAC en extractos de piel de mandarinas híbridas.

4.2.3. Conclusiones

La aplicación de ultrasonidos produce una mejora en el proceso de extracción medido en función de las propiedades fisicoquímicas, el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante, y en la mayoría de los casos la variedad de mandarinas tiene una fuerte influencia ($p < 0,05$). La capacidad antioxidante, evaluada mediante métodos DPPH y TEAC, está influenciada principalmente ($p < 0,05$) por los flavonoides y el contenido de ácido ascórbico en las muestras. A pesar de que se determinan valores más altos en muestras tratadas durante 30 min, el análisis del índice de extracción demuestra que en algunos casos, los valores más altos en relación a un proceso extractivo de control se obtienen entre los primeros 5 y 15 min de extracción (IC, °Brix, FT, DPPH y TEAC). Esto sugiere que el corto tiempo de extracción es un parámetro eficaz para obtener altas cantidades de compuestos bioactivos a partir de piel de mandarinas híbridas. Los resultados obtenidos demuestran que los ultrasonidos es un método de extracción eficaz para la recuperación de compuestos bioactivos de las muestras analizadas y su aplicación a escala industrial podría ser una aproximación prometedora.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EXTRACTOS DE PIEL DE MANDARINAS HÍBRIDAS

La recuperación de polifenoles en residuos de vegetales se puede realizar empleando diferentes técnicas de extracción y separación. Los procedimientos de extracción no son específicos para los polifenoles como analitos de interés, por eso se requieren procesos de purificación para eliminar otros compuestos, que pueden afectar interfiriendo en el análisis de compuestos fenólicos de los extractos de piel de cítricos.

La piel de mandarina representa aproximadamente el 35 - 40% del peso del fruto (Safdar et al., 2017) y es una fuente abundante de flavonoides naturales (Hu et al., 2019), además de contener grandes cantidades de otros compuestos bioactivos, de modo que sus extractos o los compuestos de interés aislados pueden utilizarse como nutraceuticos o alimentos funcionales, que buscan contribuir a la mejora de la salud (Singanusong et al., 2015).

Este apartado aborda el análisis de los compuestos fenólicos presentes en la piel de tres variedades de mandarina híbridas que han sido poco estudiadas, pero que tienen potencial como fuente natural de compuestos funcionales. Se realiza la extracción con ultrasonidos, y se analiza el perfil de compuestos fenólicos por HPLC-UV, con una purificación previa con EFS-C₁₈ para determinar los compuestos fenólicos presentes en la piel de mandarinas híbridas, para posteriormente ser confirmados y cuantificados por UPLC-qTOF-MS/MS.

4.3.1. Material y Métodos

Muestras

La selección y preparación de las muestras se describe en la sección 3.1 y 3.1.2.2.

Para realizar los ensayos de optimización del método de validación se mezclan los extractos en volúmenes iguales por cada muestra, para evitar la variabilidad debida a la variedad y tiempo de recolección. Esto se realiza para cada una de las tres variedades.

Método de purificación para el análisis de compuestos fenólicos en extractos de piel de mandarinas híbridas

La descripción del método de purificación seleccionado para la determinación de los compuestos fenólicos en los extractos de piel de mandarinas híbridas se muestra en la sección 3.5.1.

Detección de compuestos fenólicos por HPLC-UV

En este apartado se describe la puesta a punto y validación del método de HPLC-UV para la determinación de los compuestos fenólicos en los extractos de piel de mandarinas híbridas. Las condiciones seleccionadas y el método operatorio se muestran en la sección 3.5.2.

Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por UPLC-qTOF-MS/MS

Las condiciones seleccionadas y el método operatorio se muestran en la sección 3.5.3.

Análisis estadístico

Para comprobar la influencia de las diferentes variedades de mandarina híbridas sobre el rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos se realiza un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor controlado (variedad). En el caso de que existan diferencias significativas ($p < 0,05$), se realiza un *test* de *Tukey* para comprobar que valores difieren. Los coeficientes de correlación de *Spearman* y el análisis de componentes principales (APC) se calculan utilizando el *software* R, versión 1.4.1717 (R Core Team, 2020). La matriz de correlación

se explica utilizando el paquete R “*corrplot*” (Wei et al., 2021). Se aplica el ACP para explicar la variabilidad de los parámetros, y para graficar los resultados se utiliza el paquete R “*ggplot2*” (Wickham, 2016).

4.3.2. Resultados y discusión

Etapas de purificación de los extractos de piel de mandarina.

Para seleccionar el método que permita la separación y cuantificación de los compuestos fenólicos de los extractos obtenidos, se ensayan diferentes métodos de purificación. La selección del método adecuado se realiza en base a la identificación de los patrones fenólicos, la resolución de los picos y definición del cromatograma (véase Tabla 23).

Validación del método EFS-C₁₈/HPLC-UV puesto a punto para la determinación de compuestos fenólicos de los extractos de piel de mandarina

Para evaluar la efectividad del método EFS-C₁₈/HPLC-UV empleado para determinar el perfil de compuestos fenólicos presentes en piel de mandarina sometida a un proceso de extracción por ultrasonidos, se realiza la validación del método. Para ello se determina la linealidad, el límite de detección y de cuantificación (LOD y LOQ), la precisión intra-día e inter-día, la exactitud y el efecto matriz empleando los estándares de polifenoles seleccionados (Figura 35).

Tabla 23. Métodos de purificación estudiados en los extractos de piel de mandarinas para la detección de compuestos fenólicos.

Método	Pre-tratamiento	Alicuota ^{+,++}	Extracción	Purificación ⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
EFS	USN (30') (ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	5 mL extracto ac.*	200 mg C ₁₈ + elución 12 mL acetona		Quercitina	✓	✓	✓	Montero-Calderon et al. (2019)
						✓	-	-	
						✓	-	-	
						✓	✓	×	
Baño USN (30')	(ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	5 mL extracto	200 mg de C ₁₈ + elución 12 mL acetona (rotavapor)		-	-	×	×	
			200 mg de C ₁₈ + 12 mL acetona		-	-	✓	✓	
USN (30')	(ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	5 mL extracto ac.*	200 mg de C ₁₈ + elución 12 mL acetona		Rutina Hesperitina Quercitina	✓	✓	✓	
USN (30')	(ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	5 mL extracto, ac.* ++	200 mg de C ₁₈ + elución 5 mL metanol (evaporado y reconstituido con 0,5 mL MeOH- HCl 0,6M)		Ac. hidroxibenzoico Rutina Naringina Quercitina Naringenina Kaempferol	✓	✓	×	-

Tabla 23. Continuación.

Método	Pre-tratamiento	Alícuota ^{+,++}	Extracción	Purificación ⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
EFS	USN (30') (ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	5 mL extracto + 15 mL agua, ac.* ⁺⁺	200 mg de C ₁₈ + lavado ac.* + elución 3 mL metanol ac.* (evaporado y reconstituido con 0,5 mL MeOH-HCl 0,6M)	5 mL agua	Ac. hidroxibenzoico Rutina Naringina Quercitina Naringenina Kaempferol	✓	✗	✓	Gonzales et al. (2015)
		1 mL extracto + 19 mL agua, ac.* ⁺⁺	200 mg de C ₁₈ + lavado ac.* + elución 3 mL acetonitrilo ac.*	5 mL agua	Ac. hidroxibenzoico Rutina Naringina Quercitina Naringenina Kaempferol	✓	✗	✓	
		5 mL extracto + 15 mL agua ac.* ⁺⁺	200 mg de C ₁₈ + elución 3 mL metanol ac.*		Ac. hidroxibenzoico Rutina Naringina Quercitina Naringenina Kaempferol Ac. clorogénico Narirutina Hesperidina Ac. <i>p</i> -cumárico Apigenina Hesperitina	✗	✓	✓	

Tabla 23. Continuación.

Método	Pre-tratamiento	Alicuota ^{+,++}	Extracción	Purificación ⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
DLLME	USN (30') (ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	5 mL extracto	3 mL de acetato de etilo + 1,5 mL de acetonitrilo (s.dis)	600 mg MgSO ₄	-	-	×	×	Farajzadeh & Abbaspour (2017)
ELL + EFS	USN (30') (ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	5 mL extracto ac.* ⁺⁺⁺	5 mL acetato de etilo x2 + 0,5 mg NaCl (evaporar rotavapor, reconstituir 20 mL agua ac.)	200 mg C ₁₈ + elución 3 mL metanol (ac.)* (evaporación N ₂)	Ac. hidroxibenzoico Rutina Naringina Quercitina Naringenina Kaempferol	×	✓	✓	Wang et al. (2014)
SULLE	USN (30') (ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	5 mL extracto	2,5 mL de acetonitrilo + 2,5 mL de acetato de etilo	1 mL solución de azúcar	-	*no se observa separación de fases durante la extracción			Farajzadeh & Abbaspour (2017)
QuEChERS	USN (30') (ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	5 mL extracto	5 mL acetonitrilo: acetato de etilo, 50:50, v/v ac.* + 0,5 g NaCl + 2g MgSO ₄	2 mL sobrenadante + 600 mg de Na ₂ SO ₄	-	-	×	×	Galarce-Bustos et al. (2019)
	USN (5') (ratio 6:12; agua, ac.*)	12 mL extracto + 10 mL acetonitrilo	10 mL acetonitrilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 25 mg de C ₁₈ + 150 mg de Na ₂ SO ₄	-	-	✓	×	Rotta et al. (2019)

Tabla 23. Continuación.

Método	Pre-tratamiento	Alícuota ^{+,++}	Extracción	Purificación ⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
QuEChERS	USN (5') (ratio 6:20; agua, ac.*)	15 mL extracto + 10 mL acetonitrilo	10 mL acetonitrilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 25 mg de C ₁₈ + 150 mg de Na ₂ SO ₄	-	-	✓	✓	Rotta et al. (2019)
				1 mL sobrenadante + 150 mg de Na ₂ SO ₄	Ác. cafeico Ác. ferúlico Ác. transcinámico	✓	✓	×	
	USN (5') (ratio 6:20 agua ac.*)	15 mL extracto + 10 mL acetonitrilo	10 mL acetonitrilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 25 mg de C ₁₈ + 150 mg Na ₂ SO ₄	transcinámico	Ác. cafeico Ác. ferúlico Ác. transcinámico	✓	✓	✓
				2 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄			✓	✓	×
				1 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄ + 25 mg de C ₁₈			✓	✓	×
	USN (5') (ratio 6:20 agua ac.*) (centrifuga 5')	15 mL Sobrenadante	10 mL acetonitrilo + 4 g Na ₂ SO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄	transcinámico	Ác. cafeico Ác. ferúlico Ác. transcinámico	✓	✓	✓
				1 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄ + 25 mg de C ₁₈			✓	✓	×
				2 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄			✓	✓	×
				2 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄ + 25 mg de C ₁₈			✓	✓	×
				2 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄ + 50 mg de C ₁₈			✓	✓	×

Tabla 23. Continuación.

Método	Pre-tratamiento	Alicuota ^{+,++}	Extracción	Purificación ⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
QuEChERS	USN (5') (ratio 6:20; agua ac.*)	15 mL extracto	+ 10 mL acetonitrilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄	Ác. cafeico Ác. ferúlico Ác. transcinámico	✓	×	×	Rotta et al. (2019).
	USN (10') (ratio 6:20; agua ac.*)					✓	✓	✓	
	USN (15') (ratio 6:20; agua ac.*)					✓	✓	✓	
Polytron (5')	(ratio 6:12; agua, ac.*)	12 mL extracto + 10 mL acetonitrilo	10 mL acetonitrilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 25 mg de C ₁₈ + 150 mg de Na ₂ SO ₄	-	-	×	×	
Polytron (5')	(ratio 6:20; agua, ac.*)	15 mL extracto + 10 mL acetonitrilo	10 mL acetonitrilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 25 mg de C ₁₈ + 150 mg de Na ₂ SO ₄	-	-	×	×	
		15 mL extracto + 10 mL acetonitrilo	10 mL acetonitrilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 150 mg de Na ₂ SO ₄ 1 mL sobrenadante + 25 mg de C ₁₈	Ác. cafeico Ác. ferúlico Ác. transcinámico	✓	×	×	
						✓	×	×	

Tabla 23. Continuación.

Método	Pre-tratamiento	Alícuota ^{+,++}	Extracción	Purificación ⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
QuEChERS	Polytron (5') (ratio 6:20, agua ac.*) (centrifuga 5')	15 mL Sobrenadante	10 mL acetoni-trilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄	Ác. cafeico Ác. ferúlico	✓	×	×	Rotta et al. (2019)
				1 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄ + 25 mg de C ₁₈	Ác. transcinámico	✓	×	×	
				2 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄		✓	×	×	
				2 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄ + 25 mg de C ₁₈		✓	×	×	
				2 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄ + 50 mg de C ₁₈	Ác. cafeico Ác. ferúlico Ác. transcinámico	✓	×	×	
	Polytron (5') (ratio 6:20, agua ac.*) (centrifuga 5')	15 mL Sobrenadante	10 mL acetoni-trilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	2 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄ + 50 mg de C ₁₈	Ác. cafeico Ác. ferúlico Ác. transcinámico	✓	×	×	
	Vórtex (5') (ratio 6:12; agua, ac.*)	12 mL extracto + 10 mL acetoni-trilo	10 mL acetoni-trilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 25 mg de C ₁₈ + 150 mg de Na ₂ SO ₄	-	-	×	×	
	Vórtex (5') (ratio 6:20; agua, ac.*)	15 mL extracto + 10 mL acetoni-trilo	10 mL acetoni-trilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 25 mg de C ₁₈ + 150 mg de Na ₂ SO ₄	-	-	×	×	
				1 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄	Ác. cafeico Ác. ferúlico	×	×	×	
				1 mL sobrenadante + 25 mg de C ₁₈	Ác. transcinámico	×	×	×	

Tabla 23. Continuación.

Método	Pre-tratamiento	Alicuota ^{+,++}	Extracción	Purificación ⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
QuEChERS	Vórtex (5') (ratio 6:20; agua ac.*) (centrifuga 5')	15 mL Sobrenadante	10 mL acetoniitrilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄	Ác. cafeico Ác. ferúlico Ác. transcinámico	✓	✓	×	Rotta et al. (2019)
				1 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄ + 25 mg de C ₁₈		✓	✓	✓	
				2 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄		✓	✓	×	
				2 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄ + 25 mg de C ₁₈		✓	✓	×	
				2 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄ + 50 mg de C ₁₈		✓	✓	×	
	Vórtex (5') (ratio 6:20; agua ac.*)	15 mL extracto	10 mL acetoniitrilo + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 mL sobrenadante + 150 mg Na ₂ SO ₄	Ác. cafeico Ác. ferúlico Ác. transcinámico	✓	×	×	
	Vórtex (10') (ratio 6:20; agua ac.*)					✓	×	×	
	Vórtex (15') (ratio 6:20; agua ac.*)					✓	×	×	
	Difusión (5') (ratio 6:20; agua ac.*)					✓	✓	×	
	Difusión (10') (ratio 6:20; agua ac.*)					✓	✓	×	

Tabla 23. Continuación.

Método	Pre-tratamiento	Alicuota ^{+,++}	Extracción	Purificación ⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
QuEChERS	Difusión (15') (ratio 6:20; agua ac.*)	15 mL extracto	10 mL	1 mL	Ác. cafeico	✓	✓	×	Rotta et al. (2019)
			acetonitrilo + 4	sobrenadante +	Ác. ferúlico				
			g MgSO ₄ + 1 g	150 mg Na ₂ SO ₄	Ác.				
			NaCl		transcinámico				
Baño USN (30')	5 mL extracto + 10 mL acetonitrilo + 4 g Na ₂ SO ₄ + 1 g Na (centrífuga 5') = 1 mL (acetonitrilo)	sobrenadante (rotavapor) x 2	1 mL	1 mL	-	-	×	×	
			sobrenadante +	sobrenadante +					
			150 mg de	150 mg de					
			Na ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄					
USN (30')	1,5 mL extracto ⁺⁺	-	150 MgSO ₄ + 25	150 mg de	-	-	×	×	
			mg PSA + 25 mg	Na ₂ SO ₄					
			de C ₁₈						
USN (30')	1,5 mL extracto ⁺⁺	-	150 MgSO ₄ + 25	150 mg PSA + 25 mg	-	-	✓	✓	WATERS (2015)
			mg PSA + 25 mg	de C ₁₈					

Tabla 23. Continuación.

Método	Pre-tratamiento	Alicuota ^{+,++}	Extracción	Purificación ⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
QuEChERS	USN (30') (ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	1,5 mL extracto ⁺⁺	-	150 MgSO ₄ + 25 mg PSA + 25 mg de C ₁₈	Ac. hidroxibenzoico Rutina Naringina Quercitina Naringenina Kaempferol Ac. clorogénico Narirutina Hesperidina Ac. <i>p</i> -cumárico Apigenina Hesperitina	✓	✓	✓	WATERS (2015)

EFS: extracción en fase sólida; DLLME: microextracción líquido-líquido dispersa; EBH: estirenodivinilbenceno; ELL: extracción líquido-líquido; QuEChERS: Rápido, fácil, económico, eficaz, resistente y seguro; SULLE: extracción con líquido azucarado; USN: ultrasonidos; PSA: amina primaria-secundaria.

⁺ En todos los casos, salvo sea indicado, el extracto se evapora con N₂ y se reconstituye con 1 mL de MeOH-HCl 0,6M

⁺⁺ Se realiza el mismo ensayo utilizando el solvente de extracción en lugar del extracto

*ac.: acidificado con 0,1 % de HCOOH

✓ : se observa; ✗: no se observa; - : no corresponde

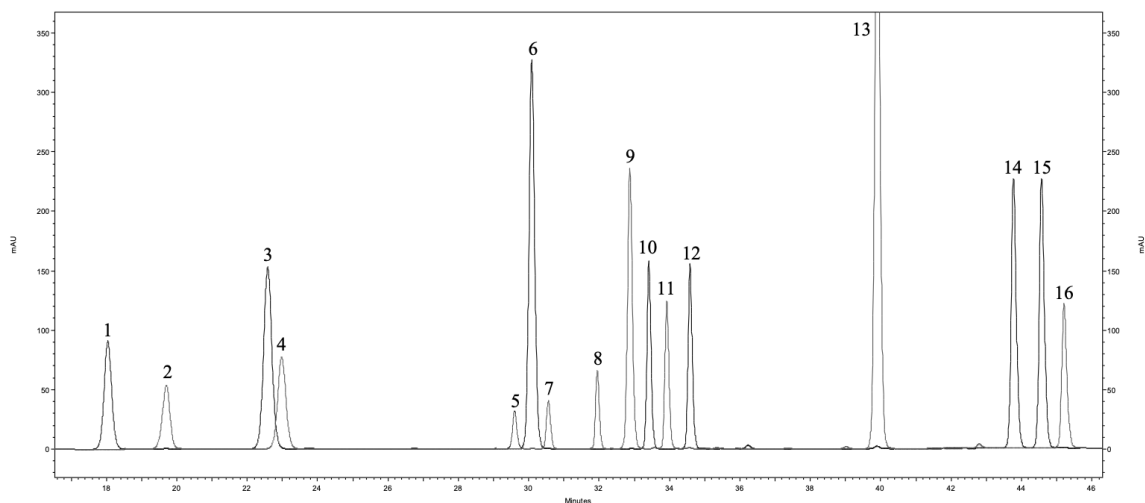


Figura 35: Cromatogramas de patrones de compuestos fenólicos a 280 nm por HPLC-UV.: Picos: 1– catequina; 2– ácido 4-hidroxibenzoico; 3– ácido cafeico; 4– ácido vainílico; 5– quercetina; 6– ácido clorogénico ; 7– ácido p-cumárico; 8– rutina; 9– ácido ferúlico; 10– narirutina; 11– naringina; 12– hesperidina; 13– ácido transcinámico; 14– naringenina; 15– apigenina; 16– hesperitina.

La linealidad se evalúa mediante una curva de calibrado. Las áreas de los picos cromatográficos se analizan mediante regresión lineal de mínimos cuadrados y la linealidad se evalúa en términos de valor de R^2 . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 24. La concentración de los polifenoles en la muestra está incluida en el intervalo de concentración estudiado en cada caso. La linealidad muestra coeficientes de determinación aceptables ($R^2 \geq 0,99$).

Los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) se determinan en función del área que produce la relación señal-ruido (*signal/noise* (S/N)) igual o superior a 3 y 10 veces, respectivamente. Los límites LOD y LOQ ($n=10$) se determinan a partir del nivel de concentración más bajo ($\mu\text{g/mL}$) necesario para detectar y cuantificar cada analito. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 25. El método seleccionado muestra valores de LOD en un intervalo desde 0,001 a 0,160 $\mu\text{g/mL}$. Los valores de LOQ se determinan en un intervalo de 0,003 a 0,291 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 24. Intervalos y parámetros de linealidad del método EFS-C₁₈/HPLC-UV para la determinación de compuestos fenólicos en piel de mandarinas híbridas.

Nº	Analitos	RT min	Linealidad µg/mL	Ecuación de la regresión	R ²
1	catequina	18,8		$y = 320042x + 359798$	0,9976
2	ácido 4-hidroxibenzoico	19,3		$y = 751805x + 318764$	0,9999
3	ácido cafeico	23,7		$y = 1525550x + 119630$	0,9999
4	ácido vanílico	24,5	0 - 50 (n= 8)	$y = 775636x + 37769$	0,9999
5	quercetina	30,1		$y = 863762x - 984000$	0,9996
6	ácido clorogénico	30,6		$y = 203099x - 207727$	0,9975
7	ácido <i>p</i> -cumárico	30,9		$y = 2112138x + 192462$	0,9999
8	rutina	31,7	0 - 100 (n=10)	$y = 311776x - 51542$	0,9993
9	ácido ferúlico	33,4	0 - 50 (n= 8)	$y = 1125079x + 177255$	0,9999
10	narirutina	33,5	0 - 400 (n=13)	$y = 665898x - 929789$	0,9998
11	naringina	34,0	0 - 100 (n=10)	$y = 682922x - 47761$	0,9999
12	hesperidina	34,6	50 - 400 (n=10)	$y = 236102x + 742199$	0,9993
13	ácido <i>trans</i> -cinámico	40,8		$y = 4410891x + 613387$	0,9999
14	naringenina	44,1	0 - 50 (n= 8)	$y = 1336871x + 305259$	0,9999
15	apigenina	44,7		$y = 1032404x - 67261$	0,9999
16	hesperitina	45,0	0 - 100 (n=10)	$y = 1497015x - 60240$	0,9999

RT: tiempo de retención; x: concentración en µg/mL; y: área del pico cromatográfico

Tabla 25. Límites de detección y cuantificación de los compuestos fenólicos estudiados.

Nº	Analitos	RT min	LOD µg/mL	LOQ µg/mL
1	catequina	18,8	0,125	0,212
2	ácido 4-hidroxibenzoico	19,3	0,038	0,065
3	ácido cafeico	23,7	0,010	0,030
4	ácido vanílico	24,5	0,038	0,100
5	quercetina	30,1	0,001	0,003
6	ácido clorogénico	30,6	0,001	0,003
7	ácido <i>p</i> -cumárico	30,9	0,074	0,092
8	rutina	31,7	0,010	0,030
9	ácido ferúlico	33,4	0,001	0,003
10	narirutina	33,5	0,146	0,291
11	naringina	34,0	0,001	0,003
12	hesperidina	34,6	0,095	0,123
13	ácido <i>trans</i> -cinámico	40,8	0,036	0,043
14	naringenina	44,1	0,015	0,017
15	apigenina	44,7	0,001	0,003
16	hesperitina	45,0	0,160	0,237

RT: tiempo de retención; LOD: Límite de detección; LOQ: límite de cuantificación

La precisión del método se evalúa por el coeficiente de variación intra-día e inter-día en diferentes niveles de concentración según cada patrón (véase Tabla 26). La precisión intra-día se evalúa el mismo día en tres repeticiones (n=3). La precisión inter-día se evalúa en cinco días diferentes (n=5). Los resultados se expresan como desviación estándar relativa (DER%).

El %DER intra-día (n=3) y el %DER inter-día (n=5) es menor al 5% en la mayoría de los casos, lo que sugiere que el método EFS-C₁₈/HPLC-UV propuesto es reproducible y estable para el análisis de compuestos fenólicos extraídos por ultrasonidos de piel de mandarinas híbridas.

Tabla 26. Precisión intra-día e inter-día del método EFS-C₁₈/HPLC-UV para la determinación de compuestos fenólicos en piel de mandarinas híbridas.

