

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



**EXTRACTOS DE NARANJA (*Citrus sinensis*) Y SUS
SUBPRODUCTOS, SOMETIDOS A DIGESTIÓN *IN VITRO*: PERFIL
ANTIOXIDANTE Y POTENCIAL ANTIHIPERTENSIVO, POR LA
INHIBICIÓN *IN VITRO* DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE
ANGIOTENSINA**

POR:

L.C.A KAREN ITZEL AMAYA BARBOSA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

MARZO 2022



Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Salud Pública y Nutrición
Maestría en Ciencias en Nutrición



Tesis

Extractos de naranja (*Citrus sinensis*) y sus subproductos, sometidos a digestión *in vitro*: perfil antioxidante y potencial antihipertensivo, por la inhibición *in vitro* de la enzima convertidora de angiotensina

Por:

L.C.A Karen Itzel Amaya Barbosa

Director de tesis

Dra. Blanca Edelia González Martínez

Codirector de tesis:

MC. Abad Arturo López Hernández

Monterrey, Nuevo León

Marzo, 2022

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El Comité de Evaluación de Tesis APROBÓ la tesis titulada: Extractos de naranja (*Citrus sinensis*) y sus subproductos, sometidos a digestión *in vitro*: perfil antioxidante y potencial antihipertensivo, por la inhibición *in vitro* de la enzima convertidora de angiotensina.

Monterrey, Nuevo León a 6 de enero de 2022

Dr. Manuel López Cabanillas Lomelí
Presidente

Dra. Blanca Edelia González Martínez
Secretario

MCN Abad Arturo López Hernández
Vocal

**Extractos de naranja (*Citrus sinensis*) y sus subproductos,
sometidos a digestión *in vitro*: perfil antioxidante y potencial
antihipertensivo, por la inhibición *in vitro* de la enzima
convertidora de angiotensina**

Aprobación de tesis

Dra. Blanca Edelia González Martínez
Presidente

Dr. Manuel López Cabanillas Lomelí
Secretario

MC. Abad Arturo López Hernández
Vocal

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada durante el programa de posgrado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Salud Pública y Nutrición por haberme facilitado sus instalaciones.

A la Dra. Blanca Edelia González Martínez y al M.C. Abad Arturo López Hernández por su guía, mentoría y respaldo durante todo este tiempo.

A mis padres y hermanas por todo su apoyo incondicional y por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo.

A Dios por brindarme salud, fortaleza y capacidad.

Tabla de contenido

Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes.....	6
2.1 Presión arterial	6
2.1.1 Regulación de la presión arterial	6
2.2 Hipertensión	7
2.2.1 Causas de la hipertensión	8
2.2.2 La hipertensión en cifras.....	9
2.2.3 Manejo de la hipertensión.....	10
2.3 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	10
2.3.1 Inhibidores de la enzima angiotensina (IECA)	11
2.3.2 Inhibidores de la ECA como reguladores de HTA	12
2.4 Radicales libre y estrés oxidativo	14
2.5 Sistema antioxidante	15
2.5.1 Vitamina C	15
2.5.1.1 Vitamina C como agente antihipertensivo.....	17
2.5.2 Técnicas de análisis de la actividad antioxidante	18
2.5.2.1 DPPH	19
2.5.2.2 FRAP	19
2.6 Compuestos fenólicos	19
2.6.1 Estructura química de los compuestos fenólicos	20
2.6.2 Clasificación de los compuestos fenólicos	21
2.6.3 Compuestos fenólicos como inhibidores naturales de la ECA	23
2.6.4 Extracción de compuestos fenólicos	24
2.7 Bioaccesibilidad de compuestos bioactivos.....	28
2.8 Naranja (<i>Citrus sinensis</i>).....	29
2.8.1 Anatomía de la naranja.....	30
2.8.2 Situación mundial de los cítricos	30
2.8.3 Aplicaciones industriales de la naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	31
2.8.4 Composición nutricional de la naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	32
2.8.5 Naranja (<i>Citrus sinensis</i>) y compuestos fenólicos	34
2.8.6 Propiedades antihipertensivas de la naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	35
3. Hipótesis.....	37
4. Objetivo general	37