N°	Analitos	RT min	Precision (% DER)	
			Intra-día (n = 3)	Inter-día (n = 5)
1	catequina	18,8	12,94	7,89
2	ácido 4-hidroxibenzoico	19,3	0,21	1,60
3	ácido cafeico	23,7	4,15	2,60
4	ácido vanílico	24,5	0,26	1,71
5	quercetina	30,1	3,11	2,45
6	ácido clorogénico	30,6	3,52	2,69
7	ácido <i>p</i> -cumárico	30,9	3,74	3,51
8	rutina	31,7	5,58	2,62
9	ácido ferúlico	33,4	1,97	2,76
10	narirutina	33,5	0,71	3,89
11	naringina	34,0	0,17	0,78
12	hesperidina	34,6	0,89	2,64
13	ácido <i>trans</i> -cinámico	40,8	2,82	4,44
14	naringenina	44,1	1,94	2,20
15	apigenina	44,7	0,99	4,08
16	hesperitina	45,0	1,42	1,14

RT: tiempo de retención; DER: desviación estándar relativa

La exactitud se evalúa con ensayos de recuperación, cuyos valores se determinan mediante una comparación de las áreas entre la muestra adicionada previamente a la purificación, con las áreas del extracto de la muestra adicionada tras la purificación, donde la muestra y el extracto se adicionan con concentraciones de 30 µg/mL y los resultados se expresan como porcentajes de recuperación (R%) (veáse Tabla 27). Después de aplicar la EFS-C₁₈ como proceso de purificación, los resultados de recuperación entre el 70 - 120% se consideran como valores satisfactorios, de acuerdo con SANTE/12682/2019. Sin embargo, algunos valores de recuperación fuera del intervalo citado, se consideran válidos debido a la variación (n=3, <20%) observada durante los ensayos, y cuyos valores de recuperación no son inferiores al 30% ni superiores al 140%. Asimismo, la técnica cromatográfica puesta a punto muestra buenos resultados para la separación de los compuestos fenólicos presentes en la piel de mandarina en extractos obtenidos por ultrasonidos, mostrando picos bien resueltos y tiempos de retención constantes. Solo el kaempferol no puede evaluarse por el método HPLC-UV propuesto, debido a su coelución con la hesperitina. La presencia de kaempferol se confirma por UPLC-qTOF-MS/MS.

El efecto matriz se determina de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$ME\% = [(A_1 - A_2) / A_0] \times 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

Dónde A₁ es el área de muestra adicionada, A₂ es el área de muestra sin adicionar y A₀ es el área del patrón. Los resultados se expresan en porcentajes de Efecto Matriz (% EM) (veáse Tabla 27).

La mayoría de los valores se encuentran en un intervalo de 80 - 120%, indicando que el efecto matriz de las muestras es mínimo, en la mayoría de los analitos y para el método descrito, de acuerdo con el protocolo previamente detallado por Casado et al. (2018).

Tabla 27. Exactitud y efecto matriz del método EFS-C₁₈/HPLC-UV para la determinación de compuestos fenólicos en piel de mandarinas híbridas.

Nº	Analitos	RT min	% R	% EM
1	catequina	18,8	10	170
2	ácido 4-hidroxibenzoico	19,3	5	113
3	ácido cafeico	23,7	7	120
4	ácido vanílico	24,5	7	111
5	quercetina	30,1	83	52
6	ácido clorogénico	30,6	15	95
7	ácido <i>p</i> -cumárico	30,9	17	117
8	rutina	31,7	56	116
9	ácido ferúlico	33,4	38	121
10	narirutina	33,5	81	104
11	naringina	34,0	59	142
12	hesperidina	34,6	102	96
13	ácido <i>trans</i> -cinámico	40,8	65	177
14	naringenina	44,1	91	132
15	apigenina	44,7	88	117
16	hesperitina	45,0	95	81

RT: tiempo de retención; R: recuperación; EM: efecto matriz

Perfil de compuestos fenólicos determinados por HPLC-UV y UPLC-qTOF-MS/MS, y análisis quimiométrico

El análisis del perfil de compuestos fenólicos por HPLC-UV en extractos de muestras de piel de mandarina híbrida obtenidos por ultrasonidos permite comprender mejor la composición fenólica en este tipo de muestras. En la Figura 36 se muestran los cromatogramas representativos cada variedad, en condiciones óptimas.

Como se puede observar, empleando el método por EFS-C₁₈/HPLC-UV, se detectan satisfactoriamente 16 compuestos fenólicos en las muestras analizadas (véase Figura 36). Tras la revisión bibliográfica, este es el mayor número de polifenoles identificados por HPLC-UV a 280 nm en piel de mandarina. Los compuestos más destacados en las variedades híbridas son la hesperidina (pico 18) y la narirutina (pico 15). De acuerdo con investigaciones previas, ambos compuestos son los principales polifenoles determinados en la piel de mandarina *C. unshiu* por HPLC-UV (Cheigh et al., 2012; Šafranko et al., 2021). Además, Nipornram et al. (2018) describen un método simple para determinar hesperidina de piel de *C. reticulata* Blanco cv. Sainampueng empleando HPLC con detector UV/VIS a una longitud de onda de detección de 280 nm. La composición fenólica de la piel de mandarinas híbridas concuerda en parte con el estudio de Ferreira et al. (2018) quienes emplean la EFS-C₁₈ como método de purificación de los extractos de piel de mandarina (*C. reticulata*) obtenidos por extracción con solventes empleando calor; sin embargo, en la mayoría de los estudios descritos sobre la composición fenólica en extractos de piel de mandarina no se realiza una etapa de limpieza (Hayat et al., 2010; Hu et al., 2017; Ko et al., 2016; Safdar et al., 2017; Xu et al., 2019), en consecuencia se determina un menor número de compuestos fenólicos.

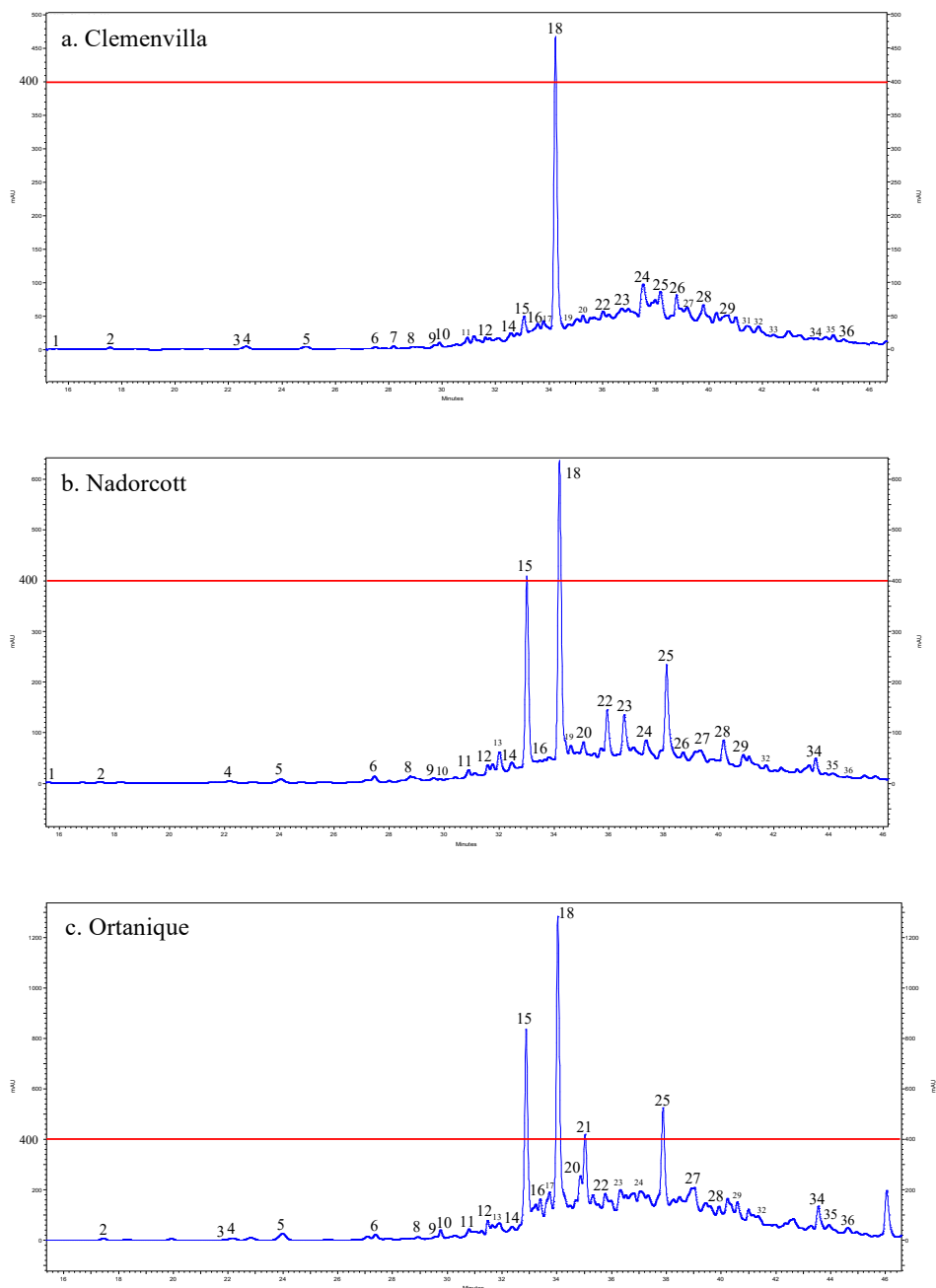


Figura 36: Cromatogramas de extractos de piel de mandarinas híbridas a 280 nm por HPLC-UV: a. Clemenvilla, b. Nadorcott, c. Ortanique. Picos: 1– catequina; 2– ácido 4-hidroxibenzoico; 3– ácido cafeico; 4– ácido vainílico; 6– quercetina; 8– ácido clorogénico ; 9– ácido p-cumárico; 12– rutina; 14– ácido ferúlico; 15– narirutina; 16– naringina; 18– hesperidina; 28– ácido transcinámico; 34– naringenina; 35– apigenina; 36– hesperitina; 5,7, 10–11, 13, 17, 19–27, 29–33 compuestos desconocidos. La línea roja delimita la zona del espectro cromatográfico comparable en los tres casos.

Se identifica un pico de narirutina de menor área en los extractos de piel de Clemenvilla, en comparación con las muestras de Nadorcott y Ortanique. Además, la mayoría de los picos desconocidos son claramente diferentes según las variedades analizadas en las mismas condiciones de detección (280 nm). Es plausible que pese a un perfil de polifenoles similar se encuentren diferentes derivados de compuestos polifenólicos en los extractos y en diversas cantidades según la variedad híbrida analizada, lo que es similar al resultado obtenido por Chen et al. (2020) en piel de diferentes variedades de mandarina híbridas. Las proporciones estimadas de los compuestos fenólicos determinados por el método de integración de áreas muestran que la hesperidina (60,1; 40,7; 39,1 %) y la narirutina (12,5; 34,8; 37,5 %) son los componentes mayoritarios en cada variedad (Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique, respectivamente). Este método permite estimar el perfil cromatográfico de compuestos fenólicos de piel de cítricos siendo una herramienta adecuada para determinar los compuestos característicos y principales en muestras cítricas.

Se utiliza el sistema UPLC-qTOF-MS/MS para la confirmación y la cuantificación de los compuestos fenólicos estimados (Tabla 28). El uso de LC-MS/MS para confirmar la presencia de polifenoles y cuantificarlos en muestras de mandarina también es aplicado por Cheigh et al. (2012), Gómez-Mejía et al. (2019), Guccione et al. (2016) y Long et al. (2019). En el presente estudio, los compuestos fenólicos se detectan en modo negativo $[M-H]^-$ (de 137,02442 a 609,18249). Gómez-Mejía et al. (2019) afirman en su estudio que los mejores resultados se obtienen utilizando $[M-H]^-$ como ion precursor en el modo de ionización negativa. En otras investigaciones se emplea un método similar para la identificación y cuantificación de polifenoles en diferentes muestras de piel de cítricos, incluyendo *C. reticulata* (Fayek et al., 2019; Luo et al., 2019).

Tabla 28. Concentraciones de compuestos fenólicos cuantificados por UPLC-qTOF-MS/MS en la piel de mandarina híbridas.

Nº	Analitos	Formula Molecular	<i>m/z</i>	[M-H] ⁻	Error (ppm)	Clemenvilla (µg/g ± DE)	Nadorcott (µg/g ± DE)	Ortanique (µg/ ± DE)
1	catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07904	289,07176	-5,6	N.D.	N.D.	N.D.
2	ácido 4-hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	138,03169	137,02442	-0,8	5,31 ± 1,84 ^a	1,35 ± 0,67 ^b	2,16 ± 1,00 ^c
3	ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	180,04226	179,03498	1,1	1,17 ± 0,26 ^a	0,43 ± 0,03 ^a	0,95 ± 0,48 ^b
4	ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	168,04226	167,03498	1,8	1,39 ± 1,08 ^a	1,17 ± 0,96 ^a	1,02 ± 0,84 ^a
5	quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,04265	301,03538	0,4	1,37 ± 0,51 ^a	1,17 ± 0,30 ^b	1,12 ± 0,31 ^b
6	ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,09508	353,08781	-0,7	0,53 ± 0,20 ^a	0,55 ± 0,18 ^a	1,03 ± 0,47 ^b
7	ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	164,04734	163,04007	1,8	1,96 ± 1,04 ^a	2,27 ± 0,83 ^a	1,29 ± 0,98 ^b
8	rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,15339	609,14611	-0,9	7,54 ± 1,49 ^a	7,03 ± 1,25 ^a	8,33 ± 0,63 ^a
9	ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,05791	193,05063	-0,2	1,45 ± 0,63 ^a	6,14 ± 1,95 ^b	2,09 ± 0,59 ^c
10	narirutina	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580,17921	579,17193	-1,2	4,40 ± 0,79 ^a	26,8 ± 7,81 ^a	29,4 ± 6,14 ^b
11	naringina	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580,17921	579,17193	-1,2	1,65 ± 0,97 ^a	1,47 ± 0,78 ^a	1,26 ± 0,62 ^a
12	hesperidina	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610,18977	609,18249	-0,9	52,7 ± 16,7 ^a	57,5 ± 18,0 ^a	52,8 ± 13,2 ^a
13	ácido <i>trans</i> -cinámico	C ₉ H ₈ O ₂	148,05243	147,04515	0,6	1,51 ± 0,93 ^a	1,75 ± 0,92 ^a	0,65 ± 0,60 ^a
14	naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,06847	271,0612	0,7	0,04 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,02 ^b	0,10 ± 0,05 ^c
15	apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,05282	269,04555	1,1	0,01 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,00 ^b	0,02 ± 0,01 ^a
16	hesperitina	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302,07904	301,07176	-0,9	1,16 ± 1,04 ^a	0,96 ± 0,46 ^a	0,81 ± 0,35 ^a
17	kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,04774	285,04046	1,4	0,19 ± 0,13 ^a	0,32 ± 0,16 ^b	0,25 ± 0,08 ^a

*Los valores están expresados en peso fresco. DE: desviación estándar; N.D.: no detectado. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

** Muestras analizadas: véase Tabla 7.

La sub-clase principal de metabolitos secundarios en las muestras de mandarina son los flavonoides (Chen et al., 2020; Fayek et al., 2019), y las concentraciones más altas se determinan en la piel, principalmente en el flavedo (Wang et al., 2017). Además, los flavonoides cítricos más abundantes son las flavanonas que están presentes en las formas de glucósido o aglicona (Sammani et al., 2019). La hesperidina ($C_{28}H_{34}O_{15}$, m/z 610,18977) y narirutina ($C_{27}H_{32}O_{14}$, m/z 580,17921) son glicósidos de flavanona cuyas agliconas corresponden a hesperitina y naringenina, respectivamente. Siendo hesperitina ($C_{16}H_{14}O_6$, m/z 302,07904) y naringenina ($C_{15}H_{12}O_5$, m/z 272,06847) las flavononas en forma de aglicona más importantes, presentes en piel de mandarina (Cheigh et al., 2012; Fu et al., 2017).

Los flavonoides son los compuestos mayoritarios en los extractos analizados (Figura 37), siendo la hesperidina ($54,3 \pm 2,71 \mu\text{g/g PF}$), seguido de la narirutina ($20,2 \pm 13,8 \mu\text{g/g PF}$) los de mayor concentración. En este estudio la hesperidina es el compuesto fenólico de mayor concentración en las variedades analizadas, principalmente en las muestras de variedad Nadorcott ($57,5 \pm 18,0 \mu\text{g/g PF}$). Una concentración ligeramente mayor de hesperidina ($84,4 \mu\text{g/g}$) extraída por ultrasonidos empleando etanol acuoso al 50% (v/v) como solvente es obtenida por Safdar et al. (2017) de piel de mandarina Kinnow. Asimismo, la mayoría de los estudios concluyen que la hesperidina es el principal compuesto fenólico en piel de mandarina (Chen et al., 2020; Ferreira et al., 2018; Hayat et al., 2010; Li et al., 2012; Safdar et al., 2017; Singanusong et al., 2015; Xu et al., 2019; Zhao et al., 2019). En el caso de la narirutina se observa una menor concentración en las muestras de piel de Clemenvilla ($4,40 \pm 0,79 \mu\text{g/g}$). La cantidad de rutina detectada en los extractos presenta un intervalo de $7,03 \pm 1,25$ a $8,33 \pm 0,63 \mu\text{g/g PF}$, siendo más baja en las muestra de piel de Nadorcott. Una concentración inferior de rutina ($1,0 \mu\text{g/g}$) es obtenida por Zhao et al. (2019) en muestras de piel de mandarinas Clementina. En relación a la naringenina, se determina un

intervalo de $0,04 \pm 0,02$ a $0,10 \pm 0,05$ $\mu\text{g/g}$ PF en las muestras analizadas. Los valores de naringina varían de $1,26 \pm 0,62$ a $1,65 \pm 0,97$ $\mu\text{g/g}$ PF. Por otro lado, Zhao et al. (2019) obtienen $0,54$ $\mu\text{g/g}$ PF de quercitina en piel de Clementina. Sin embargo, en nuestro estudio se obtienen concentraciones mayores de quercitina en la piel de mandarinas híbridas (de $1,12 \pm 0,31$ a $1,37 \pm 0,51$ $\mu\text{g/g}$ PF).

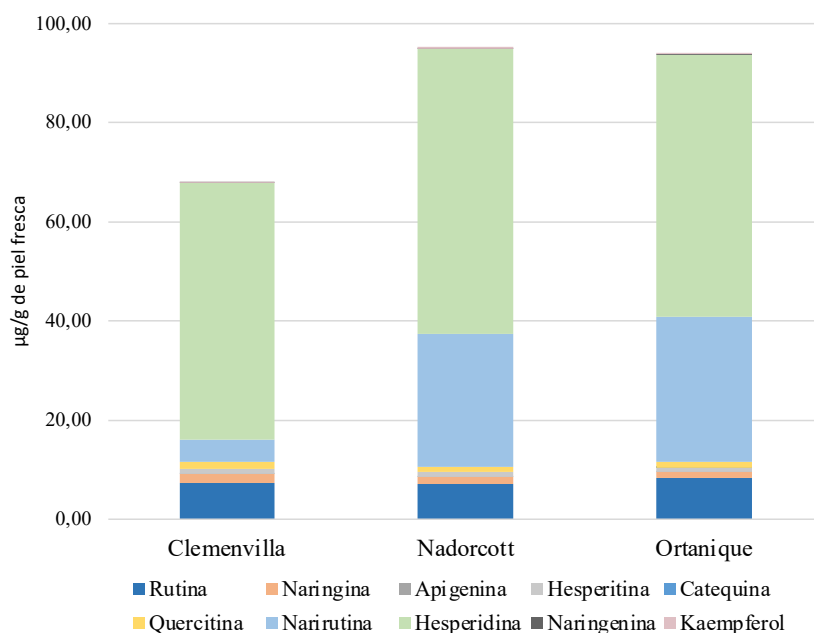


Figura 37. Distribución de la concentración de flavonoides en extractos de piel de mandarinas híbridas.

Algunas concentraciones fueron ligeramente inferiores a las descritas en otros trabajos, y esto puede explicarse debido a las variedades empleadas y a las características propias de las mandarinas o del proceso de extracción y purificación. En el caso de hesperidina, se determina un intervalo de $0,27$ a $45,6$ mg/g en diferentes muestras de piel seca de mandarina (Chen et al., 2020; Fu et al., 2017; Nipornram et al., 2018; Šafranko et al., 2021), mientras que en el presente estudio se utiliza piel fresca de mandarinas híbridas obteniendo un rango

de $52,7 \pm 16,7$ a $57,5 \pm 18,0$ $\mu\text{g/g}$ PF, cuya estimación de peso seco sería similar al rango de hesperidina referenciado en los estudios antes mencionados. Esto concuerda con (Putnik et al., 2017b), quienes mencionan que el sustrato del que se hace la extracción también influye en el contenido de compuestos extraídos. Asimismo, en la bibliografía consultada los resultados que indican una mayor concentración de flavonoides en piel de mandarina se expresan en peso seco (PS) (Chen et al., 2020; Hayat et al., 2010; Hu et al., 2017; Šafranko et al., 2021).

El ácido ferúlico es el ácido fenólico dominante en el perfil de piel de las mandarinas híbridas analizadas, siendo mayor en Nadorcott ($6,14 \pm 1,95$ $\mu\text{g/g}$ PF) (véase Figura 38). Lo mismo es observado por Safdar et al. (2017) en piel de mandarina Kinnow, que obtienen concentraciones mayores en esta variedad ($42,6$ $\mu\text{g/g}$). Por el contrario, en su investigación no se detecta ácido cafeico, mientras que en el presente estudio se cuantifica un intervalo de $0,43 \pm 0,03$ a $1,17 \pm 0,26$ $\mu\text{g/g}$ PF en piel de mandarinas híbridas. Una concentración similar de ácido cafeico ($0,43$ $\mu\text{g/g}$) se obtiene en piel fresca de mandarinas Clementina por Zhao et al. (2019). En relación al ácido clorogénico, en el presente estudio se obtiene un intervalo de $0,53 \pm 0,20$ a $1,03 \pm 0,47$ $\mu\text{g/g}$ PF en las muestras de mandarinas híbridas analizadas, mientras que Zhao et al. (2019) cuantificaron una concentración menor ($0,38$ $\mu\text{g/g}$ PF). En piel de mandarinas Clemenvillas, el ácido de mayor concentración es el ácido 4-hidroxibenzoico ($5,31 \pm 1,84$ $\mu\text{g/g}$ PF).

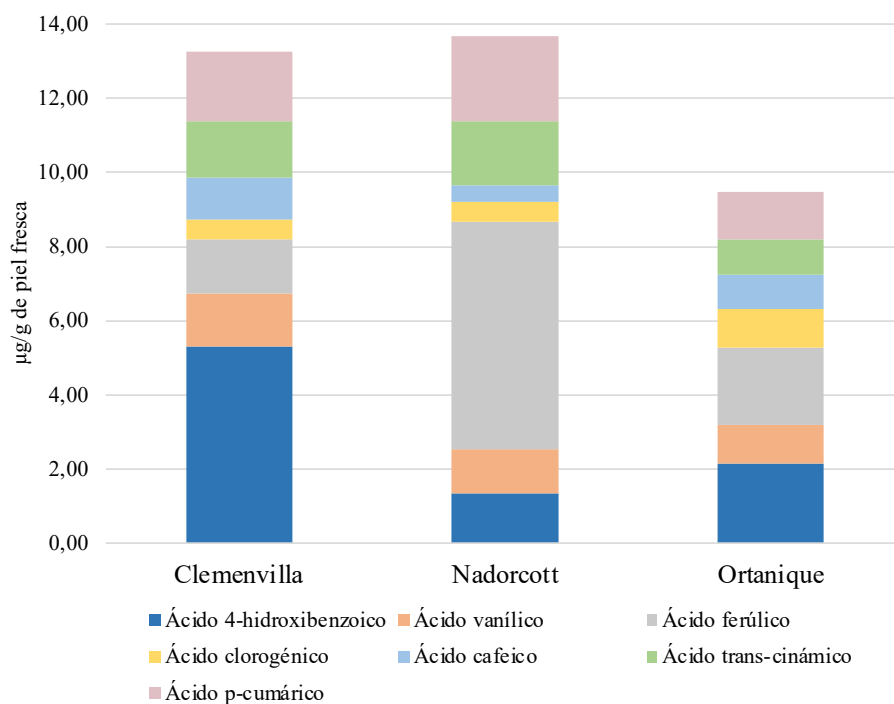
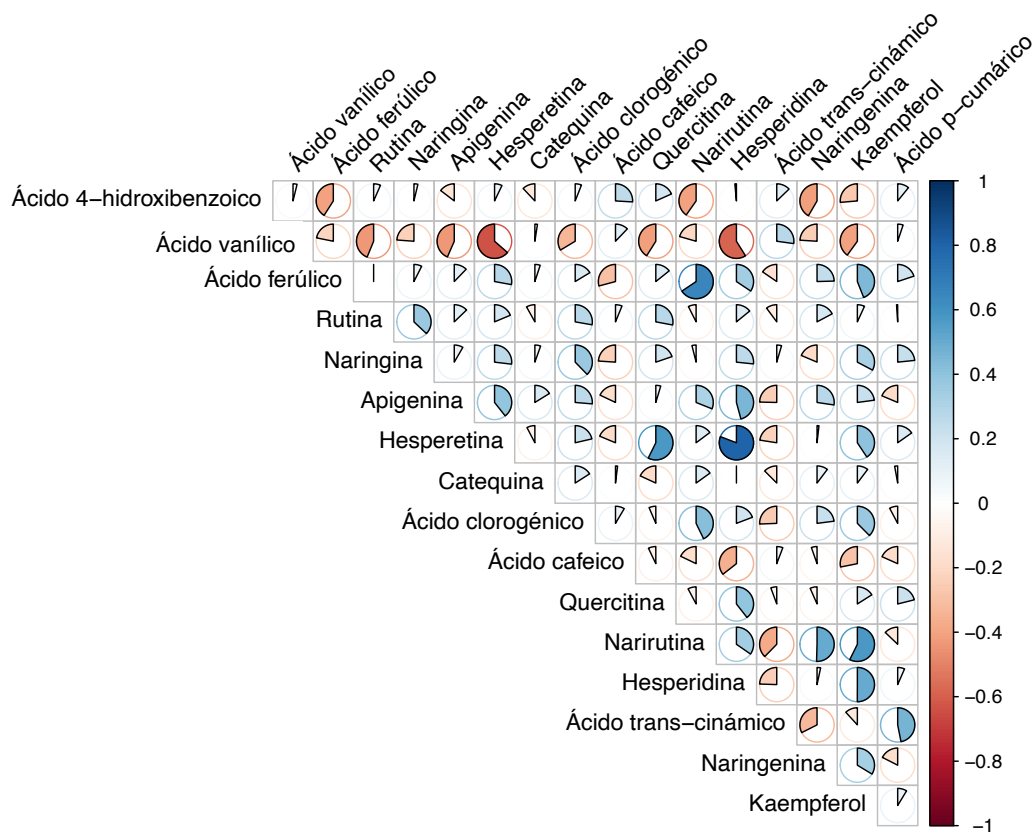


Figura 38. Distribución de la concentración de ácidos fenólicos en extractos de piel de mandarinas híbridas

La correlación entre los compuestos fenólicos determinados en las muestras de piel de mandarinas híbridas se puede ver en la Figura 39. La correlación positiva más fuerte puede observarse en el par de hesperitina y hesperidina, ya que hesperitina es la forma aglicona de hesperidina. Ambos compuestos están presentes en grandes cantidades en las muestras de Nadorcott, en comparación con Clemenvilla y Ortanique. Asimismo, se obtienen coeficientes de correlación estrechamente negativos entre el ácido vanílico con hesperitina y hesperidina, respectivamente (véase Figura 39). El histograma de correlaciones (Figura 40) refleja la distribución de las variables en grupos según los valores observados. En la parte superior se aprecian los coeficientes de correlación, en la parte central se muestra la distribución según el diagrama de Gauss, y en la parte inferior se observa la linealidad de los valores según las variables.



Los gradientes de tamaño y color de los gráficos circulares (de +1 a -1) muestran la fuerza de cada una de las correlaciones. Los pares de compuestos fenólicos sin gráficos circulares no mostraron una correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 39. Correlación estadística entre el contenido de compuestos fenólicos determinados por UPLC-qTOF-MS/MS.



Figura 40. Histograma de correlación entre los compuestos fenólicos determinados en piel de mandarinas híbridas

Se realiza un análisis de componentes principales (ACP) para determinar los compuestos más importantes que influyen en la varianza de los datos (Figura 41). El primer y segundo componente principal explican el 60,6% y el 32,3% de la varianza, respectivamente (Figura 42). Las muestras de variedad Clemenvilla se separan claramente de las muestras de Nadorcott y Ortanique, que tienen una composición similar. La principal diferencia es el menor contenido de narirutina en las muestras de Clemenvilla.

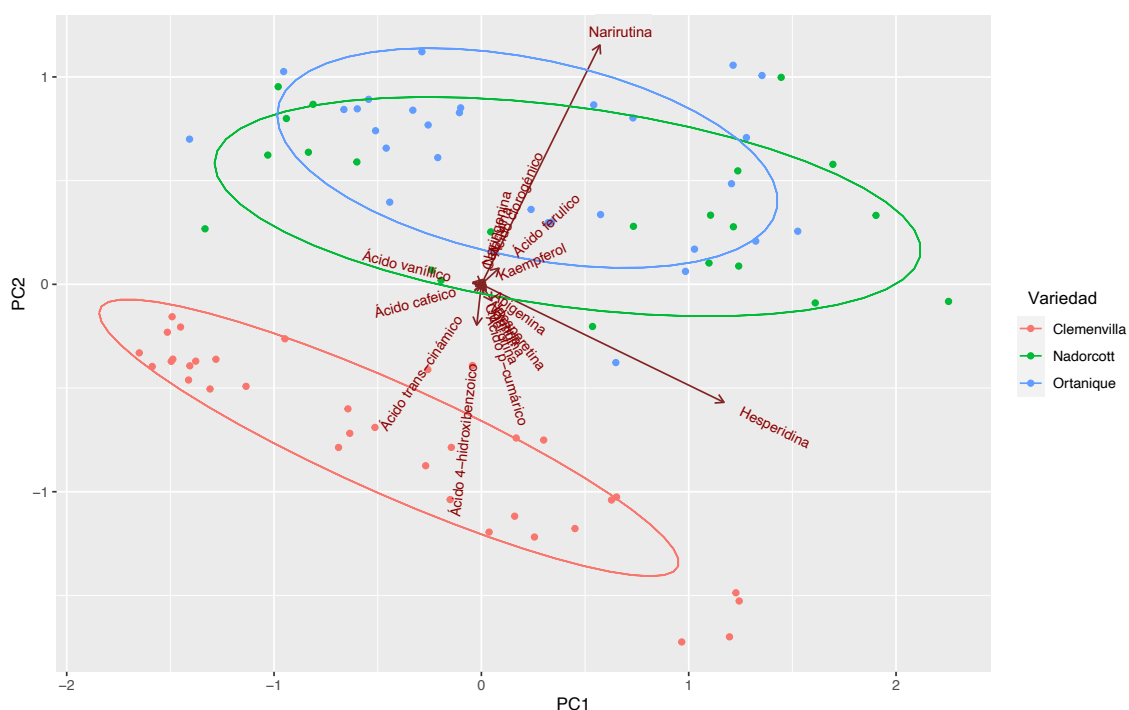


Figura 41. Gráfica del Análisis de Componentes Principales del contenido de compuestos fenólicos en mandarinas híbridas.

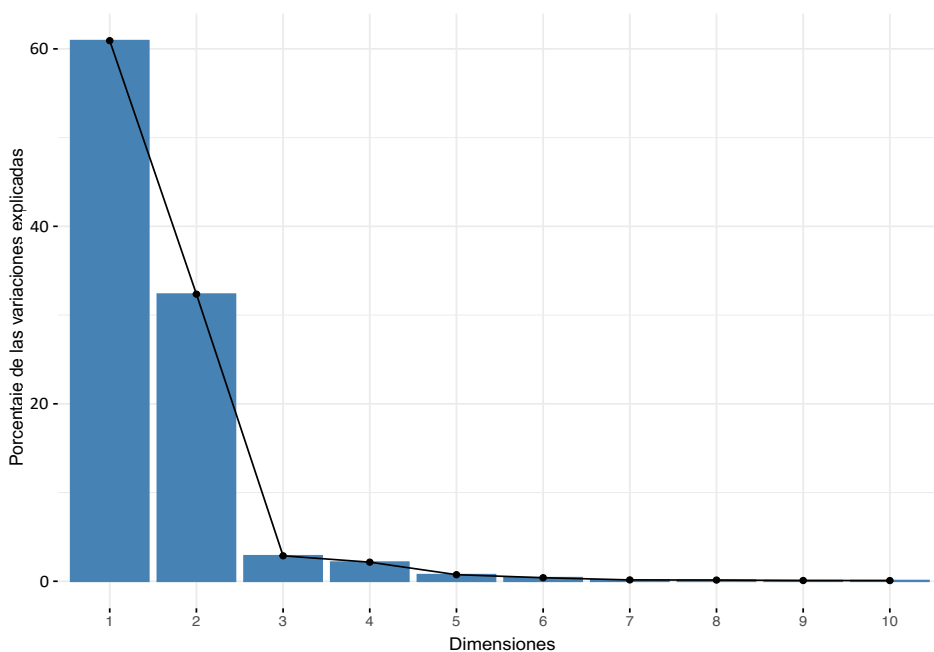


Figura 42. Contribución de los componentes principales a la variabilidad de la composición fenólica en las muestras.

La hesperidina es el principal contribuyente del PC1 (80,1%), seguido de narirutina (19,1%) (Figura 43). Por el contrario, el principal contribuyente del PC2 fue la narirutina (77,9%) seguida de la hesperidina (18,9%). Estos valores están de acuerdo con la mayor concentración obtenida para cada compuesto fenólico en las variedades estudiadas comparado con otros flavonoides y ácidos fenólicos (Tabla 28). Los resultados indican que los compuestos flavonoides son los principales metabolitos para clasificar las muestras según la variedad, lo cual es similar a los resultados observados por Feng et al. (2018) en diferentes cultivos de cítricos.

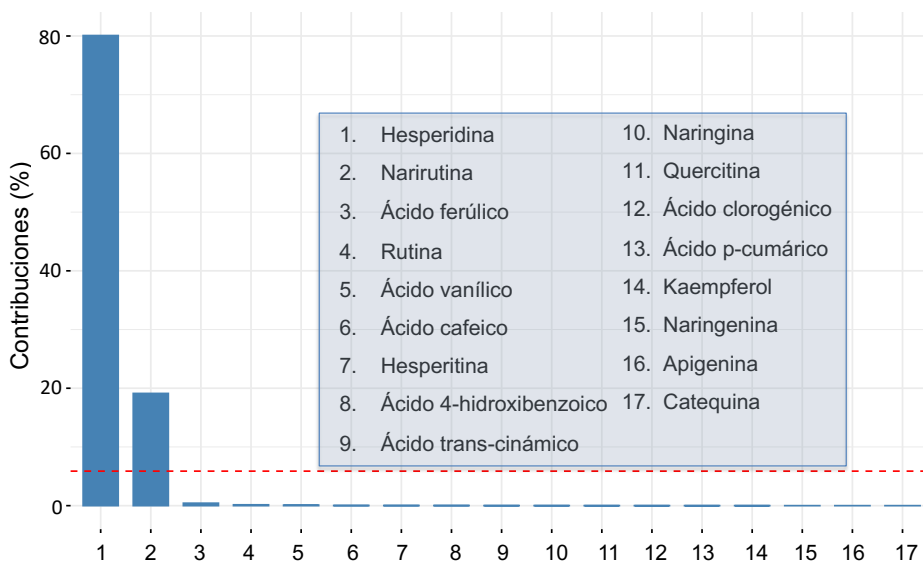


Figure 43. Contribución de los compuestos fenólicos al componente 1

4.3.3. Conclusiones

La EFS-C₁₈ puede ser empleada como método de purificación para extractos de piel de mandarinas híbridas obtenidos por ultrasonidos y cuyo perfil de compuestos fenólicos es satisfactoriamente analizado empleando HPLC-UV. Este método es validado de acuerdo con la linealidad, los valores de LOD y LOQ, la precisión intra-día e inter-día, la exactitud mediante recuperación de los estándares y el efecto matriz. De acuerdo con los resultados, el método EFS-C₁₈/HPLC-UV es una herramienta asequible para monitorear el perfil fenólico en extractos de piel de mandarina en ensayos rutinarios. La UPLC-qTOF-MS/MS se emplea para confirmar la composición de polifenoles. Hesperidina y narirutina son los compuestos más abundantes obtenidos de los extractos siendo Nadorcott ($57,45 \pm 18,03 \mu\text{g/g}$) y Ortanique ($29,41 \pm 6,14 \mu\text{g/g}$) las muestras con las mayores cantidades de hesperidina y narirutina, respectivamente. También se determina rutina en mayor concentración (de $7,03 \pm 4,25$ a $8,33 \pm 3,63 \mu\text{g/g}$) respecto al resto de compuestos fenólicos. En el contexto del análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos fenólicos de extractos de piel de mandarinas

híbridas, en este estudio se muestra que la aplicación de APC contribuye con información adicional sobre las diferencias de las muestras según la variedad. Clemenvilla tiene una composición diferente principalmente determinada por la concentración de narirutina. Este estudio contribuye a la determinación del perfil de compuestos fenólicos en variedades de mandarinas híbridas aplicando la EFS-C₁₈ como método de purificación. La información proporcionada en el presente estudio será de utilidad para futuras investigaciones sobre la composición fenólica en la piel de los cítricos.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE CAROTENOIDES EN EXTRACTOS DE PIEL DE MANDARINAS HÍBRIDAS

Para el análisis de carotenoides en piel de cítricos se recomienda la aplicación de pretratamientos en las muestras que favorezcan la extracción (Saini & Keum, 2018). La aplicación de ultrasonidos es uno de los métodos de pretratamiento de muestras con resultados favorables para la obtención de carotenos de residuos cítricos (Giuffrida et al., 2019; Ma et al., 2018; Saini et al., 2021; Sun et al., 2011). Asimismo, el procedimiento más común para la obtención de carotenoides de piel de cítricos es la extracción con solventes orgánicos, o mezclas de éstos, siendo importante para su elección, la naturaleza polar o apolar de los carotenoides (Mahato et al., 2019).

La saponificación es un proceso previo al análisis cromatográfico, que favorece la eliminación de compuestos que pueden interferir en los resultados (Giuffrida et al., 2020; Regal et al., 2020). Este paso no sólo simplifica la separación cromatográfica, también proporciona información sobre la naturaleza y distribución de los carotenoides en una matriz (Regal et al., 2020). Los sistemas cromatográficos de fase reversa son los más utilizados para la separación de carotenoides en general (Giuffrida et al., 2020), siendo los métodos de HPLC y UPLC son los más empleados para el análisis de carotenoides en piel de mandarina. Las columnas C₃₀ favorecen la separación de estructuras complejas, y una mejor interacción con los compuestos dada su mayor hidrofobicidad comparada con la columna C₁₈ (Giuffrida et al., 2020). Los sistemas de cromatografía líquida acopladas a diferentes detectores de absorbancia (UV, Vis, PDA) permiten determinar el perfil carotenoides de una muestra con resultados favorables, tanto cualitativamente como cuantitativamente (Regal et al., 2020). Asimismo, solventes como metanol, acetonitrilo y ter-butil-metil-éter (TBME) son comúnmente empleados como gradientes de elución para el análisis de

carotenoides en piel de mandarinas (Matsumoto et al., 2009; Murador et al., 2019; Saini et al., 2021; Yoo & Moon, 2016; Zhou et al., 2010).

En esta sección se estudian diferentes métodos de extracción y saponificación para el análisis de los carotenoides en la piel de tres variedades de mandarinas híbridas. El perfil de carotenoides se analiza por HPLC-UV.

4.4.1. Material y Métodos

Muestras

La selección y preparación de las muestras se describe en la sección 3.1 y 3.1.2.2.

Métodos de extracción y saponificación para el análisis de compuestos carotenoides en extractos de piel de mandarinas híbridas

La descripción de los métodos de extracción y saponificación seleccionados para la determinación de carotenoides en los extractos de piel de mandarinas híbridas se muestra en la sección 3.6.1.

Detección de carotenoides por HPLC-UV

Las condiciones seleccionadas y el método operatorio se muestran en la sección 3.6.2.

4.4.2. Resultados y discusión

Extracción y saponificación de los extractos de piel de mandarina.

Se ensayan diferentes métodos de extracción y saponificación. La selección del método adecuado se realiza en base a la identificación de patrones de carotenoides, resolución de los picos y definición del cromatograma (véase Tabla 29).

Tabla 29. Métodos de extracción (líquido-líquido) y saponificación en extractos de piel de mandarinas para la detección de carotenoides.

Pre-tratamiento	Alícuota	Extracción ^{+,++}	Saponificación ⁺⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
Baño de USN (30') (ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	2 mL extracto	+ 5 mL hexano:acetona:etanol, 50:25:25, v/v/v (sobrenadante recuperado)	-	-	-	×	×	Ma et al. (2017)
	2 mL extracto	+ 5 mL hexano:acetona:etanol, 50:25:25, v/v/v (sobrenadante recuperado)	-	β-caroteno	✓	✓	✓	
Maceración 1 + Polytron (5') + maceración 2 + centrifugar 5' (ratio 3:30; acetona)	1 mL extracto	-	-	-	-	×	✓	-
	1 mL extracto evaporado y reconstituido con 1 mL de MeOH:TBME, 20:80, v:v	-	-	-	-	✓	✓	-
	2 mL extracto evaporado y reconstituido con 2 mL etanol:agua, 50:50, v/v	+ 2 mL etanol:agua, 50:50, v/v + 1,5 mL hexano + 1,5 mL hexano (sobrenadante recuperado)	-	-	-	×	×	Wang et al. (2008)

Tabla 29. Continuación.

Pre-tratamiento	Alicuota	Extracción ^{+,++}	Saponificación ⁺⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia	
Maceración 1 + Polytron (5') + maceración 2 + centrifugar 5' (ratio 3:30; acetona)	2 mL extracto evaporado y reconstituido con 2 mL etanol:agua, 50:50, v/v	+ 2 mL etanol:agua, 50:50, v/v + 1,5 mL hexano + 1,5 mL hexano (sobrenadante evaporado y reconstituido con 1 mL de MeOH:TBME, 20:80, v/v)	-	-	×	✓	✓	Wang et al. (2008)	
		+ 2 + 1,5 + 1,5 mL hexano (sobrenadante recuperado)	-	-	×	✓	×		
		+ 2 + 1,5 + 1,5 mL hexano (sobrenadante evaporado y reconstituido con 1 mL de MeOH:TBME, 20:80, v/v)	-	-	×	✓	✓		
		+ 2 mL acetona + 1,5 mL hexano + 1,5 mL hexano (sobrenadante recuperado)	-	-	×	✓	×		
		+ 2 mL acetona + 1,5 mL hexano + 1,5 mL hexano (sobrenadante evaporado y reconstituido con 1 mL de MeOH:TBME, 20:80, v/v)	-	-	-	✓	✓		
		+ 2 + 1,5 + 1,5 mL DEE (sobrenadante recuperado)	-	-	-	✓	×		Lee et al. (2001)
		+ 2 + 1,5 + 1,5 mL DEE (sobrenadante evaporado y reconstituido en MeOH:TBME, 20:80, v/v)	-	-	-	✓	✓		

Tabla 29. Continuación.

Pre-tratamiento	Alicuota	Extracción ^{+,++}	Saponificación ⁺⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
Maceración 1 + Polytron (5') + maceración 2 + centrifugar 5' (ratio 3:30; acetona)	2 mL extracto evaporado y reconstituido con 2 mL etanol:agua, 50:50, v/v	+ 2 + 1,5 + 1,5 mL DEE (sobrenadante recuperado)	2 mL sobrenadante + 2 mL KOH/MeOH (0,5M) (agitación 30') + 4 mL DEE. Lavado: 2v. 8 mL NaCl 10% + 1v. 8 mL agua + 3v. 8 mL NaCl 10% (sobrenadante recuperado)	-	-	×	×	Cortés et al. (2004)
			2 mL sobrenadante + 2 mL KOH/MeOH (0,5M) (agitación 30') + 4 mL DEE	-	-	✓	✓	
			Lavado: 2v. 8 mL NaCl 10% + 1v. 8 mL agua + 3v. 8 mL NaCl 10% (sobrenadante evaporado y reconstituido en MeOH:TBME, 20:80, v/v)					
			2 mL sobrenadante + 2 mL KOH/MeOH (0,5M) (agitación 30') + 4 mL DEE	-	-	×	×	
			Lavado: 2v. 8 mL NaCl 10% (+ 1g NaCl en la 2v)+ 1v. 8 mL agua + 1g Na ₂ SO ₄ (sobrenadante recuperado)					

Tabla 29. Continuación.

Pre-tratamiento	Alicuota	Extracción ^{+,++}	Saponificación ⁺⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
Maceración 1 + Polytron (5') + maceración 2 + centrifugar 5' (ratio 3:30; acetona)	2 mL extracto evaporado y reconstituido con 2 mL etanol:agua, 50:50, v/v	+ 2 + 1,5 + 1,5 mL DEE (sobrenadante recuperado)	2 mL sobrenadante + 2 mL KOH/MeOH (0,5M) (agitación 30') + 4 mL DEE Lavado: 2v. 8 mL NaCl 10% (+ 1g NaCl en la 2v) + 1v. 8 mL agua + 1g Na ₂ SO ₄ (sobrenadante evaporado y reconstituido en MeOH:TBME, 20:80, v/v)	-	-	✓	✓	Cortés et al. (2004)
USN (30') (ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	2 mL	2 + 1,5 + 1,5 mL DEE (de 2 mL, se reduce a 1 mL y se inyecta)	-	-	-	×	×	
		2 + 1,5 + 1,5 mL DEE (de 2 mL, se evapora y reconstituye con 1 mL de MeOH:TBME, 20:80, v:v)	-	-	-	×	✓	
		2 + 1,5 + 1,5 mL DEE (sobrenadante recuperado)	2 mL sobrenadante + 2 mL KOH/MeOH (0,5M) (agitación 30') + 4 mL DEE Lavado: 2v. 8 mL NaCl 10% (+ 1g NaCl en la 2v)+ 1v. 8 mL agua + 1g Na ₂ SO ₄ DEE (de 2 mL, se reduce a 1 mL y se inyecta)	-	-	×	×	

Tabla 29. Continuación.

Pre-tratamiento	Alicuota	Extracción ^{+,++}	Saponificación ⁺⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
USN (30') (ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	2 mL	2 + 1,5 + 1,5 mL DEE (sobrenadante recuperado)	2 mL sobrenadante + 2 mL KOH/MeOH (0,5M) (agitación 30') + 4 mL DEE Lavado: 2v. 8 mL NaCl 10% (+ 1g NaCl en la 2v)+ 1v. 8 mL agua + 1g Na ₂ SO ₄ (sobrenadante evaporado y reconstituido en MeOH:TBME, 20:80, v/v)	-	-	✓	✓	Cortés et al. (2004)
	5 mL	2 + 1,5 + 1,5 mL DEE (de 2 mL, se evapora y reconstituye con 1 mL de MeOH:TBME, 20:80, v:v)	-	-	-	×	×	
		2 + 1,5 + 1,5 mL DEE (sobrenadante recuperado)	2 mL sobrenadante (DEE) + 2 mL KOH/MeOH (0,5M) (agitación 30') + 4 mL DEE Lavado: 2v. 8 mL NaCl 10% (+ 1g NaCl en la 2v) + 1v. 8 mL agua + 1g Na ₂ SO ₄ (sobrenadante evaporado y reconstituido en MeOH:TBME, 20:80, v/v)	-	-	✓	✓	

Tabla 29. Continuación.

Pre-tratamiento	Alicuota	Extracción ^{+,++}	Saponificación ⁺⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
Polytron (5')	2 mL	+ 5 mL hexano:acetano:etanol, 50:25:25, v:v:v (de 2 mL, se evapora y reconstituye con 1 mL de MeOH:TBME, 20:80, v:v)	-	-	-	×	×	Cortés et al. (2004)
		+ 5 mL hexano:acetano:etanol, 50:25:25, v:v:v	2 mL sobrenadante + 2 mL KOH/MeOH (0,5M) (agitación 30') + 4 mL DEE	-	-	✓	✓	
			Lavado: 2v. 8 mL NaCl 10% (+ 1g NaCl en la 2v)+ 1v. 8 mL agua + 1g Na ₂ SO ₄ (sobrenadante evaporado y reconstituido en MeOH:TBME, 20:80, v/v)					
		+ 2,5 mL + 2,5 mL hexano:acetano:etanol, 50:25:25, v:v:v (de 2 mL, se evapora y reconstituye con 1 mL de MeOH:TBME, 20:80, v:v)	-	-	-	×	×	

Tabla 29. Continuación.

Pre-tratamiento	Alicuota	Extracción ^{+,++}	Saponificación ⁺⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
Polytron (5') (ratio 3:30, agua)	2 mL	+ 2,5 mL + 2,5 mL hexano:acetano:etanol, 50:25:25, v:v:v	2 mL sobrenadante + 2 mL KOH/MeOH (0,5M) (agitación 30') + 4 mL DEE Lavado: 2v. 8 mL NaCl 10% (+ 1g NaCl en la 2v)+ 1v. 8 mL agua + 1g Na ₂ SO ₄ (sobrenadante evaporado y reconstituido en MeOH:TBME, 20:80, v/v)	-	-	✓	✓	Cortés et al. (2004)
		+ 2 + 1,5 + 1,5 mL hexano:acetano:etanol, 50:25:25, v:v:v (de 2 mL, se evapora y reconstituye con 1 mL de MeOH:TBME, 20:80, v:v)	No	-	-	×	×	
		+ 2 + 1,5 + 1,5 mL hexano:acetano:etanol, 50:25:25, v:v:v	2 mL sobrenadante + 2 mL KOH/MeOH (0,5M) (agitación 30') + 4 mL DEE Lavado: 2v. 8 mL NaCl 10% (+ 1g NaCl en la 2v)+ 1v. 8 mL agua + 1g Na ₂ SO ₄ (sobrenadante evaporado y reconstituido en MeOH:TBME, 20:80, v/v)	-	-	✓	✓	

Tabla 29. Continuación.

Pre-tratamiento	Alicuota	Extracción ^{+,++}	Saponificación ⁺⁺	Patrón	Identificación de patrón	Resolución de pico	Definición de cromatograma	Referencia
USN (30') (ratio 6:60; etanol:agua, 50:50, v/v)	2 mL	2 + 1,5 + 1,5 mL DEE	2 mL sobrenadante + 2 mL KOH/MeOH (0,5M) (agitación 30') + 4 mL DEE Lavado: 2v. 8 mL NaCl 10% (+ 1g NaCl en la 2v)+ 1v. 8 mL agua + 1g Na ₂ SO ₄ (sobrenadante evaporado y reconstituido en MeOH:TBME, 20:80, v/v)	-	-	✓	✗	Cortés et al. (2004)
	2 mL	1 + 1 + 0,5 mL DEE	2 mL sobrenadante + 2 mL KOH/MeOH (0,5M) (agitación 30') + 4 mL DEE	-	-	✗	✓	
	5 mL	3 + 0,5 + 0,5 mL DEE	Lavado: 2v. 8 mL NaCl 10% (+ 1g NaCl en la 2v)+ 1v. 8 mL agua + 1g Na ₂ SO ₄ (sobrenadante evaporado y reconstituido en MeOH:TBME, 20:80, v/v)	-	-	✓	✓	
	5 mL extracto ⁺⁺⁺	3 + 0,5 + 0,5 mL DEE	2v. 8 mL NaCl 10% (+ 1g NaCl en la 2v)+ 1v. 8 mL agua + 1g Na ₂ SO ₄ (sobrenadante evaporado y reconstituido en MeOH:TBME, 20:80, v/v)	β-caroteno luteína β-criptoxantina zeaxantina licopeno	✓	✓	✓	

USN: ultrasonidos; MeOH: metanol; DEE: dietil-éter; TBME: terc-butyl-metil-éter.

⁺ cada extracción se mezcla en vórtex 1', se centrifuga 5' y se separan los sobrenadantes

⁺⁺ en todos los casos los sobrenadantes finales se evaporan con N₂

⁺⁺⁺ Se realiza el mismo ensayo utilizando el solvente de extracción en lugar del extracto

✓ : se observa; ✗ : no se observa; - : no corresponde

La extracción de carotenoides empleando la mezcla de hexano, acetona y metanol en proporciones de 50:25:25 (v/v/v), ha sido utilizado en muestras de piel de mandarinas (Barman et al., 2020; Ma et al., 2017; Wang et al., 2008). Sin embargo, durante la puesta a punto del método para la caracterización de carotenoides se obtiene una mejor respuesta empleando dietil-éter como solvente de extracción. Éste solvente no presenta una red de enlaces de hidrógeno que debe romperse para disolver el soluto. La característica dipolar de este solvente, favorece la disolución de sustancias más polares porque pueden formar enlaces de hidrógeno con los pares de electrones no enlazantes de los átomos de oxígeno del éter (Ouellette & Rawn, 2015).

En cuanto al proceso de saponificación, Giuffrida et al. (2020) señalan que la tendencia reciente es analizar extractos de carotenoides sin saponificación previa con el fin de obtener el perfil original de carotenoides en una muestra. Sin embargo, durante los ensayos realizados se obtienen perfiles con picos mejor resueltos en muestras saponificadas. Al respecto, Ma et al. (2017) obtienen una mayor concentración de β -criptoxantina libre con picos mejor resueltos en extractos saponificados de piel de mandarinas Satsuma, en comparación de las muestras no saponificadas.

Perfil de carotenoides determinados por HPLC-UV

La elección del método cromatográfico por HPLC-UV para la separación y determinación de carotenoides en piel de mandarinas híbridas se realiza teniendo en cuenta las características de la muestra y los antecedentes observados en la bibliografía (véase Tabla 6). En la figura 44 se observa el cromatograma de los patrones de carotenoides (luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno y licopeno) empleados en el estudio a una concentración de 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

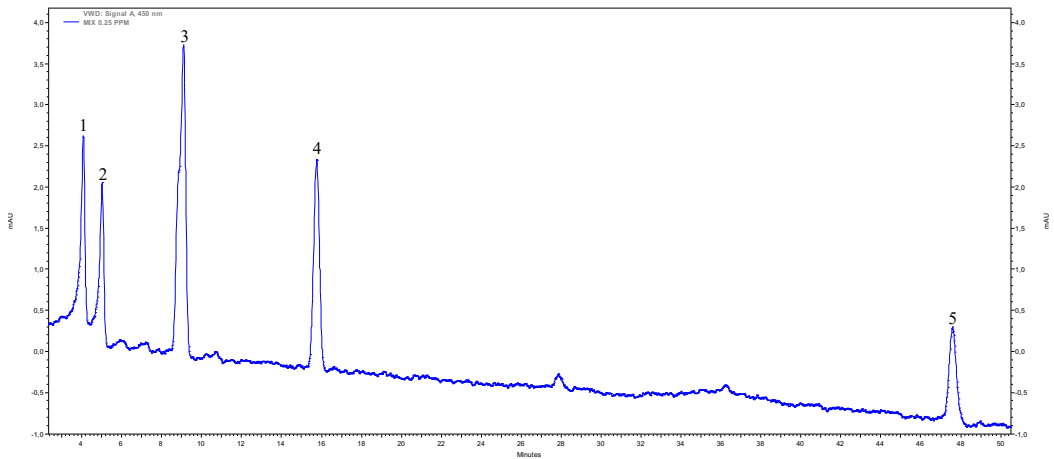


Figura 44: Cromatograma de patrones de carotenoides a 450 nm por HPLC-UV: 1– luteína; 2– zeaxantina; 3– β-criptoxantina; 4– β-caroteno; 5– licopeno.

Los carotenoides se identifican en base a los mismos tiempos de retención y las mismas características espectrales de los picos de los estándares de trabajo. El perfil de carotenoides por HPLC-UV en extractos de piel de mandarinas híbridas obtenidos por extracción asistida por ultrasonidos permite observar que en las muestras analizadas existe un mayor contenido de β-criptoxantina y β-caroteno (Figura 45, picos 3 y 6 respectivamente). Asimismo, no se observa un pico resuelto de luteína en Clemenvilla y Nadorcott. Resultados similares se obtienen en estudios anteriores con piel de mandarinas (Agócs et al., 2007; Matsumoto et al., 2007; Wang et al., 2008). Sin embargo Yoo & Moon (2016) mencionan que la β-criptoxantina, seguida de astaxantina y zeaxantina son los carotenoides mayoritarios en piel de *C. unshiu* Marcow, asimismo observan un espectro de licopeno mayor a β-caroteno. Por su parte Zhou et al. (2010) determinan que los picos de luteína, seguido de violaxantina y β-criptoxantina, determinadas a una longitud de onda de 450 nm, son mayores en muestras de piel de *C. reticulata* Blanco cv. Ponkan.

Al comparar los espectros cromatográficos de las mandarinas híbridas se observa un mayor pico de β -caroteno en la variedad Nadorcott, mientras que el pico de luteína es mayor en la variedad Ortanique. A pesar de la identificación de los patrones en los espectros, los perfiles son diferentes en las tres variedades estudiadas.

El orden de elución refleja la polaridad decreciente de los carotenoides analizados en cromatografía de fase reversa (Giuffrida et al., 2020; Regal et al., 2020). En muestras de piel de mandarina el orden de elución de los carotenoides determinados es similar al obtenido por Agócs et al. (2007) y Zhou et al. (2010). Por su parte Yoo & Moon (2016) observan que el pico de licopeno es mayor y tiene un tiempo de retención anterior al β -caroteno en piel de mandarinas *C. unshiu* Marcow, empleando una fase móvil de acetonitrilo:metanol (95:5, v/v) y columna C_{18} , por HPLC-UV (450 nm).

Se han realizado diferentes ensayos para confirmar y cuantificar los carotenoides por UPLC-qTOF-MS/MS, no obteniendo resultados satisfactorios.

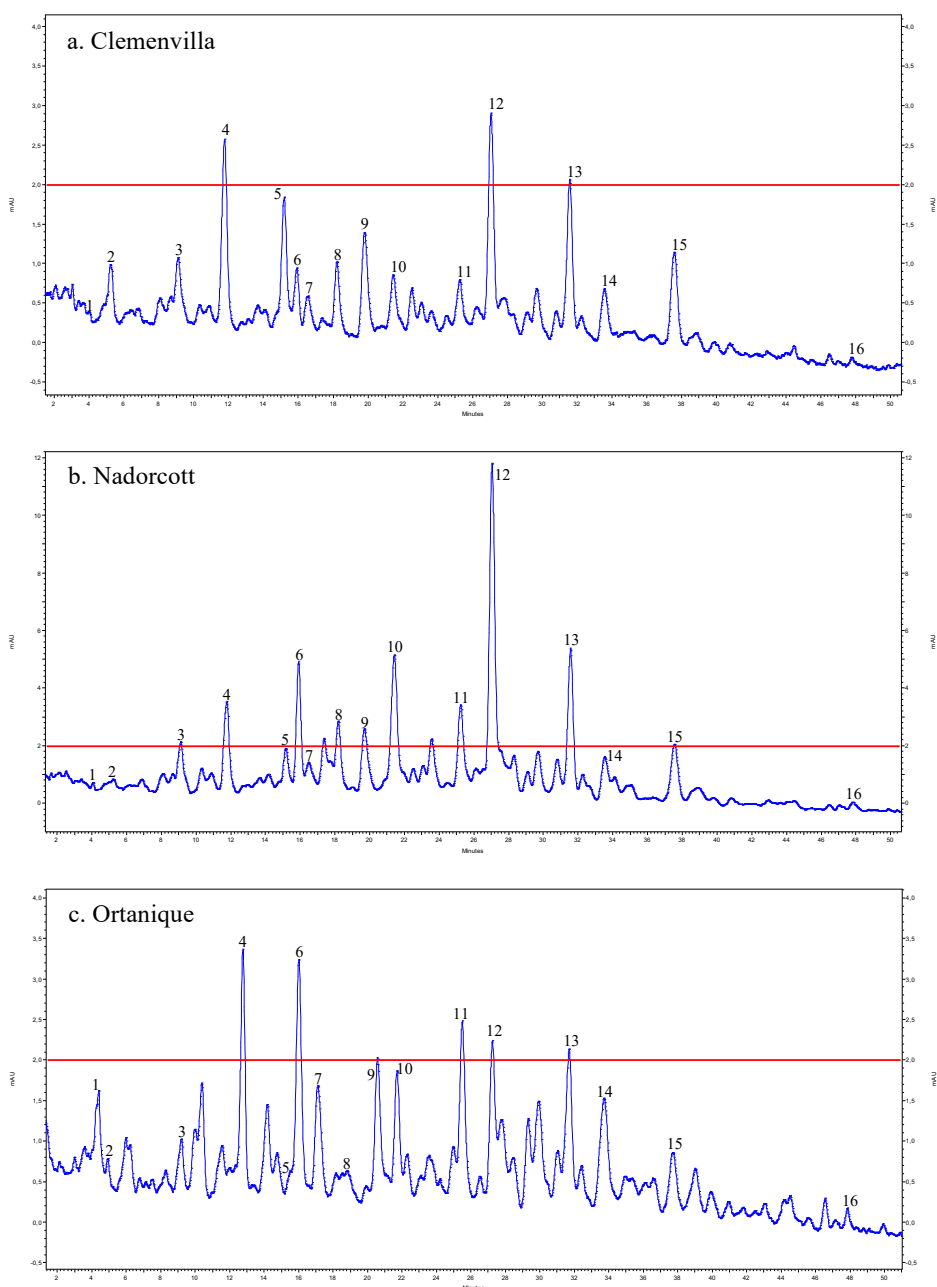


Figura 45: Cromatograma de extractos de piel de mandarinas híbridas a 450 nm por HPLC-UV: a. Clemenvilla, b. Nadorcott, c. Ortanique. Picos: 1– luteína; 2– zeaxantina; 3– β -criptoxantina; 6– β -caroteno; 16– licopeno; 4, 5, 7–16 compuestos desconocidos. La línea roja delimita la zona del espectro cromatográfico comparable en los tres casos.

4.4.3. Conclusiones

Durante la puesta a punto de los métodos para la determinación de carotenoides en extractos de piel de mandarina, se observa que los procedimientos de extracción y saponificación son importantes. La extracción con DEE permite una mayor recuperación en comparación con otros solventes. Asimismo, el proceso de saponificación favorece la obtención de un perfil de carotenoides más definido en muestras de piel de mandarinas, por HPLC-UV.

Los perfiles cromatográficos obtenidos permiten observar que, de los carotenoides estudiados, los de mayor concentración en las muestras de piel de mandarina son β -criptoxantina y β -caroteno. La información recogida durante este estudio favorecerá el análisis de carotenoides en piel de cítricos como mandarinas, por cromatografía y su posterior cuantificación.

DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de las características físico-químicas del zumo de mandarinas híbridas incluye una serie de parámetros (pH, °Brix, conductividad, color) que están relacionados con su calidad y que determinan la estabilidad de los compuestos bioactivos. En el presente estudio se analizan zumos de tres variedades de mandarinas híbridas (Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique) determinando sus características físico-químicas, contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. Los resultados obtenidos concuerdan con los observados por diferentes autores en zumos de mandarina de distintas variedades. Se realiza una revisión bibliográfica de estudios de los últimos 10 años en los que se analizan zumos de cítricos. Al respecto, Lee et al. (2019), Legua et al. (2013), Navarro et al. (2014), Petzold et al. (2019), Velázquez-Estrada et al. (2019) y Wang et al. (2019) observan valores de pH (3 - 4) y °Brix (10 - 12) en zumos frescos de naranja e híbridos de naranja, similares a lo obtenido en zumos de mandarinas híbridas analizadas. Sin embargo, al compararse con zumos de otras especies de cítricos se observan ciertas diferencias. Así, Marzuki et al. (2018) observan un valor < 10 °Brix en zumo fresco de pomelo. Singh & Das (2021) determinan 9,30 °Brix en zumo fresco de lima dulce de origen Indio. Lai et al. (2021) obtienen 7,33 °Brix y pH 2,33 en zumo fresco de Shiikuwasha, una mandarina de Taiwán también conocida como limón plano (*C. depressa* Hayata). Valores de pH entre 2,68 - 2,84 se observan en diferentes variedades de Bergamota (*C. x Aurantium Bergamia*) y limón (*C. x Meyer*) analizadas en el estudio de Sicari et al. (2016). Ahmed et al. (2019) determinan valores de pH entre 3,38 - 3,74, y valores de °Brix entre 10,34 - 12,41 en zumos de diferentes variedades de pomelo (*C. paradisi*). Mientras que Gupta et al. (2020) obtienen un pH de 4,19 y 10,20 °Brix en zumo de pomelo (*C. grandis*). Por su parte, en un estudio realizado por Waley et al. (2020) en zumos mezcla de frutas (granada, fresa, manzana, cereza, mora)-naranja se observan

valores de pH entre 3,32 y 4,81 mientras que el contenido de sólidos solubles es mucho mayor (°Brix 14,80 - 18,50).

Al revisar el contenido de AA en zumos de cítricos, se obtiene que Randhawa et al. (2014) observan la mayor concentración de AA en zumos de mandarinas Kinnow (51,43 mg/mL) seguido del zumo de toronja (46,39 mg/100mL). Por su parte Gupta et al. (2020) obtienen 66 mg/mL de AA en zumo de pomelo (*C. grandis*). Petzold et al. (2019) obtienen una alta concentración de Vitamina C en zumo de naranja (74 mg/100mL). Villa-Ruano et al. (2019) encuentran que tras comparar las concentraciones de AA en zumos de diferentes cítricos, la mayor concentración se obtiene en zumo de naranja, seguido de limón.

Asimismo, en el presente estudio se realiza un análisis de correlación entre los parámetros fisico-químicos y el contenido de compuestos bioactivos. El pH se relaciona con la concentración de AA de forma significativa, de modo que, los pH ácidos ayudan a estabilizar las concentraciones del AA como se observa en los zumos de Nadorcott y Ortanique. Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Lee et al. (2019) en zumo de naranja. Asimismo en el estudio de Legua et al. (2013) se observa que la muestra con menor valor de pH (3,69) presenta mayor porcentaje de AA (0,08%).

No se encuentran correlaciones entre las concentraciones de CFT y FT con la conductividad y los valores de pH, sin embargo, se observa una correlación entre el contenido de estos compuestos bioactivos y los valores de °Brix. Asimismo, los FT en zumos de mandarinas híbridas corresponden aproximadamente entre el 6% y 18% del contenido de CFT, siendo mayor en zumos de Nadorcott. Lee et al. (2019) obtienen que el contenido de FT corresponde entre 7% - 8% de los CFT en zumos de naranja comerciales.

Mientras que, Wang et al. (2019) determinan un contenido de FT que corresponde entre el 19% - 27% de la concentración de CFT en zumos de híbridos de naranja. Por su parte, Sicari et al. (2016) realizan un estudio donde comparan el contenido de compuestos bioactivos en diferentes variedades de cítricos, siendo el zumo de pomelo rosa (*C. paradisi*) el de mayor concentración de CFT, mientras que en el zumo de naranja amargo (*C. myrtifolia*) presenta el mayor contenido de FT. Entre las variedades estudiadas, el contenido de FT corresponde aproximadamente entre el 6% - 21% respecto a lo determinado en CFT. Álvarez et al. (2014) también observan una mayor concentración de CFT en zumo de pomelo, comparado con zumos de lima, mandarina y naranja. Gupta et al. (2020) obtienen un contenido de FT que corresponde al 67% de la concentración de CFT en zumo de pomelo (*C. grandis*).

En un estudio realizado por Rauf et al. (2014) se observa que la capacidad antioxidante del zumo de naranja (*C. sinensis*) es mayor que en el zumo de lima (*C. aurantifolia*) y de limón (*C. limonum*). Por su parte, Sicari et al. (2016) observan que los valores de capacidad antioxidante son mayores en zumos de cítricos (mandarina, limón y naranja) con alto contenido de ácido ascórbico. Asimismo, Ahmed et al. (2019) mencionan que en zumos de pomelo (*C. paradisi*), las diferencias en la capacidad antioxidante se relacionan con la concentración de AA. Por su parte, Gupta et al. (2020) indican que la pérdida de capacidad antioxidante en zumos de pomelo (*C. grandis*) se relaciona con la disminución de AA y CFT.

La realización de una revisión bibliográfica para evaluar la situación actual de la aplicación de ultrasonidos como método de extracción de compuestos bioactivos, permite comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con los de otros trabajos relacionados. Sin embargo, los

estudios con muestras similares a las analizadas en el presente trabajo son limitados, por ello se amplía la revisión bibliográfica considerando diferentes matrices como residuos de frutas y vegetales, así como vino y zumos de fruta.

En el presente estudio se aplica un tratamiento por ultrasonidos, con tres tiempos de extracción (5, 15, 30 min), en piel fresca de mandarinas híbridas para determinar el efecto en las características físico-químicas, el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante. Las condiciones utilizadas son 20 kHz, amplitud 80%, 400 W, 35 - 40°.

Después del tratamiento con ultrasonidos los valores del incremento de conductividad aumentan significativamente en más del 90% durante los tres tiempos de extracción (5, 15 y 30 min) y este incremento es progresivo de 5 a 30 min. Por su parte, Zhang et al. (2016) observan un incremento de conductividad en muestras de vino según aumenta la intensidad ultrasónica de 120 a 300 W, sin embargo, en relación al tiempo de tratamiento, los valores de conductividad tienen un incremento acelerado a los 20 min, seguido de una estabilización durante los 40, 60 y 100 min de tratamiento. Al respecto, Montero-Calderon et al. (2019) mencionan que el mayor valor de conductividad en extractos de piel de naranja se obtiene con el tratamiento a 400W durante 30 min.

En nuestro estudio, los °Brix disminuyen a los 15 y 30 min de tratamiento. No se observan cambios significativos en los valores de pH durante los tiempos de extracción. Sin embargo, Montero-Calderon et al. (2019) observan un incremento en los valores de °Brix según aumenta la intensidad ultrasónica y el tiempo de tratamiento, no observando cambios significativos en el pH tras la aplicación de los tratamientos. A su vez, Wang et al. (2018) indican un aumento en los °Brix de extractos de piel de manzana roja, según

incrementa la intensidad ultrasónica de 0 a 26,8 kJ/kg, y este aumento es acelerado durante los primeros 5 min de tratamiento.

En lo que se refiere al contenido de CFT, en el presente estudio se observa un incremento significativo en el contenido de compuestos fenólicos (>30%) a medida que aumenta el tiempo de extracción de 5 a 30 min. Khan et al. (2010) observan que el contenido de estos compuestos obtenidos por ultrasonidos (150 W, 40°C) de extractos de piel de naranja, aumenta en más del 70% en los primeros 10 a 30 min de tratamiento. Garcia-Castello et al. (2015) determinan que el tiempo de extracción tiene un efecto positivo en la obtención de compuestos fenólicos siendo mayor al 80% con la aplicación de ultrasonidos durante 3 min (100 W, 48°C). Mientras que Casazza et al. (2010) mencionan que los tiempos de extracción prolongados (más de 30 min) aumentan la cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos de residuos de uva. Galván et al. (2014) observan un incremento del 50% en la extracción de CFT de residuos de aronia negra (bayas) según aumenta el tiempo de extracción con ultrasonidos (100 W, 20°C) de 0 a 50 min. Por su parte Nishad et al. (2019) determinan un mayor rendimiento de CFT en extractos de piel de naranja con el aumento de la amplitud y el tiempo de extracción durante aplicación de ultrasonidos (20 kHz). Plazzotta et al. (2020) tras aplicar ultrasonidos también observan una mayor extracción de CFT de residuos de melocotón según aumenta la potencia (de 80 a 400 W) y el tiempo de extracción (de 20 a 120 s). Borrás-Enríquez et al. (2021) evidencian un incremento en el CFT de piel de mango tras el aumento del ratio del solvente (de 0 a 100% de etanol) y el tiempo de extracción con ultrasonidos de 10 a 30 min. Selvakumar et al. (2021) determinan una mayor extracción de polifenoles de piel de granada durante los primeros 40 min de extracción con ultrasonidos (0,4 - 1,6 W; 50°C). Por el contrario, Aires et al.

(2017) observan que la extracción con ultrasonidos (40 kHz, 20 min) no influye en la concentración de compuestos fenólicos extraídos de diferentes residuos vegetales (brócoli, judías verdes y tomate), así como Guandalini et al. (2019) quienes también refieren que el tratamiento con ultrasonidos no afecta a la extracción de polifenoles de piel de mango. Por su parte, Ninčević Grassino et al. (2020) observan que el aumento del tiempo de extracción de 5 a 15 min con ultrasonidos (380 W; 20,8 – 59,7 °C) no influye significativamente en el incremento del CFT de extractos de piel de tomate.

Asimismo, en nuestro estudio se observa un incremento significativo en el contenido de flavonoides (entre 35 y 60%) según el tiempo de extracción con ultrasonidos (de 5 a 30 min). Paini et al. (2016) mencionan que la extracción con ultrasonidos es un método eficiente para obtención de FT de residuos de uva, influenciado principalmente por el ratio del solvente. Nishad et al. (2019) observan un incremento en la concentración de FT de extractos de piel de naranja tras el aumento del tiempo y la potencia durante la extracción con ultrasonidos, obteniendo el mayor rendimiento a los 35 min con 425,3 W de potencia de los ultrasonidos. Li et al. (2019) también determinan la mayor concentración de FT de extractos de hojas de guava con el uso de ultrasonidos (407,4 W; 72,69 °C) durante 35 min. Silva et al. (2020) observan que tras emplear ultrasonidos existe un incremento en la extracción FT de residuos de acerola, influenciado de forma positiva por la temperatura de extracción y el ratio muestra/solvente, mientras que el tiempo no tiene efecto significativo. Ninčević et al. (2020) observan un incremento del contenido de FT de extractos de piel de tomate a medida que aumenta el tiempo de extracción con ultrasonidos de 5 a 15 min, sin embargo, indican que no es significativo. Plazzotta et al. (2020) obtienen un mayor contenido de FT en residuos de melocotón tras aumentar la amplitud de 20 a 100%

durante la extracción asistida por ultrasonidos, siendo hasta 6 veces mayor respecto a la extracción control con un método convencional. Mientras que Borrás-Enríquez et al. (2021) determinan un incremento en el contenido de FT de piel de mango con el aumento del ratio del solvente (etanol de 0 a 100%) y el tiempo de extracción con ultrasonidos, sin embargo la influencia de este parámetro no es significativa. Por su parte Sengkhampan & Phonkerd (2019) observan una mejora en el contenido de flavonoides de piel tomate, influenciada por la temperatura durante la extracción con ultrasonidos. Velisdeh et al. (2021) observan que la temperatura de los ultrasonidos (30 - 80 °C) es un factor influyente para la recuperación de FT de extractos de piel de cebolla roja.

En lo que respecta al AA, en el presente estudio se obtiene un ligero incremento (entre 16 y 23%) según aumenta el tiempo de extracción de 5 a 30 min. Martins et al. (2019) no observan influencia de la aplicación de ultrasonidos (50 W) en extractos de piel de manzana, mientras que Plazzotta et al. (2020) determinan una baja eficacia de los ultrasonidos sobre el contenido de AA extraído de piel de melocotón. Estudios previos realizados en zumos de fruta muestran que la aplicación de ultrasonidos favorece el contenido de AA en zumos de manzana (Abid et al., 2013, 2014), uva (Aadil et al., 2013; Margean et al., 2020), mango y papaya (Carbonell-Capella et al., 2016), cereza (Yildiz & Feng, 2019), fresas (Wang et al., 2019) y melocotón (Yildiz, 2019). Mientras que en zumos de naranja (Silva et al., 2020; Valdramidis et al., 2010), kiwi (Wang et al., 2019) y sandía (Yıkmış, 2020) se observa una disminución de AA después del tratamiento con ultrasonidos. Por su parte, Gómez-López et al. (2017) no observan cambios tras su aplicación en zumo de fruta de la pasión.

En el presente estudio el contenido CT (entre 46 y 55%) se incrementa a medida que aumenta el tiempo de extracción de 5 a 30 min. Por su parte, Rubashvili et al. (2018) observan que el tiempo de extracción y la potencia del ultrasonido (37 - 80 kHz, 15 °C) son los principales parámetros que influyen en el contenido de licopeno y β -caroteno de extractos de piel de mandarina, naranja y tomate, indicando el mayor rendimiento de extracción dentro de los primeros 5 a 10 min. Asimismo, Luengo et al. (2014) obtienen mayor retención de CT (47 - 55%) de residuos de tomate con la aplicación de ultrasonidos durante 6 min. Benmeziane et al. (2018) también observan el mayor rendimiento de CT tras la extracción con ultrasonidos (20 kHz) durante los primeros 10 min en residuos de melón. Ordoñez-Santos et al. (2019) determinan la mayor extracción de CT (33,6%) de piel de fruta de palma con el empleo ultrasonidos durante 28 min a 28 °C. En un estudio previo realizado con residuos de tomate se observa que el mayor rendimiento de licopeno (98%) se obtiene tras el empleo de ultrasonidos (90 W) durante 30 min de extracción (Kumcuoglu et al., 2014). Goula et al. (2017) determinan la mayor extracción de CT de piel de granada, con el uso de ultrasonidos (20 kHz, amplitud 58,8%, 51.5 °C) durante 30 min de tratamiento. Por su parte Sengkhampan & Phonkerd (2019) obtienen el mayor rendimiento de carotenoides totales de piel de tomate tras la extracción con ultrasonidos durante 50 min a 50 °C. Da Silva Lima et al. (2020) observan una mayor extracción de CT de piel de guava tras emplear ultrasonidos (40 kHz, 300 W, 30 min, 25 °C). Chuyen et al. (2020) evidencian un incremento (2,7 %) en la extracción de CT de piel de calabaza dulce (*gac*, fruta asiática) tras la extracción con ultrasonidos durante 76 min a 50 °C y baja potencia de extracción (250 W), comparado con un método convencional. Sharma & Bhat (2021) observan que la temperatura favorece

el rendimiento de carotenoides obtenido de piel de calabaza durante la extracción con ultrasonidos (amplitud del 20%, 30 min).

Asimismo, se obtiene un aumento en los valores de capacidad antioxidante para DPPH y TEAC en las muestras tratadas por ultrasonidos de 5 a 30 min mayor a 30% y 25%, respectivamente, evidenciándose diferencias según la variedad y el método empleado. El contenido de flavonoides y AA influyen significativamente en la capacidad antioxidante de las muestras de mandarinas híbridas. Da Silva Lima et al. (2020) determinan los mayores valores de capacidad antioxidante, evaluados por DPPH, TEAC y FRAP, de extractos de piel de guava tras el empleo de ultrasonidos (40 kHz, 300W, 30 min, 25 °C), comparado con un método convencional. Plazzotta et al. (2020) observan un aumento en la capacidad antioxidante (evaluada por el método TEAC) de extractos de residuos de melocotón obtenidos por ultrasonidos, según incrementa el tiempo de extracción. Al igual que Chuyen et al. (2020) quienes determinan los mayores valores de capacidad antioxidante, según el método TEAC, tras el aumento del tiempo de extracción con ultrasonidos (de 60 a 100 min). En el estudio de Garcia-Castello et al. (2015) no se observa un aumento de la capacidad antioxidante, por el método DPPH, en el intervalo de tiempo de 3 a 60 min del tratamiento en piel de pomelo.

Borrás-Enríquez et al. (2021) observan en su estudio con residuos de mango que el método DPPH muestra valores más bajos en cuanto al porcentaje de inhibición con respecto al método TEAC. Asimismo, evidencian un aumento significativo de los valores de capacidad antioxidante influenciados por el ratio del solvente siendo mayor tras el empleo de etanol 50% (v/v) durante la extracción con ultrasonidos. Mientras que, Benmeziane et al. (2018) mencionan que los carotenoides extraídos de

residuos de melón son efectivos para la eliminación del radical DPPH[•]. Por su parte, Chuyen et al. (2020) observan que los carotenoides son los principales compuestos que contribuyen en la capacidad antioxidante de piel de calabaza dulce (*gac*, fruta asiática) evaluada por el método TEAC. Sin embargo, Sharma & Bhat (2021) señalan que los compuestos fenólicos son los principales compuestos relacionados con la capacidad antioxidante evaluada por DPPH en extractos obtenidos por ultrasonidos de piel de calabaza. En un estudio previo realizado por Mouratoglou et al. (2016) se menciona que los extractos de residuos de limón, olivo, cebolla, uva roja, café y salvado de trigo, con alta concentración de compuestos fenólicos también pueden poseer una mayor actividad antirradical DPPH[•] y poder reductor.

La purificación de los extractos es esencial para el análisis adecuado del perfil de compuestos fenólicos en una muestra. En el presente estudio se consigue detectar satisfactoriamente, por HPLC-UV, 16 compuestos fenólicos en muestras de piel de mandarina tratadas por ultrasonidos y empleando la EFS-C₁₈ como método de purificación. La extracción es un paso muy importante que afecta el análisis y caracterización de compuestos bioactivos. Teniendo en cuenta sus bajas concentraciones en los alimentos y otras fuentes naturales, es de suma importancia el uso de métodos de extracción que permitan su recuperación de forma eficiente a partir de matrices robustas, y al mismo tiempo eliminen algunos compuestos potenciales que pueden interferir en el procedimiento analítico. Por ello la purificación de los extractos favorece el análisis de compuestos fenólicos en diversas matrices alimentarias. Diamanti et al. (2017) utilizan la EFS con adsorbente de copolímeros balanceados hidrofílicos-lipofílicos (HLB) como método de purificación de extractos de piel de granada para el análisis de

compuestos fenólicos extraídos con ciclodextrinas. En un estudio previo Yadav et al. (2016) utilizan un método EFS empleando biocarbón (100 mg) adicionado a los cartuchos (C₁₈) para el análisis de 7 compuestos fenólicos en granada. Liu et al. (2021) emplean EFS con adsorbente de resina de amberlita como método de purificación para el análisis de 12 compuestos fenólicos en muestras de piel mandarina. Mientras que Su et al. (2021) utilizan cartuchos Strata X (30 mg de polímeros en fase reversa) para la EFS como método de purificación para el análisis de 9 compuestos fenólicos en muestras de miel.

Sin embargo, en algunos estudios se emplean procesos de extracción más selectivos para simplificar el tiempo de análisis. Así, Euterpio et al. (2013) aplican un método de extracción en fase sólida impresa molecularmente (MISPE) empleando un polímero impreso de (*E*)-resveratrol añadido (50 mg) a los cartuchos para el análisis de (*E*)-resveratrol y quercitina en vino y zumos de frutos rojos. Hashim et al. (2020) también describen el uso de MISPE-(*E*)-resveratrol para el análisis y la cuantificación de resveratrol, procianidina y epicatequina de residuos de semillas de uva. Por su parte Gonçalves et al. (2013a) emplean un método de micro-extracción con diversos adsorbentes empaquetados (MEPS) para la determinación de 10 compuestos fenólicos en vino tinto y blanco, con mejores resultados empleando C₈ y C₁₈ (4 mg). Este método (MEPS-C₁₈) también es aplicado para la detección de prenilflavonoides en muestras de cerveza (Gonçalves et al., 2013b). Porto-Figueira et al. (2015) analizan el contenido de compuestos fenólicos en muestras de té, empleando la micro-extracción en fase sólida (μ -SPEed) determinando favorablemente 8 compuestos fenólicos, utilizando adsorbentes poliméricos no-porosos y C₁₈. Pei & Huang (2016) usan μ -SPEed de múltiples fibras monolíticas basada en un monolito de

poli(vinilimidazol-co-etilendimetacrilato) para extraer ácidos fenólicos (4) en zumos de frutas. Aresta et al. (2018) emplean μ -SPEed con con fibras de poliacrilato como adsorbente para el análisis de *trans*-resveratrol en muestras de vino, espumantes y zumos de uva. Casado et al. (2019a) utilizan MEPS y μ -SPEed, para el análisis de polifenoles en alimentos para bebés por UPLC-PDA, observando alta selectividad y eficiencia en la extracción de 12 compuestos fenólicos con adsorbentes poliméricos (divinilbenceno/copolímero balanceado hidrofílico-lipofílico (DVB/HBL) y copolímeros de estireno-divinilbenceno en fase reversa (PS/DVB-RP), respectivamente). En muestras de zumos y smoothies, Casado et al. (2019b) detectan 20 compuestos fenólicos empleando dSPE con un adsorbente híbrido de C₁₈ (50 mg), mencionando que posee alto potencial para la purificación y extracción de estos analitos. Asimismo, en un estudio realizado por Casado et al. (2019c) se evalúa un método de dSPE empleando grupos C₈ y amonio cuaternario (NR₄⁺) como adsorbentes para la extracción de 22 compuestos fenólicos, incluidos ácidos fenólicos, flavonoides y estilbenos, a partir de muestras de zumos de frutas y vegetales. Por su parte, Barfi et al. (2013) detectan 7 flavonoides en muestras de zumos cítricos tras aplicar una micro-extracción en fase sólida-dispersa de matriz (μ MSPD) empleando C₁₈ (200 mg). Du et al. (2018) emplean μ MSPD basada en tamiz molecular de carbono para la extracción selectiva de 5 compuestos fenólicos en piel de granada. Lončarić et al. (2020) aplican este método para el análisis de 18 compuestos fenólicos en muestras de piel de manzana. En un estudio reciente realizado por Gómez-Mejía et al. (2021) se emplea MSPD en base a nanopartículas de TiO₂ (0,8 mg) para el análisis del 8 compuestos fenólicos en uva y orujos de uva.

También se describe el uso del QuEChERS como método de extracción y purificación para el análisis de polifenoles en alimentos. Así, Casado et al. (2018) propusieron un protocolo μ QuEChERS mejorado como método de extracción para la determinación de 12 compuestos fenólicos en alimentos para bebés. Aguiar et al. (2020) emplean QuEChERS como método de purificación para el análisis de polifenoles en extractos por ultrasonidos de frutas y vegetales, concluyendo que este método es satisfactorio para la detección de 12 compuestos fenólicos en 10 de las muestras analizadas excepto para extractos de zanahorias.

Los carotenoides también constituyen unos de los compuestos bioactivos más importantes en piel de mandarina. En el presente estudio se obtienen resultados favorables empleando la ELL con DEE y una posterior saponificación para la detección de carotenoides en extractos de piel de mandarina obtenidos por ultrasonidos. Por su parte Luan et al. (2020) describen el uso de una mezcla de cloroformo/metanol/agua (2:1:1, v/v/v) que contiene 0,01 % (p/v) de 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT), con un posterior proceso de saponificación con KOH-metanol 6% durante 30 min para la extracción de β -citraurina de piel de mandarina Huyou (*C. changshanensis*).

La extracción con solventes es uno de los métodos más empleados durante el análisis de carotenoides en diferentes residuos cítricos, sin embargo, en algunos de ellos no se realiza un proceso de saponificación. Chemat-Djenni et al. (2010) describen un método sostenible para la extracción de licopeno usando *d*-limoneno (extraído de piel de naranja) como sustituto del diclorometano en el proceso de extracción, con resultados satisfactorios. Ndayishimiye & Chun (2017) emplean la extracción con fluidos supercríticos (CO₂) para la obtención de carotenoides de aceite de

piel y semillas de Yuzu (*C. ichangensis* x *C. reticulata*). Murador et al. (2019) comparan la extracción carotenoides de muestras de piel naranja (*C. sinensis* L. Osbeck cv. Pera), con acetona, fluidos supercríticos (CO₂ y metanol) y líquidos iónicos-ultrasonidos durante la extracción, detectando satisfactoriamente diferentes estructuras de carotenoides, apocarotenoides y ésteres. Barman et al. (2020) utilizan una mezcla de hexano/acetona/etanol (50:25:25 v/v/v) en agitación durante 30 min para la extracción de carotenoides (β -caroteno) de piel de *C. reticulata* Blanco. Abbas et al. (2020) emplean éter de petróleo para la obtención de carotenoides de extractos de acetona de piel de mandarina (*C. reticulata*), para ser empleados como colorante alimentario. Toprakçı et al. (2021) describen un proceso de extracción de carotenoides de piel de naranja, empleando solventes como hexano, heptano, y cloroformo, para ser usados como aditivos estabilizadores en aceites de girasol, con resultados favorables. En un estudio reciente, Yaqoob et al. (2022) observan que la extracción con fluidos supercríticos (CO₂) empleando acetona como co-solvente favorece la determinación de 6 carotenoides en piel de mandarina Kinnow.

En estudios realizados en otras matrices de zumos y residuos de frutas se aplican procesos de saponificación para el análisis de carotenoides. Este procedimiento se utiliza cuando la muestra presenta altas cantidades de carotenoides esterificados. Delgado-Pelayo & Hornero-Méndez (2012) determinan 10 carotenoides en extractos saponificados de bayas Sarsaparilla (*Smilax aspera* L.). Delpino-Rius et al. (2014) evalúan el efecto de la saponificación en la recuperación de (9'Z)-neoxantina y (*all-E*)-violaxantina, de zumos de manzana y pulpas de melocotón, con resultados favorables además para el análisis de otros 5 carotenoides. Stinco et al. (2014) detectan 4 carotenoides en extractos saponificados de melocotón

rojo. Cacciola et al. (2016) determinan 23 carotenoides en extractos saponificados de mamey rojo. En el estudio realizado por Yan et al. (2016) se comparan diferentes métodos para el análisis de carotenoides en piel de plátano *Musa acuminata* observando una mayor concentración de β -caroteno en muestras saponificadas, comparado con los otros métodos. En el estudio Polidori et al. (2018) se detectan 4 carotenoides en zumos de naranja tras emplear procesos de microfiltración y saponificación de los extractos. Por su parte, Petry & Mercadante (2018) determinan hasta 19 carotenoides en extractos saponificados de pulpa de naranja y mango. Fratianni et al. (2018) describen un estudio en el que se compara el contenido de carotenoides en extractos saponificados y sin saponificar de bayas de Goji. Se determina que en los extractos no saponificados existe una mayor cantidad de dipalmitato de zeaxantina entre otros ésteres de carotenoides y β -caroteno, mientras que en los extractos saponificados es posible detectar zeaxantina > β -criptoxantina > luteína > β -caroteno. Berni et al. (2019) determinan hasta 12 carotenoides en extractos saponificados de diferentes frutos tropicales. Zhang et al. (2019) desarrollan un método simultáneo de saponificación asistida por ultrasonidos, para determinar ocho compuestos bioactivos, incluidos β -caroteno y luteína, en aceites de camelia y de oliva.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La determinación de los parámetros físico-químicos, el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del zumo de las tres variedades de mandarinas híbridas indica que:
 - Los zumos de mandarina Clemenvilla muestran el mayor contenido de polifenoles totales, ácido ascórbico y capacidad antioxidante; los zumos de Nadorcott presentan altas concentraciones de flavonoides totales y los zumos de Ortanique, de la segunda temporada, el contenido más alto de carotenoides totales.
 - Los compuestos bioactivos se correlacionan significativamente con la capacidad antioxidante evaluada mediante los métodos DPPH y TEAC, siendo el ácido ascórbico el de mayor contribución.
 - El pH, flavonoides totales, ácido ascórbico, DPPH y TEAC son los parámetros predictores para clasificar las mandarinas híbridas estudiadas y agruparlas según la variedad (en un 98,59% de los casos).
2. Al evaluar el efecto de la aplicación de ultrasonidos para obtener los extractos de piel de mandarinas híbridas se demuestra que:
 - El incremento de conductividad aumenta significativamente durante los tres tiempos de extracción (5, 15 y 30 min) y los °Brix disminuyen a los 15 y 30 min de tratamiento.
 - El contenido de compuestos fenólicos totales aumenta más del 30% a medida que se incrementa el tiempo de extracción, existiendo una interacción significativa entre el tiempo y la variedad.

- Hay un aumento significativo (entre 35 y 60%) en el contenido de flavonoides totales durante la extracción con ultrasonidos con el tiempo de extracción.
 - Los carotenoides totales aumentan significativamente (entre 46 y 55%) con el tiempo de extracción, con influencia de la variedad.
 - Se observa un incremento (entre 17 y 23%), en el contenido de ácido ascórbico según aumenta el tiempo de extracción, existiendo diferencias significativas según la variedad.
 - Se obtiene un aumento en la capacidad antioxidante para DPPH y TEAC con el tiempo de extracción, mayor al 30% y 25%, respectivamente, observando diferencias según la variedad y el método de determinación utilizado. En ambos métodos, el contenido de flavonoides y ácido ascórbico influyen significativamente en la capacidad antioxidante.
 - El índice de extracción muestra que se obtienen valores más altos de incremento de conductividad, °Brix, contenido de flavonoides totales y capacidad antioxidante evaluada por DPPH y TEAC, durante los 5 y 15 min de extracción.
3. El método de purificación del extracto y el análisis cromatográfico EFS-C₁₈/HPLC-UV puesto a punto, permite la separación e identificación del perfil de compuestos fenólicos.
- Los parámetros analíticos linealidad, límites de detección y de cuantificación, precisión intra-día e inter-día, exactitud y efecto matriz indican que el método es sensible y robusto para la determinación del perfil de compuestos fenólicos.

- Hesperidina y narirutina, del grupo de los flavonoides, son los compuestos fenólicos de mayor concentración identificados por UHPLC-qTOF-MS/MS. De los ácidos fenólicos identificados, el ácido ferúlico es el más abundante.
4. La extracción líquido-líquido, con dietil-éter y posterior saponificación, permite la identificación del perfil de carotenoides por HPLC-UV en los extractos obtenidos por ultrasonidos de piel de mandarinas híbridas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aadil, R.M., Zeng, X.A., Han, Z., & Sun, D.W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 141(3), 3201–3206.
- Abbas, S., Haider, M., Kafayet, F., Ashraf, S., Masood, A., & Batool, D. (2020). Effect of Citrus Peels Mingled Diets on *Carassius auratus* Coloration. *Pakistan Journal of Zoology*, 52.
- Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M. M., Wu, T., Lei, S., Khan, M. A., & Zeng, X. (2014). Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3), 984–990.
- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M.M., Hu, B., Lei, S., Zhang, X., & Zeng, X. (2013). Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1182–1187.
- AESAN. (2019). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre Ingestas Nutricionales de Referencia para la población española (AESAN-2019-003; pp. 1–26). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Disponible en https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/INR.pdf. Accedido en Setiembre 20, 2021.
- Agócs, A., Nagy, V., Szabó, Z., Márk, L., Ohmacht, R., & Deli, J. (2007). Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), 390–394.
- Aguiar, J., Gonçalves, J. L., Alves, V. L., & Câmara, J. S. (2020). Chemical Fingerprint of Free Polyphenols and Antioxidant Activity in Dietary Fruits and Vegetables Using a Non-Targeted Approach Based on QuEChERS Ultrasound-Assisted Extraction Combined with UHPLC-PDA. *Antioxidants*, 9(4), 305.
- Ahmed, S., Rattanpal, H. S., Gul, K., Dar, R. A., & Sharma, A. (2019). Chemical composition, antioxidant activity and GC-MS analysis of juice and peel oil of grapefruit varieties cultivated in India. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(7), 1634–1642.
- AIJN. The Micronutrients in Orange Juice. Disponible en <https://aijn.eu/en/publications/press/the-micronutrients-in-orange-juice>. Accedido en Febrero 18, 2021.
- Aires, A., Carvalho, R., & Saavedra, M. J. (2017). Reuse potential of vegetable wastes (broccoli, green bean and tomato) for the recovery of antioxidant phenolic acids and flavonoids. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(1), 98–107.
- Al-Juhaimi, F., & Ghafoor, K. (2013). Bioactive Compounds, Antioxidant and Physicochemical Properties of Juice from Lemon, Mandarin and Orange Fruits Cultivated in Saudi. *Pakistan Journal of Botany*, 45(4), 1193–1196.
- Álvarez, J., Pastoriza, S., Alonso-Olalla, R., Delgado-Andrade, C., & Rufián-Henares, J. A. (2014). Nutritional and physicochemical characteristic of commercial Spanish citrus juices. *Food Chemistry*, 164, 396–405.
- Álvarez, R., Carvalho, C.P., Sierra, J., Lara, O., Cardona, D., & Londoño-Londoño, J. (2012). Citrus Juice Extraction Systems: Effect on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Clementine Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(3), 774–781.
- Anticona, M., Blesa, J., Frigola, A., & Esteve, M.J. (2020). High Biological Value Compounds Extraction from Citrus Waste with Non-Conventional Methods. *Foods*, 9(6), 811.

- Anticono, M., Blesa, J., Lopez-Malo, D., Frigola, A., & Esteve, M.J. (2021). Effects of ultrasound-assisted extraction on physicochemical properties, bioactive compounds, and antioxidant capacity for the valorization of hybrid mandarin peels. *Food Bioscience*, Article 101185.
- AOAC. (2000). Official methods of analysis of AOAC (International 17th edition). The Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD, USA.
- Aresta, A., Cotugno, P., Massari, F., & Zambonin, C. (2018). Determination of Trans-resveratrol in Wines, Spirits, and Grape Juices Using Solid-Phase Micro Extraction Coupled to Liquid Chromatography with UV Diode-Array Detection. *Food Analytical Methods*, 11(2), 426–431.
- Barfi, B., Asghari, A., Rajabi, M., Barfi, A., & Saedi, I. (2013). Simplified miniaturized ultrasound-assisted matrix solid phase dispersion extraction and high performance liquid chromatographic determination of seven flavonoids in citrus fruit juice and human fluid samples: Hesperetin and naringenin as biomarkers. *Journal of Chromatography A*, 1311, 30–40.
- Barman, K., Chowdhury, D., & Baruah, P.K. (2020). Development of β -carotene loaded nanoemulsion using the industrial waste of orange (*Citrus reticulata*) peel to improve in vitro bioaccessibility of carotenoids and use as natural food colorant. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(5), Article e14429.
- Baswal, A.K., Dhaliwal, H.S., Singh, Z., Mahajan, B.V.C., & Gill, K.S. (2020). Postharvest application of methyl jasmonate, 1-methylcyclopropene and salicylic acid extends the cold storage life and maintain the quality of 'Kinnow' mandarin (*Citrus nobilis* L. X *C. deliciosa* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 161, Article 111064.
- Beltrán, F., Perez-López, A.J., López-Nicolás, J.M., & Carbonell-Barrachina, A. A. (2008). Effects of Mandarin Cultivar on Quality of Mandarin Juice. *Food Science and Technology International*, 14(4), 307–313.
- Benmeziane, A., Boulekbache-Makhlouf, L., Mapelli-Brahm, P., Khaled Khodja, N., Remini, H., Madani, K., & Meléndez-Martínez, A.J. (2018). Extraction of carotenoids from cantaloupe waste and determination of its mineral composition. *Food Research International*, 111, 391–398.
- Berni, P., Campoli, S. S., Negri, T. C., de Toledo, N. M. V., & Canniatti-Brazaca, S. G. (2019). Non-conventional Tropical Fruits: Characterization, Antioxidant Potential and Carotenoid Bioaccessibility. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1), 141–148.
- Betoret, E., Mannozi, C., Dellarosa, N., Laghi, L., Rocculi, P., & Dalla Rosa, M. (2017). Metabolomic studies after high pressure homogenization processed low pulp mandarin juice with trehalose addition. Functional and technological properties. *Journal of Food Engineering*, 200, 22–28.
- Betoret, E., Sentandreu, E., Betoret, N., & Fito, P. (2012). Homogenization pressures applied to citrus juice manufacturing. Functional properties and application. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 28–33.
- Borrás-Enríquez, A.J., Reyes-Ventura, E., Villanueva-Rodríguez, S.J., & Moreno-Vilet, L. (2021). Effect of Ultrasound-Assisted Extraction Parameters on Total Polyphenols and Its Antioxidant Activity from Mango Residues (*Mangifera indica* L. var. Manililla). *Separations*, 8(7), 94.
- Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., & Chemat, F. (2015). Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent

- free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 72–79.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Buniowska, M., Carbonell-Capella, J., Zulueta, A., Frigola, A., & Esteve, M.J. (2015). Bioaccessibility of Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity from Orange Peel after Pulsed Electric Fields and High Voltage Electrical Discharges. *MOJ Food Processing Technology*, 1(3).
- Cacciola, F., Giuffrida, D., Utczas, M., Mangraviti, D., Dugo, P., Menchaca, D., Murillo, E., & Mondello, L. (2016). Application of Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography for Carotenoid Analysis in Red Mamey (*Pouteria sapote*) Fruit. *Food Analytical Methods*, 9(8), 2335–2341.
- Canan, İ., Gündoğdu, M., Seday, U., Oluk, C.A., KaraşahiN, Z., Eroğlu, E.Ç., Yazici, E., & Ünlü, M. (2016). Determination of antioxidant, total phenolic, total carotenoid, lycopene, ascorbic acid, and sugar contents of Citrus species and mandarin hybrids. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40(6), 894–899.
- Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Grimi, N., Vorobiev, E., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2016). Changes of Antioxidant Compounds in a Fruit Juice-Stevia rebaudiana Blend Processed by Pulsed Electric Technologies and Ultrasound. *Food and Bioprocess Technology*, 9(7), 1159–1168.
- Casado, N., Morante-Zarzero, S., Pérez-Quintanilla, D., Câmara, J. S., & Sierra, I. (2019b). Dispersive Solid-Phase Extraction of Polyphenols from Juice and Smoothie Samples Using Hybrid Mesostructured Silica Followed by Ultra-high-Performance Liquid Chromatography-Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(3), 955–967.
- Casado, N., Perestrelo, R., Silva, C. L., Sierra, I., & Câmara, J. S. (2019a). Comparison of high-throughput microextraction techniques, MEPS and μ -SPEed, for the determination of polyphenols in baby food by ultrahigh pressure liquid chromatography. *Food Chemistry*, 292, 14–23.
- Casado, N., Perestrelo, R., Silva, C.L., Sierra, I., & Câmara, J.S. (2018). An improved and miniaturized analytical strategy based on μ -QuEChERS for isolation of polyphenols. A powerful approach for quality control of baby foods. *Microchemical Journal*, 139, 110–118.
- Casado, N., Pérez-Quintanilla, D., Morante-Zarzero, S., & Sierra, I. (2019c). Bi-functionalized mesostructured silicas as reversed-phase/strong anion-exchange sorbents. Application to extraction of polyphenols prior to their quantitation by UHPLC with ion-trap mass spectrometry detection. *Microchimica Acta*, 186(3), 164.
- Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., & Perego, P. (2010). Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 50–55.
- Cebadera, L. (2017). Valoración nutricional, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de cítricos: Clementinas y naranjas pigmentadas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Cesa, S., Carradori, S., Bellagamba, G., Locatelli, M., Casadei, M.A., Masci, A., & Paolicelli, P. (2017). Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour

- modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. *Food Chemistry*, 232, 114–123.
- Cheigh, C.I., Chung, E.Y., & Chung, M.S. (2012). Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from Citrus unshiu peel using subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 110(3), 472–477.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. *A review. Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.
- Chemat-Djenni, Z., Ferhat, M. A., Tomao, V., & Chemat, F. (2010). Carotenoid Extraction from Tomato Using a Green Solvent Resulting from Orange Processing Waste. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(2), 139–147.
- Chen, M.L., Yang, D.J., & Liu, S.C. (2011). Effects of drying temperature on the flavonoid, phenolic acid and antioxidative capacities of the methanol extract of citrus fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) peels. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(6), 1179–1185.
- Chen, Q., Wang, D., Tan, C., Hu, Y., Sundararajan, B., & Zhou, Z. (2020). Profiling of Flavonoid and Antioxidant Activity of Fruit Tissues from 27 Chinese Local Citrus Cultivars. *Plants*, 9(2), Article 196.
- Cheng, C., Jia, M., Gui, Y., & Ma, Y. (2020). Comparison of the effects of novel processing technologies and conventional thermal pasteurisation on the nutritional quality and aroma of Mandarin (*Citrus unshiu*) juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64, Article 102425.
- Chuyen, H. V., Roach, P. D., Golding, J. B., Parks, S. E., & Nguyen, M. H. (2020). Ultrasound-Assisted Extraction of GAC Peel: An Optimization of Extraction Conditions for Recovering Carotenoids and Antioxidant Capacity. *Processes*, 8(1), 8.
- Cortés, C., Esteve, M. J., Frígola, A., & Torregrosa, F. (2004). Identification and Quantification of Carotenoids Including Geometrical Isomers in Fruit and Vegetable Juices by Liquid Chromatography with Ultraviolet–Diode Array Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), 2203–2212.
- Da Silva Lima, R., Nunes, I. L., & Block, J. M. (2020). Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Carotenoids from Guava’s Pulp and Waste Powders. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(1), 63–69.
- De Ritter, & Purcell. (1981). Carotenoid analytical methods. In J.C. Bauernfeind (Eds.), *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors* (pp. 815–923). Elsevier.
- Delgado-Pelayo, R., & Hornero-Méndez, D. (2012). Identification and Quantitative Analysis of Carotenoids and Their Esters from Sarsaparilla (*Smilax aspera* L.) Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(33), 8225–8232.
- Delpino-Rius, A., Eras, J., Marsol-Vall, A., Vilaró, F., Balcells, M., & Canela-Garayoa, R. (2014). Ultra performance liquid chromatography analysis to study the changes in the carotenoid profile of commercial monovarietal fruit juices. *Journal of Chromatography A*, 1331, 90–99.
- Diamanti, A. C., Igoumenidis, P. E., Mourtzinou, I., Yannakopoulou, K., & Karathanos, V. T. (2017). Green extraction of polyphenols from whole pomegranate fruit using cyclodextrins. *Food Chemistry*, 214, 61–66.

- Dragull, K., Breksa III, A.P., & Cain, B. (2008). Synephrine Content of Juice from Satsuma Mandarins (*Citrus unshiu* Marcovitch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8874–8878.
- Du, L.J., Huang, J.P., Wang, B., Wang, C.H., Wang, Q.Y., Hu, Y.H., Yi, L., Cao, J., Peng, L.Q., Chen, Y.B., & Zhang, Q.D. (2018). Carbon molecular sieve based micro-matrix-solid-phase dispersion for the extraction of polyphenols in pomegranate peel by UHPLC-Q-TOF/MS. *Electrophoresis*, 39(17), 2218–2227.
- Durmuş, A., Çolak, H., & Karaköse, E. (2019). Production and examination of ZnO thin film for first time using green synthesized method from aqueous *Citrus reticulata* peel extract. *Journal of Alloys and Compounds*, 809, Article 151813.
- Esparza-Martínez, F.J., Miranda-López, R., Mata-Sánchez, S.M., & Guzmán-Maldonado, S. H. (2016). Extractable and Non-Extractable Phenolics and Antioxidant Capacity of Mandarin Waste Dried at Different Temperatures. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(3), 294–300.
- Euterpio, M.A., Pagano, I., Piccinelli, A.L., Rastrelli, L., & Crescenzi, C. (2013). Development and Validation of a Method for the Determination of (E)-Resveratrol and Related Phenolic Compounds in Beverages Using Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1640–1645.
- Farajzadeh, M.A., & Abbaspour, M. (2017). Development of a new sample preparation method based on liquid–liquid–liquid extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction and its application on unfiltered samples containing high content of solids. *Talanta*, 174, 111–121.
- Fayek, N.M., Farag, M.A., Abdel Monem, A.R., Moussa, M.Y., Abd-Elwahab, S.M., & El-Tanbouly, N.D. (2019). Comparative Metabolite Profiling of Four Citrus Peel Cultivars via Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole-Time-of-Flight-Mass Spectrometry and Multivariate Data Analyses. *Journal of Chromatographic Science*, 57(4), 349–360.
- Feng, S., Niu, L., Suh, J.H., Hung, W.L., & Wang, Y. (2018). Comprehensive Metabolomics Analysis of Mandarins (*Citrus reticulata*) as a Tool for Variety, Rootstock, and Grove Discrimination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(39), 10317–10326.
- Fernández, F., Juárez, J., Bernabe, A. J., García, F. J., & Gómez, J. M. (2019). Activity of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus iranicum* var. *Tenuihypharum* var. *Nova*, and its effect on citrus development in southeastern Spain. *Acta Horticulturae*, 1230, 73–84.
- Ferreira, S.S., Silva, A.M., & Nunes, F.M. (2018). Citrus *reticulata* Blanco peels as a source of antioxidant and anti-proliferative phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 111, 141–148.
- Floegel, A., Kim, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I., & Chun, O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048.
- Fратиanni, A., Niro, S., Alam, M. D. R., Cinquanta, L., Di Matteo, M., Adiletta, G., & Panfili, G. (2018). Effect of a physical pre-treatment and drying on carotenoids of goji berries (*Lycium barbarum* L.). *LWT*, 92, 318–323.

- Fu, M., Xu, Y., Chen, Y., Wu, J., Yu, Y., Zou, B., An, K., & Xiao, G. (2017). Evaluation of bioactive flavonoids and antioxidant activity in Pericarpium Citri Reticulatae (*Citrus reticulata* 'Chachi') during storage. *Food Chemistry*, 230, 649–656.
- Galarce-Bustos, O., Novoa, L., Pavon-Perez, J., Henriquez-Aedo, K., & Aranda, M. (2019). Chemometric Optimization of QuEChERS Extraction Method for Polyphenol Determination in Beers by Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Food Analytical Methods*, 12(2), 448–457.
- Galván D'Alessandro, L., Dimitrov, K., Vauchel, P., & Nikov, I. (2014). Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(10), 1818–1826.
- García-Castello, E.M., Rodríguez-Lopez, A.D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C., & Cassano, A. (2015). Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1114–1122.
- Ghasemi, K., Ghasemi, Y., & Ebrahimzadeh, M.A. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(3), 277–281.
- Gironés-Vilaplana, A., Moreno, D., & García-Viguera, C. (2014). Phytochemistry and biological activity of Spanish Citrus fruits. *Food & Function*, 5(4), 764–772.
- Giuffrida, D., Cacciola, F., Mapelli-Brahm, P., Stinco, C.M., Dugo, P., Oteri, M., Mondello, L., & Meléndez-Martínez, A.J. (2019). Free carotenoids and carotenoids esters composition in Spanish orange and mandarin juices from diverse varieties. *Food Chemistry*, 300, Article 125139.
- Giuffrida, D., Zoccali, M., & Mondello, L. (2020). Recent developments in the carotenoid and carotenoid derivatives chromatography-mass spectrometry analysis in food matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 132, Article 116047.
- Gómez-López, V. M., Buitrago, M. E., Tapia, M. S., & Martínez-Yépez, A. (2017). Effect of ultrasonication on microbial quality, colour, and ascorbic acid content of passion-fruit juice during storage. *Acta Alimentaria*, 46(4), 470–480.
- Gómez-Mejía, E., Mikkelsen, L.H., Rosales-Conrado, N., León-González, M.E., & Madrid, Y. (2021). A combined approach based on matrix solid-phase dispersion extraction assisted by titanium dioxide nanoparticles and liquid chromatography to determine polyphenols from grape residues. *Journal of Chromatography A*, 1644, Article 462128.
- Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., León-González, M. E., & Madrid, Y. (2019). Citrus peels waste as a source of value-added compounds: Extraction and quantification of bioactive polyphenols. *Food Chemistry*, 295, 289–299.
- Gonçalves, J.L., Alves, V.L., Rodrigues, F.P., Figueira, J.A., & Câmara, J.S. (2013b). A semi-automatic microextraction in packed sorbent, using a digitally controlled syringe, combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a new and ultra-fast approach for the determination of prenylflavonoids in beers. *Journal of Chromatography A*, 1304, 42–51.
- Gonçalves, J., Silva, C.L., Castilho, P.C., & Câmara, J. S. (2013a). An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. *Microchemical Journal*, 106, 129–138.

- Goula, A. M., Ververi, M., Adamopoulou, A., & Kaderides, K. (2017). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 821–830.
- Gonzales, G.B., Raes, K., Vanhoutte, H., Coelus, S., Smagghe, G., & Van Camp, J. (2015). Liquid chromatography–mass spectrometry coupled with multivariate analysis for the characterization and discrimination of extractable and nonextractable polyphenols and glucosinolates from red cabbage and Brussels sprout waste streams. *Journal of Chromatography A*, 1402, 60–70.
- Gonzalez-Dugo, V., Ruz, C., Testi, L., Orgaz, F., & Fereres, E. (2018). The impact of deficit irrigation on transpiration and yield of mandarin and late oranges. *Irrigation Science*, 36(4), 227–239.
- Guandalini, B. B. V., Rodrigues, N. P., & Marczak, L. D. F. (2019). Sequential extraction of phenolics and pectin from mango peel assisted by ultrasound. *Food Research International*, 119, 455–461.
- Guccione, C., Bergonzi, M., Piazzini, V., & Bilia, A. (2016). A Simple and Rapid HPLC-PDA MS Method for the Profiling of Citrus Peels and Traditional Italian Liqueurs. *Planta Medica*, 82(11/12), 1039–1045.
- Gupta, A. K., Koch, P., & Mishra, P. (2020). Optimization of debittering and deacidification parameters for Pomelo juice and assessment of juice quality. *Journal of Food Science and Technology*, 57(12), 4726–4732.
- Hashim, S. N. N. S., Boysen, R. I., Yang, Y., Schwarz, L. J., Danylec, B., & Hearn, M. T. W. (2020). Parallel enrichment of polyphenols and phytosterols from Pinot noir grape seeds with molecularly imprinted polymers and analysis by capillary high-performance liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Talanta*, 208, Article 120397.
- Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., & Xia, W. (2009). Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation and Purification Technology*, 70(1), 63–70.
- Hayat, K., Zhang, X., Chen, H., Xia, S., Jia, C., & Zhong, F. (2010). Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 73(3), 371–376.
- Ho, S.C., & Lin, C.C. (2008). Investigation of Heat Treating Conditions for Enhancing the Anti-Inflammatory Activity of Citrus Fruit (*Citrus reticulata*) Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7976–7982.
- Hu, Y., Kou, G., Chen, Q., Li, Y., & Zhou, Z. (2019). Protection and delivery of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) peel extracts by encapsulation of whey protein concentrate nanoparticles. *LWT*, 99, 24–33.
- Hu, Y., Zhang, W., Ke, Z., Li, Y., & Zhou, Z. (2017). In vitro release and antioxidant activity of Satsuma mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Unshiu) peel flavonoids encapsulated by pectin nanoparticles. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(11), 2362–2373.
- Huang, Y.S., & Ho, S.C. (2010). Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chemistry*, 119(3), 868–873.

- Hunlun, C., de Beer, D., Sigge, G.O., & Wyk, J.V. (2017). Characterisation of the flavonoid composition and total antioxidant capacity of juice from different citrus varieties from the Western Cape region. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 115–125.
- Irkin, R., Dogan, S., Degirmencioglu, N., Diken, M.E., & Guldaz, M. (2015). Phenolic content, antioxidant activities and stimulatory roles of citrus fruits on some lactic acid bacteria. *Archives of Biological Sciences*, 67(4), 1313–1321.
- Kelebek, H., & Selli, S. (2014). Identification of phenolic compositions and the antioxidant capacity of mandarin juices and wines. *Journal of Food Science and Technology*, 51(6), 1094–1101.
- Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851–858.
- Ko, M.J., Kwon, H.L., & Chung, M.S. (2016). Pilot-scale subcritical water extraction of flavonoids from satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Markovich) peel. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, 175–181.
- Kour, R., Rastogi, A., Sharma, R. K. ., Kumar, A., & Raghuwanshi, P. (2014). Chemical composition, anti-oxidative activity and in vitro dry matter degradability of Kinnow mandarin fruit waste. *Veterinary World*, 7(10), 803–806.
- Kumaran, A., & Karunakaran, R.J. (2007). Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 100(1), 356–361.
- Kumari, B., Tiwari, B.K., Hossain, M.B., Rai, D.K., & Brunton, N.P. (2017). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from potato peels: Profiling and kinetic modelling. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(6), 1432–1439.
- Kumcuoglu, S., Yilmaz, T., & Tavman, S. (2014). Ultrasound assisted extraction of lycopene from tomato processing wastes. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4102–4107.
- Lado, J., Alós, E., Manzi, M., Cronje, P. J. R., Gómez-Cadenas, A., Rodrigo, M. J., & Zacarías, L. (2019). Light Regulation of Carotenoid Biosynthesis in the Peel of Mandarin and Sweet Orange Fruits. *Frontiers in Plant Science*, 10, Article 1288.
- Lafuente, M.T., Ballester, A.R., Calejero, J., & González-Candelas, L. (2011). Effect of high-temperature-conditioning treatments on quality, flavonoid composition and vitamin C of cold stored ‘Fortune’ mandarins. *Food Chemistry*, 128(4), 1080–1086.
- Lai, Y.Y., Chen, J.H., Liu, Y.C., Hsiao, Y.T., & Wang, C.Y. (2021). Evaluation of microbiological safety, physicochemical and aromatic qualities of shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata) juice after high pressure processing. *Journal of Food Science and Technology*, 1–11.
- Lee, H. S., Castle, W. S., & Coates, G. A. (2001). High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. *Journal of Chromatography A*, 913(1), 371–377.
- Lee, J.J., Kim, E.J., Kim, J.M., & Yoon, K.Y. (2019). Physicochemical properties and antioxidant activities of commercial orange juice and grapefruit juice. *Korean Journal of Food Preservation*, 26(3), 322–329.
- Legua, P., Forner, J.B., Hernández, Fca., & Forner-Giner, M. A. (2013). Physicochemical properties of orange juice from ten rootstocks using multivariate analysis. *Scientia Horticulturae*, 160, 268–273.

- Legua, P., Forner, J.B., Hernández, F., & Forner-Giner, M.A. (2014). Total phenolics, organic acids, sugars and antioxidant activity of mandarin (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.): Variation from rootstock. *Scientia Horticulturae*, 174, 60–64.
- Li, B.B., Smith, B., & Hossain, Md. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182–188.
- Li, J., Wu, C., Li, F., Yu, R., Wu, X., Shen, L., Liu, Y., & Zeng, W. (2019). Optimization of ultrasound-assisted water extraction of flavonoids from *Psidium guajava* leaves by response surface analysis. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(1), 21–29.
- Li, W., Wang, Z., Wang, Y., Jiang, C., Liu, Q., Sun, Y., & Zheng, Y. (2012). Pressurised liquid extraction combining LC–DAD–ESI/MS analysis as an alternative method to extract three major flavones in *Citrus reticulata* ‘Chachi’ (Guangchenpi). *Food Chemistry*, 130(4), 1044–1049.
- Li, Z., Jin, R., Yang, Z., Wang, X., You, G., Guo, J., Zhang, Y., Liu, F., & Pan, S. (2021). Comparative study on physicochemical, nutritional and enzymatic properties of two Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) varieties from different regions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 95, Article 103614.
- Liu, Y., Benohoud, M., Galani Yamdeu, J. H., Gong, Y. Y., & Orfila, C. (2021). Green extraction of polyphenols from citrus peel by-products and their antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry: X*, 12, Article 100144.
- Lončarić, A., Matanović, K., Ferrer, P., Kovač, T., Šarkanj, B., Skendrović Babojelić, M., & Lores, M. (2020). Peel of Traditional Apple Varieties as a Great Source of Bioactive Compounds: Extraction by Micro-Matrix Solid-Phase Dispersion. *Foods*, 9(1), Article 80.
- Long, T., Lv, X., Xu, Y., Yang, G., Xu, L.Y., & Li, S. (2019). Supercritical fluid CO₂ extraction of three polymethoxyflavones from *Citrus reticulata* pericarpium and subsequent preparative separation by continuous high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1124, 284–289.
- Luan, Y., Wang, S., Wang, R., & Xu, C. (2020). Accumulation of red apocarotenoid β -citraurin in peel of a spontaneous mutant of huyou (*Citrus changshanensis*) and the effects of storage temperature and ethylene application. *Food Chemistry*, 309, Article 125705.
- Luengo, E., Condón-Abanto, S., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2014). Improving the extraction of carotenoids from tomato waste by application of ultrasound under pressure. *Separation and Purification Technology*, 136, 130–136.
- Luo, Y., Zeng, W., Huang, K.E., Li, D.X., Chen, W., Yu, X.Q., & Ke, X.H. (2019). Discrimination of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus reticulata* ‘Chachi’ as well as the *Citrus reticulata* ‘Chachi’ within different storage years using ultra high performance liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 171, 218–231.
- Ma, G., Zhang, L., Iida, K., Madono, Y., Yungyuen, W., Yahata, M., Yamawaki, K., & Kato, M. (2017). Identification and quantitative analysis of β -cryptoxanthin and β -citraurin esters in Satsuma mandarin fruit during the ripening process. *Food Chemistry*, 234, 356–364.
- Ma, Y., Chen, J., Liu, D., & Ye, X. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(1), 57–62.

- Margean, A., Lupu, M. I., Alexa, E., Padureanu, V., Canja, C.M., Cocan, I., Negrea, M., Calefariu, G., & Poiana, M.A. (2020). An Overview of Effects Induced by Pasteurization and High-Power Ultrasound Treatment on the Quality of Red Grape Juice. *Molecules*, 25(7), Article 1669.
- Marzuki, W.N., Abdullah, N., Muhammad, N., Othman, S.A., & Jong, S.H. (2018). Screening the Physicochemical Properties of Thermosonically Treated Pomelo Juice. *Journal of Science and Technology*, 10(2), 108–115.
- Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Nakajima, N., & Hasegawa, Y. (2009). Effect of Postharvest Temperature and Ethylene on Carotenoid Accumulation in the Flavedo and Juice Sacs of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4724–4732.
- Meléndez-Martínez, A.J., Gómez-Robledo, L., Melgosa, M., Vicario, I.M., & Heredia, F.J. (2011). Color of orange juices in relation to their carotenoid contents as assessed from different spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(6), 837–844.
- Mierzwa, D., Szadzińska, J., Radziejewska-Kubzdela, E., & Biegańska-Marecik, R. (2021). Ultrasound-Assisted Vacuum Impregnation as a Strategy for the Management of Potato By-Products. *Sustainability*, 13(6), Article 3437.
- Mnyandu, H. M., & Mahlambi, P. N. (2021). Optimization and application of QuEChERS and SPE methods followed by LC-PDA for the determination of triazines residues in fruits and vegetables from Pietermaritzburg local supermarkets. *Food Chemistry*, 360, Article 129818.
- Montero-Calderon, A., Cortes, C., Zulueta, A., Frigola, A., & Esteve, M.J. (2019). Green solvents and Ultrasound-Assisted Extraction of bioactive orange (*Citrus sinensis*) peel compounds. *Scientific Reports*, 9, Article 16120.
- Morales, J., Salvador, A., Besada, C., Navarro, P., & Bermejo, A. (2021). Physicochemical, sensorial and nutritional quality during the harvest season of ‘Tango’ mandarins grafted onto Carrizo Citrange and Forner-Alcaide no. 5. *Food Chemistry*, 339, Article 127781.
- Mouratoglou, E., Malliou, V., & Makris, D. P. (2016). Novel Glycerol-Based Natural Eutectic Mixtures and Their Efficiency in the Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Agri-Food Waste Biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 7(6), 1377–1387.
- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), 139–148.
- Murador, D.C., Braga, A.R., Martins, P.L., Mercadante, A.Z., & de Rosso, V.V. (2019). Ionic liquid associated with ultrasonic-assisted extraction: A new approach to obtain carotenoids from orange peel. *Food Research International*, 126, Article 108653.
- Murador, D.C., Salafia, F., Zoccali, M., Martins, P. L. G., Ferreira, A. G., Dugo, P., Mondello, L., de Rosso, V. V., & Giuffrida, D. (2019). Green Extraction Approaches for Carotenoids and Esters: Characterization of Native Composition from Orange Peel. *Antioxidants*, 8(12), 613.
- Navarro, J. L., Izquierdo, L., Carbonell, J. V., & Sentandreu, E. (2014). Effect of pH, temperature and maturity on pectinmethylesterase inactivation of citrus juices treated

- by high-pressure homogenization. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2), 785–788.
- Nayak, B., Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., & Khodir, M. (2015). Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chemistry*, 187, 507–516.
- Ndayishimiye, J., & Chun, B. S. (2017). Optimization of carotenoids and antioxidant activity of oils obtained from a co-extraction of citrus (Yuzu ichandrin) by-products using supercritical carbon dioxide. *Biomass and Bioenergy*, 106, 1–7.
- Ninčević Grassino, A., Ostojić, J., Miletić, V., Djaković, S., Bosiljkov, T., Zorić, Z., Ježek, D., Rimac Brnčić, S., & Brnčić, M. (2020). Application of high hydrostatic pressure and ultrasound-assisted extractions as a novel approach for pectin and polyphenols recovery from tomato peel waste. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64, Article 102424.
- Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P., & Singanusong, R. (2018). Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) peel. *Food Chemistry*, 241, 338–345.
- Nishad, J., Saha, S., & Kaur, C. (2019). Enzyme- and ultrasound-assisted extractions of polyphenols from *Citrus sinensis* (cv. Malta) peel: A comparative study. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(8), Article e14046.
- Ordoñez-Santos, L.E., Martínez-Girón, J., Rodríguez-Rodríguez, D.X., Ordoñez-Santos, L. E., Martínez-Girón, J., & Rodríguez-Rodríguez, D.X. (2019). Extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) peel by means of ultrasound application and vegetable oil. *DYNA*, 86(209), 91–96.
- Ouellette, R. J., & Rawn, J. D. (2015). 9—Ethers and Epoxides. In R. J. Ouellette & J. D. Rawn (Eds.), *Principles of Organic Chemistry* (pp. 239–258). Elsevier.
- Paini, M., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Perego, P., Binello, A., & Cravotto, G. (2016). Influence of ethanol/water ratio in ultrasound and high-pressure/high-temperature phenolic compound extraction from agri-food waste. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(2), 349–358.
- Pei, M., & Huang, X. (2016). Determination of trace phenolic acids in fruit juice samples using multiple monolithic fiber solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytical Methods*, 8(18), 3831–3838.
- Pérez, A.G., Luaces, P., Oliva, J., Ríos, J.J., & Sanz, C. (2005). Changes in vitamin C and flavour components of mandarin juice due to curing of fruits. *Food Chemistry*, 91(1), 19–24.
- Petry, F.C., & Mercadante, A.Z. (2018). New Method for Carotenoid Extraction and Analysis by HPLC-DAD-MS/MS in Freeze-Dried Citrus and Mango Pulps. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29, 205–215.
- Petzold, G., Orellana, P., Moreno, J., & Valeria, P. (2019). Physicochemical Properties of Cryoconcentrated Orange Juice. *Chemical Engineering Transactions*, 75, 37–42.
- Plazzotta, S., Ibarz, R., Manzocco, L., & Martín-Belloso, O. (2020). Optimizing the antioxidant biocompound recovery from peach waste extraction assisted by ultrasounds or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, Article 104954.

- Polidori, J., Dhuique-Mayer, C., & Dornier, M. (2018). Crossflow microfiltration coupled with diafiltration to concentrate and purify carotenoids and flavonoids from citrus juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45, 320–329.
- Porto-Figueira, P., Figueira, J. A., Pereira, J. A. M., & Câmara, J. S. (2015). A fast and innovative microextraction technique, μ SPEed, followed by ultrahigh performance liquid chromatography for the analysis of phenolic compounds in teas. *Journal of Chromatography A*, 1424, 1–9.
- Prior, R.L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Putnik, P., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Gabrić, D., Shpigelman, A., Cravotto, G., & Bursać Kovačević, D. (2017). An Integrated Approach to Mandarin Processing: Food Safety and Nutritional Quality, Consumer Preference, and Nutrient Bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1345–1358.
- Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F., Cravotto, G., Binello, A., Lorenzo, J., & Shpigelman, A. (2017). Innovative “Green” and Novel Strategies for the Extraction of Bioactive Added Value Compounds from Citrus Wastes—A Review. *Molecules*, 22(5), Article 680.
- Pyo, Y.H., Jin, Y.J., & Hwang, J.Y. (2014). Comparison of the Effects of Blending and Juicing on the Phytochemicals Contents and Antioxidant Capacity of Typical Korean Kernel Fruit Juices. *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(2), 108–114.
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Disponible en <https://www.r-project.org/index.html>. Accedido en Setiembre 9, 2021.
- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., & Ahmad Nayik, G. (2018). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(4), 351–358.
- Randhawa, M. A., Rashid, A., Saeed, M., Javed, M. S., Khan, A. A., & Sajid, M. W. (2014). Characterization of organic acids in juices of some Pakistani citrus species and their retention during refrigerated storage. *J. Anim. Plant Sci.*, 5.
- Rauf, A., Uddin, G., & Ali, J. (2014). Phytochemical analysis and radical scavenging profile of juices of *Citrus sinensis*, *Citrus anrantifolia*, and *Citrus limonum*. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 4(1), 5.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237.
- Regal, P., Lamas, A., Fente, C.A., Franco, C.M., & Cepeda, A. (2020). 6—Analysis and metabolomics of carotenoids. In C.M. Galanakis (Ed.), *Carotenoids: Properties, Processing and Applications* (pp. 189–222). Academic Press.
- Rodriguez-Amaya, D. (2001). Some Physicochemical Properties of Carotenoids. In *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. ILSI Press.
- Rotta, E. M., Rodrigues, C. A., Jardim, I. C. S. F., Maldaner, L., & Visentainer, J. V. (2019). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in passion fruit pulp (*Passiflora* spp.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. *LWT*, 100, 397–403.

- Roussos, P.A., Flessoura, I., Petropoulos, F., Massas, I., Tsafouros, A., Ntanos, E., & Denaxa, N.K. (2019). Soil physicochemical properties, tree nutrient status, physical, organoleptic and phytochemical characteristics and antioxidant capacity of clementine mandarin (*Citrus clementine* cv. SRA63) juice under integrated and organic farming. *Scientia Horticulturae*, 250, 414–420.
- Rubashvili, I., Tsitsagi, M., Ebralidze, K., Tsitsishvili, V., Eprikashvili, L., Chkhaidze, M., & Zautashvili, M. (2018). Extraction and Analysis of the Major Carotenoids of Agro-Industrial Waste Materials Using Sequential Extraction Techniques and High Performance Liquid Chromatography. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 13.
- Ruviaro, A.R., Barbosa, P., Martins, I.M., de Ávila, A.R., Nakajima, V.M., Dos Prazeres, A.R., Macedo, J.A., & Macedo, G.A. (2020). Flavanones biotransformation of citrus by-products improves antioxidant and ACE inhibitory activities in vitro. *Food Bioscience*, 38, Article 100787.
- Safdar, M.N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A.A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 488–500.
- Šafranko, S., Ćorković, I., Jerković, I., Jakovljević, M., Aladić, K., Šubarić, D., & Jokić, S. (2021). Green Extraction Techniques for Obtaining Bioactive Compounds from Mandarin Peel (*Citrus unshiu* var. Kuno): Phytochemical Analysis and Process Optimization. *Foods*, 10(5), Article 1043.
- Saini, A., Panesar, P.S., & Bera, M.B. (2021). Valuation of *Citrus reticulata* (kinnow) peel for the extraction of lutein using ultrasonication technique. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11(5), 2157–2165
- Sammani, M.S., Clavijo, S., González, A., & Cerdà, V. (2019). Development of an on-line lab-on-valve micro-solid phase extraction system coupled to liquid chromatography for the determination of flavonoids in citrus juices. *Analytica Chimica Acta*, 1082, 56–65.
- SANTE/12682/2019. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. Disponible en https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf. Accedido en Setiembre 27, 2021.
- Selvakumar, P., Karthik, V., Kumar, P.S., Asaithambi, P., Kavitha, S., & Sivashanmugam, P. (2021). Enhancement of ultrasound assisted aqueous extraction of polyphenols from waste fruit peel using dimethyl sulfoxide as surfactant: Assessment of kinetic models. *Chemosphere*, 263, Article 128071.
- Sengkhamparn, N., & Phonkerd, N. (2019). Phenolic Compound Extraction from Industrial Tomato Waste by Ultrasound-Assisted Extraction. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 639, Article 012040.
- Sharma, M., & Bhat, R. (2021). Extraction of Carotenoids from Pumpkin Peel and Pulp: Comparison between Innovative Green Extraction Technologies (Ultrasonic and Microwave-Assisted Extractions Using Corn Oil). *Foods*, 10(4), 787.
- Sicari, V., Pellicanò, T.M., Giuffrè, A.M., Zappia, C., & Capocasale, M. (2016). Bioactive compounds and antioxidant activity of citrus juices produced from varieties cultivated in Calabria. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(4), 773–780.

- Singanusong, R., Nipornram, S., Tochampa, W., & Rattanatraiwong, P. (2015). Low Power Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) and Lime (*Citrus aurantifolia*) Peels and the Antioxidant. *Food Analytical Methods*, 8(5), 1112–1123.
- Silva, E.K., Arruda, H.S., Pastore, G.M., Meireles, M.A., & Saldaña, M.D. (2020). Xylooligosaccharides chemical stability after high-intensity ultrasound processing of prebiotic orange juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, Article 104942.
- Silva, P.B., Mendes, L.G., Rehder, A.P., Duarte, C.R., & Barrozo, M.A. (2020). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from acerola waste. *Journal of Food Science and Technology*, 57(12), 4627–4636.
- Singh, V., & Das, C. (2021). Clarification of Citrus fruit (Mosambi) juice by hybrid (Pretreatment and Membrane) process. *Materials Today: Proceedings*, 47, 1384–1388.
- Stinco, C.M., Benítez-González, A.M., Hernanz, D., Vicario, I.M., & Meléndez-Martínez, A.J. (2014). Development and validation of a rapid resolution liquid chromatography method for the screening of dietary plant isoprenoids: Carotenoids, tocopherols and chlorophylls. *Journal of Chromatography A*, 1370, 162–170.
- Su, K., Ee, K. H., Sun, J., Liu, S. Q., Lassabliere, B., Feiter, U., Huang, Y., Goh, R. M. V., Pua, A., & Yu, B. (2021). Simultaneous fractionation of multiple classes of polyphenols from honeybush tea using solid-phase extraction. *International Journal of Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15531>.
- Sun, Y., Liu, D., Chen, J., Ye, X., & Yu, D. (2011). Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- β -carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 243–249.
- Toprakçı, İ., Kurtulbaş, E., Pekel, A.G., & Şahin, S. (2021). Application of D-optimal design for automatic solvent extraction of carotenoid from orange peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(9), e15724.
- Torregrosa. (2005). Determinación de Vitamina C y Carotenoides en Zumos de Frutas y Hortalizas Frescos, Tratados por Calor o por Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- Tounsi, M.S., Wannes, W.A., Ouerghemmi, I., Jegham, S., Njima, Y.B., Hamdaoui, G., Zemni, H., & Marzouk, B. (2011). Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1), 142–151.
- Tsitsagi, M., Ebralidze, K., Chkhaidze, M., Rubashvili, I., & Tsitsishvili, V. (2018). Sequential extraction of bioactive compounds from tangerine (*Citrus Unshiu*) peel. *Annals of Agrarian Science*, 16(2), 236–241.
- Valdramidis, V.P., Cullen, P.J., Tiwari, B.K., & O'Donnell, C. P. (2010). Quantitative modelling approaches for ascorbic acid degradation and non-enzymatic browning of orange juice during ultrasound processing. *Journal of Food Engineering*, 96(3), 449–454.
- Velázquez-Estrada, R.M., Hernández-Herrero, M.M., Guamis-López, B., & Roig-Saguès, A.X. (2019). Influence of ultra-high pressure homogenisation on physicochemical and sensorial properties of orange juice in comparison with conventional thermal processing. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(5), 1858–1864.
- Velisdeh, Z. J., Najafpour, G. D., Mohammadi, M., & Poureini, F. (2021). Optimization of Sequential Microwave-Ultrasound-Assisted Extraction for Maximum Recovery of

- Quercetin and Total Flavonoids from Red Onion (*Allium cepa* L.) Skin Wastes. *ArXiv e-prints*, 2104.06109.
- Villa-Ruano, N., Pérez-Hernández, N., Zepeda-Vallejo, L. G., Quiroz-Acosta, T., Mendieta-Moctezuma, A., Montoya-García, C., García-Nava, M. L., & Becerra-Martínez, E. (2019). 1H-NMR Based Metabolomics Profiling of Citrus Juices Produced in Veracruz, México. *Chemistry & Biodiversity*, 16(5), Article e1800479.
- Waley, Ahmed. S., Shaltout, Omayma. E., Abu – EL Yazeed, Ayman. M., AL-bakry, Azza. A., & Zeitoun, Ahmed. M. (2020). Bioactive Compounds and Physicochemical Properties of Fruit – Orange Juice Mixes with Rosemary Extract. *Alexandria Science Exchange Journal*, 41(2), 141–153.
- Wang, J., Vanga, S. K., & Raghavan, V. (2019). High-intensity ultrasound processing of kiwifruit juice: Effects on the ascorbic acid, total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity. *LWT*, 107, 299–307.
- Wang, J., Wang, J., Ye, J., Vanga, S. K., & Raghavan, V. (2019). Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: Profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity and microstructure. *Food Control*, 96, 128–136.
- Wang, L., Boussetta, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2018). Selectivity of ultrasound-assisted aqueous extraction of valuable compounds from flesh and peel of apple tissues. *LWT*, 93, 511–516.
- Wang, Q., Qin, X., Liang, Z., Li, S., Cai, J., Zhu, Z., & Liu, G. (2018). HPLC–DAD–ESI–MS2 analysis of phytochemicals from Sichuan red orange peel using ultrasound-assisted extraction. *Food Bioscience*, 25, 15–20.
- Wang, Q., Zheng, Y., Yu, Y., Gao, H., Lai, C., Luo, X., & Huang, X. (2019). Effects of cross-pollination by ‘Murcott’ tangor on the physicochemical properties, bioactive compounds and antioxidant capacities of ‘Qicheng 52’ navel orange. *Food Chemistry*, 270, 476–480.
- Wang, S., Yang, C., Tu, H., Zhou, J., Liu, X., Cheng, Y., Luo, J., Deng, X., Zhang, H., & Xu, J. (2017). Characterization and Metabolic Diversity of Flavonoids in Citrus Species. *Scientific Reports*, 7(1), 10549.
- Wang, Y.C., Chuang, Y.C., & Hsu, H.W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 106(1), 277–284.
- WATERS. (2015). DisQuE QuEChERS sample preparation products and kits. Waters Corporation, 6.
- Wei, T., Simko, V., Levy, M., Xie, Y., Jin, Y., Zemla, J., Freidank, M., Cai, J., & Protivinsky, T. (2021). corrplot: Visualization of a Correlation Matrix (0.90) [Computer software]. Disponible en <https://CRAN.R-project.org/package=corrplot>. Accedido en Setiembre 13, 2021.
- Wickham, H. (2016). *Ggplot2. Elegant Graphics for Data Analysis*. (2nd ed.). Springer International Publishing.
- Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y., & Shi, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106(2), 545–551.
- Xu, M., Ran, L., Chen, N., Fan, X., Ren, D., & Yi, L. (2019). Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent. *Food Chemistry*, 297, Article 124970.

- Yadav, V., Shrivastava, P., Deshmukh, Y., Shanker, K., & Khare, P. (2016). Evaluation of solid phase extraction efficiency of functionalized biochar for polyphenols from *Punica granatum*. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 11(2), 200–208.
- Yan, L., Fernando, W. M. A. D. B., Brennan, M., Brennan, C. S., Jayasena, V., & Coorey, R. (2016). Effect of extraction method and ripening stage on banana peel pigments. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(6), 1449–1456.
- Yaqoob, M., Aggarwal, P., & Babbar, N. (2022). Extraction and screening of kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel phytochemicals, grown in Punjab, India. *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- Yildiz, G. (2019). Application of ultrasound and high-pressure homogenization against high temperature-short time in peach juice. *Journal of Food Process Engineering*, 42(3), Article e12997.
- Yildiz, G., & Feng, H. (2019). Sonication of cherry juice: comparison of different sonication times on color, antioxidant activity, total phenolic and ascorbic acid content. *Latin American Applied Research - An International Journal*, 49(4), 255–260.
- Yıkıms, S. (2020). Sensory, physicochemical, microbiological and bioactive properties of red watermelon juice and yellow watermelon juice after ultrasound treatment. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(3), 1417–1426.
- Yoo, K.M., & Moon, B.K. (2016). Comparative carotenoid compositions during maturation and their antioxidative capacities of three citrus varieties. *Food Chemistry*, 196, 544–549.
- Zhang, H., Yang, Y., & Zhou, Z. (2018). Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(1), 256–263.
- Zhang, L., Wang, S., Yang, R., Mao, J., Jiang, J., Wang, X., Zhang, W., Zhang, Q., & Li, P. (2019). Simultaneous determination of tocopherols, carotenoids and phytosterols in edible vegetable oil by ultrasound-assisted saponification, LLE and LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 289, 313–319.
- Zhang, Q.A., Shen, Y., Fan, X.H., Yan, Y.Y., & García Martín, J. F. (2016). Online monitoring of electrical conductivity of wine induced by ultrasound. *CyTA - Journal of Food*, 14(3), 496–501.
- Zhao, X.J., Chen, D., Kilmartin, P.A., & Jiao, B.N. (2019). Simultaneous Determination of Phenolics and Polymethoxylated Flavones in Citrus Fruits by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled with Triple-Quadrupole Mass Spectrometry (UHPLC-QqQ-MS). *Analytical Letters*, 52(12), 1926–1938.
- Zhou, J.Y., Sun, C.D., Zhang, L.L., Dai, X., Xu, C.J., & Chen, K.S. (2010). Preferential accumulation of orange-colored carotenoids in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit peel following postharvest application of ethylene or ethephon. *Scientia Horticulturae*, 126(2), 229–235.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316.

ANEXOS

ANEXO I. Análisis multifactorial de zumos de mandarinas híbridas.

- Análisis de varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **Compuestos Fenólicos Totales**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	p
A: Campaña	502,903	1	502,903	1,263	0,263
B: Variedad	10081,255	2	5040,627	12,656	0,000
C: Recolección	0,794	1	0,794	0,002	0,964
Interacciones					
AB	559,896	2	279,948	0,703	0,497
AC	0,006	1	0,006	0,000	0,997
BC	160,284	1	160,284	0,402	0,527
ABC	356,849	1	356,849	0,896	0,346
Residual	2002551,710	143			
Total (corregido)	72144,325	142			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

- Análisis de varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **Flavonoides Totales**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	p
A: Campaña	42.665	1	42.665	10.069	0.002
B: Variedad	246.434	2	123.217	29.079	0.000
C: Recolección	58.198	1	58.198	13.735	0.000
Interacciones					
AB	23.679	2	11.840	2.794	0.065
AC	3.940	1	3.940	0.930	0.337
BC	16.074	1	16.074	3.793	0.054
ABC	12.147	1	12.147	0.267	0.606
Residual	17860.126	143			
Total (corregido)	1768.001	142			

Todas las razones F se basan en el cuadrado medio del error residual.

- Análisis de varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **Ácido Ascórbico**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	<i>p</i>
A: Campaña	541,163	1	541,163	11,902	0,001
B: Variedad	8012,727	2	4006,363	88,113	0,000
C: Recolección	320,763	1	320,763	7,055	0,009
Interacciones					
AB	423,777	2	211,889	4,660	0,011
AC	48,598	1	48,598	1,069	0,303
BC	15,785	1	15,785	0,347	0,557
ABC	12,147	1	12,147	0,267	0,606
Residual	144356,777	143			
Total (corregido)	26459,279	142			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

- Análisis de varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **Carotenoides Totales**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	<i>p</i>
A: Campaña	16550458.31	1	16550458.31	275.69	0.000
B: Variedad	629306.848	2	314653.424	5.241	0.006
C: Recolección	1643980.433	1	1643980.433	27.385	0.000
Interacciones					
AB	847823.621	2	423911.811	7.061	0.001
AC	81499.523	1	81499.523	1.358	0.246
BC	1155.243	1	1155.243	0.019	0.890
ABC	212167.774	1	212167.774	3.534	0.062
Residual	89885936.22	143			
Total (corregido)	32157649.96	142			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

ANEXO II. Análisis multifactorial de extractos, obtenidos por ultrasonidos, de piel de mandarinas híbridas.

- Análisis de varianza para los valores de Conductividad

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	p
A: Variedad	0,325183	2	0,162592	19,83	0,000
B: Tiempo (min)	0,506241	2	0,25312	30,86	0,000
Interacciones					
AB	0,00897669	4	0,00224417	0,27	0,895
Residual	2,09128	255	0,00820111		
Total (corregido)	2,94439	263			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

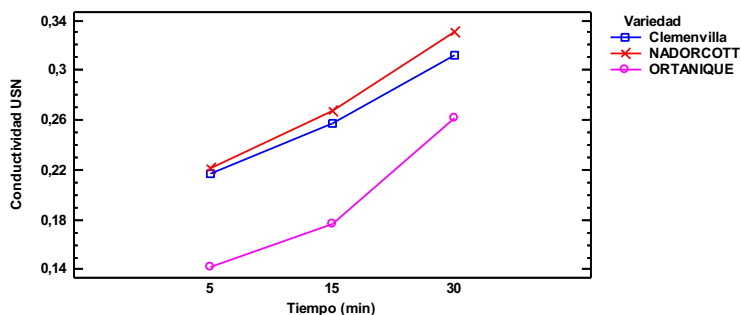
Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Variedad	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Clemenvilla	105	0,262097	0,00883775	X
Nadorcott	66	0,273134	0,0111472	X
Ortanique	93	0,193444	0,00939063	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Clemenvilla - Nadorcott		-0,0110369	0,0336233
Clemenvilla - Ortanique	*	0,0686531	0,0304793
Nadorcott - Ortanique	*	0,07969	0,0344503

* indica una diferencia significativa.

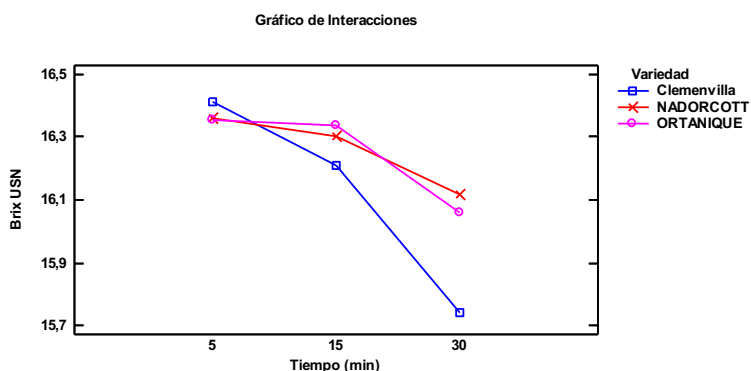
Gráfico de Interacciones



- Análisis de varianza para los valores de °Brix: sólidos solubles totales

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	p
A: Variedad	1,1241	2	0,56205	1,80	0,167
B: Tiempo (min)	7,42553	2	3,71276	11,92	0,000
Interacciones					
AB	1,7103	4	0,427574	1,37	0,244
Residual	79,4426	255	0,31154		
Total (corregido)	91,0925	263			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.



- Análisis de varianza para los valores de pH

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	p
A: Variedad	9,03634	2	4,51817	80,92	0,0000
B: Tiempo (min)	0,23855	2	0,119275	2,14	0,1202
Interacciones					
AB	0,103325	4	0,0258312	0,46	0,7631
Residual	14,2377	255	0,0558342		
Total (corregido)	23,6136	263			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Variedad</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Clemenvilla	93	5,72554	0,0245024	X
Nadorcott	105	5,97133	0,0230598	X
Ortanique	66	6,20568	0,0290856	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Clemenvilla - Nadorcott	*	-0,234348	0,0877311
Clemenvilla - Ortanique	*	0,245796	0,0795277
Nadorcott - Ortanique	*	0,480144	0,0898891

* indica una diferencia significativa.

- Análisis de varianza para los valores de **Fenoles Solubles Totales**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	p
A: Variedad	3,74785E6	2	1,87392E6	39,67	0,0000
B: Tiempo (min)	6,48E6	2	3,24E6	68,59	0,0000
Interacciones					
AB	126611,	4	31652,8	0,67	0,6133
Residual	1,2046E7	255	47239,2		
Total (corregido)	2,28675E7	263			

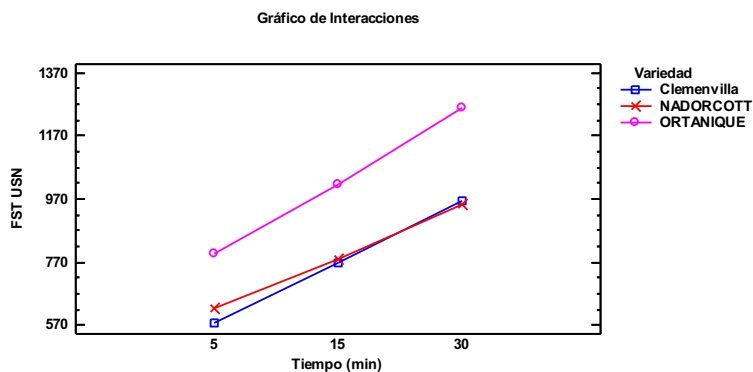
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Variedad</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Clemenvilla	105	769,232	21,2108	X
Nadorcott	66	785,766	26,7534	X
Ortanique	93	1024,68	22,5377	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Clemenvilla - Nadorcott		-16,5337	80,6965
Clemenvilla - Ortanique	*	-255,445	73,1509
Nadorcott - Ortanique	*	-238,912	82,6815

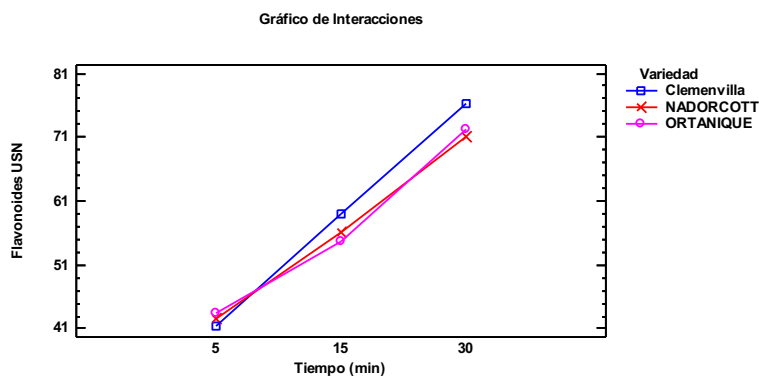
* indica una diferencia significativa.



- Análisis de varianza para los valores de **Flavonoides Totales**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	<i>p</i>
A: Variedad	291,331	2	145,666	0,48	0,6170
B: Tiempo (min)	40088,7	2	20044,3	66,57	0,0000
Interacciones					
AB	546,934	4	136,733	0,45	0,7694
Residual	76782,9	255	301,109		
Total (corregido)	120386,	263			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.



- Análisis de varianza para los valores de **Ácido Ascórbico**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	p
A: Variedad	86961,8	2	43480,9	23,38	0,0000
B: Tiempo (min)	23178,5	2	11589,3	6,23	0,0023
Interacciones					
AB	3645,39	4	911,349	0,49	0,7431
Residual	474269,	255	1859,88		
Total (corregido)	591137,	263			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

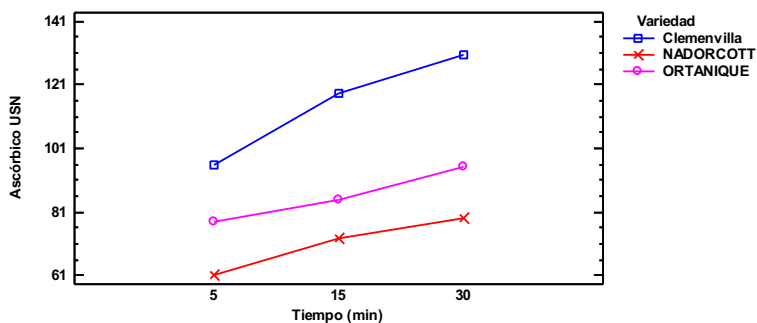
Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Variedad	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Clemenvilla	105	114,947	4,2087	X
Nadorcott	66	70,9831	5,30848	X
Ortanique	93	86,0074	4,47199	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Clemenvilla - Nadorcott	*	43,9637	16,012
Clemenvilla - Ortanique	*	28,9394	14,5148
Nadorcott - Ortanique		-15,0243	16,4059

* indica una diferencia significativa.

Gráfico de Interacciones



- Análisis de varianza para los valores de **Carotenoides Totales**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	p
A: Variedad	1,25619E8	2	6,28096E7	12,21	0,0000
B: Tiempo (min)	4,43952E8	2	2,21976E8	43,16	0,0000
Interacciones					
AB	3,70889E7	4	9,27222E6	1,80	0,1294
Residual	1,0954E9	213	5,14272E6		
Total (corregido)	1,68207E9	221			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

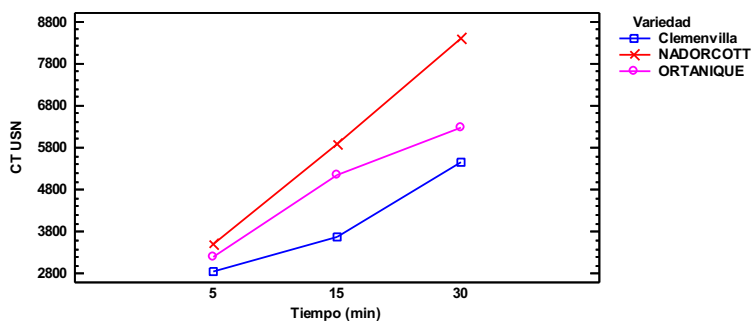
Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Variedad	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Clemenvilla	93	4000,58	235,393	X
Nadorcott	52	5926,98	314,596	X
Ortanique	77	4891,75	259,174	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Clemenvilla - Nadorcott	*	-1926,4	928,683
Clemenvilla - Ortanique	*	-891,162	827,529
Nadorcott - Ortanique	*	1035,23	963,409

* indica una diferencia significativa.

Gráfico de Interacciones



- Análisis de varianza para los valores de DPPH

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	p
A: Variedad	1033,12	2	516,561	61,82	0,0000
B: Tiempo (min)	715,647	2	357,823	42,83	0,0000
Interacciones					
AB	33,0357	4	8,25893	0,99	0,4144
Residual	2130,63	255	8,3554		
Total (corregido)	3978,32	263			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

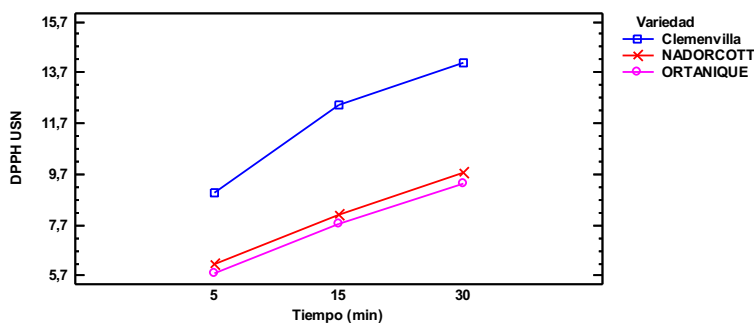
Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Variedad	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Clemenvilla	105	11,8229	0,282091	X
Nadorcott	66	8,02055	0,355805	X
Ortanique	93	7,63069	0,299738	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Clemenvilla - Nadorcott	*	3,80237	1,07322
Clemenvilla - Ortanique	*	4,19222	0,972864
Nadorcott - Ortanique		0,389859	1,09962

* indica una diferencia significativa.

Gráfico de Interacciones



- Análisis de varianza para los valores de **TEAC**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	p
A: Variedad	412,767	2	206,384	6,17	0,0024
B: Tiempo (min)	3055,0	2	1527,5	45,64	0,0000
Interacciones					
AB	70,6182	4	17,6546	0,53	0,7156
Residual	8534,42	255	33,4683		
Total (corregido)	12374,8	263			

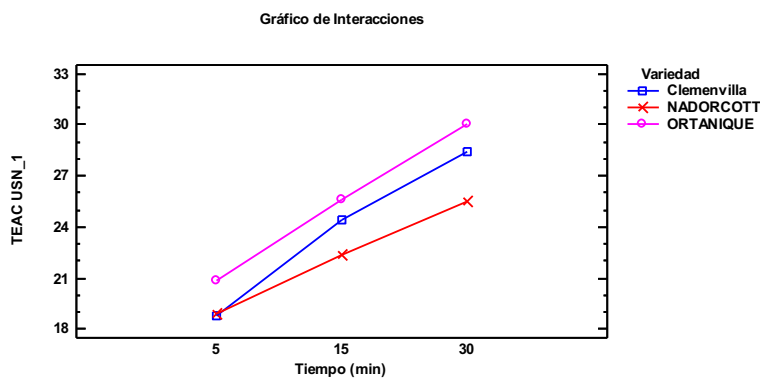
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Variedad	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Clemenvilla	105	23,893	0,564576	XX
Nadorcott	66	22,2607	0,712107	X
Ortanique	93	25,5123	0,599895	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Clemenvilla - Nadorcott		1,63234	2,14793
Clemenvilla - Ortanique		-1,61933	1,94709
Nadorcott - Ortanique	*	-3,25167	2,20077

* indica una diferencia significativa.



ANEXO III. Regresión múltiple para determinar la influencia de los compuestos bioactivos en la capacidad antioxidante de los extractos, obtenidos por ultrasonidos, de piel de mandarinas híbridas.

- Regresión múltiple – DPPH

Variable dependiente: DPPH

Variables independientes:

- FST
- FT
- AA
- CT

Selección de la Variable: Col_7=1

		<i>Error</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimación</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	0,242185	0,0925709	2,61622	0,0092
FT	0,00776111	0,00154106	5,0362	0,0000
AA	0,00437083	0,000613241	7,12744	0,0000
CT	-0,0000259485	0,0000114869	-2,25897	0,0244

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	30,6192	3	10,2064	30,82	0,0000
Residuo	140,416	424	0,33117		
Total (Corr.)	171,035	427			

R-cuadrada = 17,9023 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 17,3214 por ciento

Error estándar del est. = 0,575473

Error absoluto medio = 0,23242

Estadístico Durbin-Watson = 0,938055 (P=0,0000)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,530716

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre DPPH y 4 variables independientes. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{DPPH} = 0,242185 + 0,00776111 \cdot \text{Flavonoides} + 0,00437083 \cdot \text{Ascórbico} - 0,0000259485 \cdot \text{CT}$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95,0%.

- **Regresión múltiple – TEAC**

Variable dependiente: TEAC

Variables independientes:

- FST
- FT
- AA
- CT

Selección de la Variable: Col_7=1

		<i>Error</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimación</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	544,699	81,8753	6,65279	0,0000
FST	1,18968	0,0898519	13,2405	0,0000
FT	9,38555	1,33837	7,01269	0,0000
AA	3,53505	0,488861	7,2312	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1,2047E8	3	4,01566E7	194,26	0,0000
Residuo	8,76466E7	424	206714,		
Total (Corr.)	2,08116E8	427			

R-cuadrada = 57,8858 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 57,5878 por ciento

Error estándar del est. = 454,658

Error absoluto medio = 350,337

Estadístico Durbin-Watson = 0,816421 (P=0,0000)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,587714

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre TEAC y 4 variables independientes. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{TEAC} = 544,699 + 1,18968 \cdot \text{FST} + 9,38555 \cdot \text{Flavonoides} + 3,53505 \cdot \text{Ascórbico}$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95,0%.

ANEXO IV. Coeficientes de correlación del contenido de compuestos fenólicos en piel de mandarinas híbridas.

Variable	<i>M</i>	<i>DE</i>	1	2	3	4	5
1. Ácido 4-hidroxibenzoico	3.40	3.72					
2. Ácido vanílico	1.30	0.98	-0.11 [-0.32, 0.12]				
3. Ácido ferúlico	2.58	2.00	-.31** [-0.50, -0.09]	-0.16 [-0.37, 0.07]			
4. Rutina	7.62	3.76	0.11 [-0.11, 0.33]	-0.43** [-0.60, -0.23]	0.04 [-0.18, 0.27]		
5. Naringina	1.44	0.83	0.13 [-0.10, 0.34]	-0.37** [-0.55, -0.15]	0.03 [-0.19, 0.26]	0.35** [0.14, 0.54]	
6. Apigenina	0.01	0.01	-0.13 [-0.34, 0.10]	-0.36** [-0.54, -0.14]	-0.08 [-0.30, 0.15]	0.01 [-0.21, 0.24]	0.04 [-0.19, 0.26]
7. Hesperitina	0.96	0.76	0.15 [-0.07, 0.37]	-0.44** [-0.61, -0.24]	0.09 [-0.14, 0.31]	0.12 [-0.11, 0.34]	0.21 [-0.01, 0.42]
8. Catequina	0.00	0.01	-0.08 [-0.30, 0.15]	-0.03 [-0.26, 0.19]	-0.00 [-0.23, 0.22]	-0.06 [-0.28, 0.17]	0.04 [-0.18, 0.27]
9. Ácido clorogénico	0.71	0.40	-0.03 [-0.26, 0.19]	-0.40** [-0.57, -0.19]	-0.01 [-0.23, 0.22]	0.26* [0.03, 0.46]	0.28* [0.06, 0.47]

Variable	<i>M</i>	<i>DE</i>	6	7	8	9	10
1. Ácido 4-hidroxibenzoico	3.40	3.72					
2. Ácido vanílico	1.30	0.98					
3. Ácido ferúlico	2.58	2.00					
4. Rutina	7.62	3.76					
5. Naringina	1.44	0.83					
6. Apigenina	0.01	0.01					
7. Hesperitina	0.96	0.76	.40**				
			[.19, .58]				
8. Catequina	0.00	0.01	.16	-.06			
			[-.07, .37]	[-.28, .17]			
9. Ácido clorogénico	0.71	0.40	.22	.01	.18		
			[-.00, .43]	[-.22, .23]	[-.05, .39]		

Variable	<i>M</i>	<i>DE</i>	1	2	3	4	5
10. Ácido cafeico	0.94	0.75	.15 [-.08, .36]	.13 [-.10, .34]	-.31** [-.50, -.09]	-.03 [-.26, .20]	-.08 [-.30, .14]
11. Quercitina	1.26	0.43	.27* [.05, .47]	-.39** [-.56, -.18]	.07 [-.16, .29]	.41** [.21, .58]	.32** [.10, .50]
12. Narirutina	17.52	12.69	-.44** [-.60, -.24]	-.25* [-.45, -.03]	.50** [.31, .65]	.03 [-.20, .25]	-.17 [-.38, .06]
13. Hesperidina	51.98	15.67	.19 [-.04, .39]	-.50** [-.65, -.31]	.29* [.07, .48]	.22 [-.00, .43]	.33** [.11, .52]
14. Ácido <i>trans</i> -cinámico	1.37	1.32	.24* [.02, .44]	.06 [-.17, .28]	.03 [-.20, .25]	.05 [-.18, .27]	.09 [-.14, .31]
15. Naringenina	0.06	0.04	-.32** [-.51, -.10]	-.18 [-.39, .04]	.04 [-.19, .26]	.25* [.03, .45]	-.20 [-.41, .02]
16. Kaempferol	0.23	0.13	-.19 [-.40, .03]	-.38** [-.56, -.17]	.40** [.19, .58]	.06 [-.16, .28]	.16 [-.07, .37]
17. Ácido <i>p</i> -cumárico	1.73	1.05	.26* [.03, .46]	.01 [-.22, .24]	.10 [-.13, .32]	.12 [-.11, .33]	.22 [-.01, .42]

Variable	<i>M</i>	<i>DE</i>	6	7	8	9	10
10. Ácido cafeico	0.94	0.75	-.28* [-.47, -.06]	-.13 [-.35, .10]	-.04 [-.27, .18]	.08 [-.15, .30]	
11. Quercitina	1.26	0.43	.12 [-.11, .34]	.77** [.66, .85]	-.15 [-.36, .08]	-.11 [-.33, .11]	-.14 [-.35, .09]
12. Narirutina	17.52	12.69	.22 [-.01, .42]	-.10 [-.32, .13]	.16 [-.06, .38]	.48** [.28, .63]	-.23* [-.43, -.00]
13. Hesperidina	51.98	15.67	.36** [.15, .54]	.50** [.30, .65]	.03 [-.20, .25]	.11 [-.11, .33]	-.41** [-.58, -.21]
14. Ácido <i>trans</i> -cinámico	1.37	1.32	-.20 [-.41, .03]	.08 [-.15, .30]	-.11 [-.33, .12]	-.09 [-.31, .13]	.07 [-.16, .29]
15. Naringenina	0.06	0.04	.19 [-.04, .40]	-.04 [-.26, .19]	.08 [-.15, .30]	.23* [.01, .43]	-.11 [-.33, .11]
16. Kaempferol	0.23	0.13	.31** [.09, .50]	.56** [.38, .70]	.05 [-.17, .28]	.22 [-.01, .42]	-.19 [-.40, .04]
17. Ácido <i>p</i> -cumárico	1.73	1.05	-.15 [-.36, .08]	.13 [-.10, .34]	-.03 [-.25, .20]	-.10 [-.32, .13]	-.04 [-.26, .19]

Variable	M	DE	11	12	13	14	15	16
10. Ácido cafeico	0.94	0.75						
11. Quercitina	1.26	0.43						
12. Narirutina	17.52	12.69	-.24*					
			[-.44, -.01]					
13. Hesperidina	51.98	15.67	.52**	.22				
			[.34, .67]	[-.00, .43]				
14. Ácido <i>trans</i> -cinámico	1.37	1.32	.20	-.17	-.03			
			[-.03, .40]	[-.38, .06]	[-.26, .19]			
15. Naringenina	0.06	0.04	-.08	.46**	-.10	-.14		
			[-.30, .14]	[.26, .62]	[-.31, .13]	[-.36, .08]		
16. Kaempferol	0.23	0.13	.40**	.36**	.42**	.13	.08	
			[.19, .57]	[.15, .54]	[.21, .59]	[-.09, .35]	[-.15, .30]	
17. Ácido <i>p</i> -cumárico	1.73	1.05	.31**	-.19	.13	.75**	-.14	.08
			[.09, .50]	[-.39, .04]	[-.10, .35]	[.63, .83]	[-.35, .09]	[-.15, .30]

M: media; DS: desviación estándar.

+ Los valores entre corchetes indican un intervalo de confianza del 95% para cada correlación.

* indica $p < 0,05$.

** indica $p < 0,01$.

ANEXO V. Publicaciones en revistas.



Review

High Biological Value Compounds Extraction from Citrus Waste with Non-Conventional Methods

Mayra Anticona, Jesus Blesa , Ana Frigola and Maria Jose Esteve * 

Nutrition and Food Chemistry, University of Valencia, Avda., Vicent Andrés Estellés, s/n., 46100 Burjassot, Spain; Mayra.Anticona@ext.uv.es (M.A.); Jesus.blesa@uv.es (J.B.); ana.frigola@uv.es (A.F.)

* Correspondence: maria.jose.esteve@uv.es; Tel.: +34-963544913

Received: 27 April 2020; Accepted: 15 June 2020; Published: 20 June 2020



Abstract: Citrus fruits are extensively grown and much consumed around the world. Eighteen percent of total citrus cultivars are destined for industrial processes, and as a consequence, large amounts of waste are generated. Citrus waste is a potential source of high biological value compounds, which can be used in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries but whose final disposal may pose a problem due to economic and environmental factors. At the same time, the emerging need to reduce the environmental impact of citrus waste and its responsible management has increased. For these reasons, the study of the use of non-conventional methods to extract high biological value compounds such as carotenoids, polyphenols, essential oils, and pectins from this type of waste has become more urgent in recent years. In this review, the effectiveness of technologies such as ultrasound assisted extraction, microwave assisted extraction, supercritical fluid extraction, pressurized water extraction, pulsed electric field, high-voltage electric discharges, and high hydrostatic pressures is described and assessed. A wide range of information concerning the principal non-conventional methods employed to obtain high-biological-value compounds from citrus waste as well as the most influencing factors about each technology are considered.

Keywords: citrus waste; high-biological-value compounds; extraction; non-conventional methods

1. Introduction

Citrus fruits, which belong to the Rutaceas family, are among the most commonly grown and consumed fruits around the world [1]; the production of citrus fruits in 2015 was more than 130 million tons [2]. Among these are mainly oranges, mandarins, limes, lemons, and grapefruits [3], and citron and bergamot are also grown [4]. Of the total citrus fruits grown worldwide, 18% are destined for industrial processes [2], mainly for the production of juice [5]. However, the creation of industrialized citrus products generates large amounts of waste (peel, pulp, and seed residues), between 50% and 70% of the total citrus fruit is destined for this activity [5–7]. Approximately 15–25 thousand tons of citrus waste is produced annually, which is a potential source for various beneficial uses [8]. On the other hand, the final disposal of citrus waste generates pollution problems [5], especially in developing countries, and its management has a high cost in economic and environmental terms [5,9,10]. The high level of pollution of citrus waste is due to its easy fermentability [11], as citrus waste is bulky, heterogeneous, chemically complex, and highly biodegradable, with a high chemical oxygen demand (for example, 1085 mg of O₂/g in the case of orange peel) [12]. Among other characteristics, these wastes have a low pH (3–4), and a high content of water (80–90%) and organic matter (95% of total solids) [13]. Directive (EU) 2018/851 [14] of the European Parliament and of the Council states that for citrus residues, like any other type of food waste, recovery and adequate management and/or safe disposal must be guaranteed due to their biodegradable characteristics. These regulations were established in order to protect human health and reduce environmental and economic concerns about the high cost of disposal [15].



Contents lists available at ScienceDirect

Food Bioscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fbio



Effects of ultrasound-assisted extraction on physicochemical properties, bioactive compounds, and antioxidant capacity for the valorization of hybrid Mandarin peels

Mayra Anticona^a, Jesus Blesa^{a,*}, Daniel Lopez-Malo^b, Ana Frigola^a, Maria Jose Esteve^a

^a Nutrition and Food Chemistry, University of Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés, S/n, 46100, Burjassot (Valencia), Spain

^b Department of Biomedical Sciences, European University of Valencia, Paseo de La Alameda, 7, 46010, Valencia (Valencia), Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Mandarin peel
Ultrasound assisted extraction
Bioactive compounds
Antioxidant capacity
Extraction index

ABSTRACT

Samples of tree hybrid mandarins ('Clemenvilla', 'Ortanique' and 'Nadorcott') were employed to determine the physicochemical properties (increase of conductivity, brix° and pH), bioactive compounds (total phenolic, flavonoid, ascorbic acid and carotenoids content) and antioxidant capacity (DPPH and TEAC) of peels. Mandarin peel extracts were prepared employing ultrasound assisted extraction (400 W, 80% v/v duty cycle, 40 °C). The results were compared to the values of control extraction method. Aqueous ethanol solution (50%, v/v) was used as solvent in solid-liquid ratio of 1:10 (w/v). A 5, 15 and 30 min were applied in both methods to establish the most effective extraction time. The increase of conductivity enhances with the extraction during 30 min. No significant differences were observed in °Brix values; in case of pH, these differences were observed according to the varieties analyzed. The total phenolics, flavonoids, carotenoids and ascorbic acid content enhance as the extraction time increased until 30 min with significant differences according to the mandarin variety. 'Clemenvilla' peels treated by 30 min had the highest amounts of total flavonoids (76.7 mg CE/100g) and ascorbic acid content (136 mg AA/100g). 'Ortanique' and 'Nadorcott' peels had the highest values of total phenolic content (1230 GAE/100g) and total carotenoids (8173 µg β-carotene/100g), respectively. Antioxidant capacity values were stronger influenced by flavonoids and ascorbic acid content in both assays applied (DPPH and TEAC). Results indicated that 'Clemenvilla' and 'Ortanique' peel extracts by USN were the samples with highest values by DPPH and TEAC assays respectively (average of 12.2 and 25.7 mmol TE/100g, respectively).

1. Introduction

Citrus crops are one of the most cultivated and consumed fruits worldwide. In 2016, Spain was the fifth largest producer of citrus fruits in the world, after China, Brazil, India and United States respectively (FAO, 2017). After orange, mandarins (*Citrus reticulata*) are one of the most citrus crops cultivated worldwide, representing the 22% of world's citrus production (FAO, 2017) and, are a major citrus fruit produced in Spain with an annual production of over 2,408,753 tons in 2018–2019. In this season, the 39.6% of the total citrus production of mandarins in Spain were harvested in the province of Valencia (Generalitat Valenciana, 2019).

The structure of a citrus fruit is similar between its varieties, differing in size and color. Citrus fruits are mainly used in the production of juice and 45–60% of the total weight is eliminated as waste (Putnik, Barba,

Lorenzo, Gabrić, Shpigelman, Cravotto, & Bursać Kovačević, 2017). Citrus peel (flavedo and albedo) is the principal component of waste and constitutes a rich source of natural antioxidants (carotenoids, polyphenols, essential oils, pectin, among other compounds) (Putnik et al., 2017a; Rafiq et al., 2018; Ruviano et al., 2020). The typical orange-yellow color of citrus peels is caused by the degradation of the green chlorophyll and the formation of the characteristic yellowish-red color (conversion of β,ε-carotenoid to β,β-carotenoid in flavedos), and it is caused by the ripening (Putnik, Bursać Kovačević, Režek Jambrak, Barba, Cravotto, Binello et al., 2017).

For more than 20 years, the presence of bioactive compounds in citrus residues such as mandarins has been investigated. However, their use and exploitation has increased in recent years since they could be used as a cheaper source for obtaining this type of compounds. For example, to obtain natural food colorants, because these are preferred

* Corresponding author.

E-mail address: jesus.blesa@uv.es (J. Blesa).

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101185>

Received 15 April 2021; Received in revised form 2 June 2021; Accepted 3 June 2021

Available online 12 June 2021

2212-4292/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).