4.1 Objetivos específicos.....	37
5. Material y método.....	38
5.1 Diseño del estudio.....	38
5.2. Obtención de las muestras de naranja (<i>Citrus sinensis</i>).....	38
5.3 Obtención de extractos.....	39
5.4 Determinación de vitamina C en extractos de naranja.....	40
5.5 Determinación de actividad antioxidante.....	41
5.6 Análisis de la composición fenólica de los extractos obtenidos.....	42
5.6.1 Determinación de polifenoles totales.....	42
5.6.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC.....	43
5.6.3 Análisis estadístico.....	44
5.7 Bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos.....	44
5.8 Análisis de la capacidad IECA mediante ensayo <i>in vitro</i>	46
5.8.1 Análisis estadístico.....	48
5.9 Implicaciones de bioseguridad.....	48
6. Resultados.....	49
6.1 Métodos de extracción. Pruebas preliminares.....	49
6.2 Rendimiento de los extractos.....	50
6.3 Vitamina C.....	51
6.4 Polifenoles totales.....	56
6.5 Actividad antioxidante.....	58
6.6 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC.....	60
6.7 Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina.....	64
6.8 Correlaciones.....	65
7. Discusión.....	69
7.1 Vitamina C.....	69
7.2 Polifenoles totales.....	72
7.3 Actividad antioxidante.....	75
7.4 Compuestos fenólicos por HPLC.....	80
7.5 Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina.....	83
7.6 Correlaciones de Pearson.....	85
7.7 Planteamientos finales.....	86
8. Conclusiones.....	88
9. Bibliografía.....	89

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Clasificación de compuestos fenólicos	12
2. Clasificación de IECA en base a composición química	21
3. Composición nutrimental de la naranja	33
4. Contenido de polifenoles totales polifenoles totales y actividad antioxidante en muestra de jugo y en los extractos obtenidos por maceración	49
5. Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante en muestra de jugo y en los extractos obtenidos por sonicación	50
6. Rendimiento obtenido en los extractos	50
7. Vitamina C total en extractos de jugo, cáscara y bagazo de naranja antes y después de la digestión <i>in vitro</i>	51
8. Ácido ascórbico en extractos de jugo, cáscara y bagazo de naranja antes y después de la digestión <i>in vitro</i>	53
9. Ácido dehidroascórbico en extractos de jugo, cáscara y bagazo de naranja antes y después de la digestión <i>in vitro</i>	55
10. Polifenoles totales en extractos de jugo, cáscara y bagazo de naranja antes y después de la digestión <i>in vitro</i>	56
11. Actividad antioxidante DPPH en los extractos crudos de cáscara, jugo y bagazo	59
12. Actividad antioxidante DPPH en la fracción bioaccesible de extractos de naranja	59
13. Actividad antioxidante FRAP en extractos de naranja	60
14. Caracterización de compuestos fenólicos en extracto de cáscara de naranja	61
15. Caracterización de compuestos fenólicos en extracto de jugo de naranja	62

16. Caracterización de compuestos fenólicos en extracto de bagazo de naranja	62
17. IC ₅₀ ECA de extractos de naranja	65
18. Correlación de variables de la fracción bioaccesible del extracto de jugo	66
19. Correlación de variables de la fracción bioaccesible del extracto de cáscara	67
20. Correlación de variables de la fracción bioaccesible del extracto de bagazo	68
21. Contenido de AA, ADHA y Vit C total de diferentes variedades de naranja. (literatura consultada)	69
22. Contenido de AA y Vit C total en fracción bioaccesible de muestras de naranja (literatura consultada)	71
23. Literatura consultada del contenido de polifenoles totales en extractos de naranja	72
24. Literatura consultada actividad antioxidante por FRAP en jugo de naranja	78
25. Actividad antioxidante por FRAP en muestras de pulpa de naranja antes y después de la digestión <i>in vitro</i> (literatura consultada)	79
26. Actividad antioxidante por FRAP en muestras de jugo de naranja antes y después de la digestión <i>in vitro</i> (literatura consultada)	79
27. Literatura consultada contenido de hesperidina y narirutina en jugo de naranja.	80
28. Literatura consultada contenido de compuestos fenólicos en cáscara de naranja.	81

Lista de figuras

Figura	Página
1. Variables de la regulación de la presión arterial	7
2. Sintomatología de la hipertensión	8
3. Representación esquemática de los factores causantes de la hipertensión arterial	9
4. Enfoques de tratamientos para la hipertensión	10
5. Efecto de la ECA en el sistema renina angiotensina aldosterona	12
6. Estructura básica de compuesto fenólico.	20
7. Estructura básica del esqueleto flavonólico.	22
8. Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides	23
9. Flavonoides dietéticos protectores contra la hipertensión	24
10. Rango de frecuencia de sonido (incluidos algunos sonidos y procesos naturales) y aplicaciones industriales del ultrasonido	26
11. Ondas de ultrasonido en un medio líquido	27
12. Representación gráfica del colapso de burbujas de cavitación	27
13. Corte transversal de naranja (<i>Citrus sinensis</i>).	30
14. Estructura química de la hesperidina	34
15. Esquema general de trabajo	38
16. Diagrama metodología digestión <i>in vitro</i>	45
17. Porcentajes de bioaccesibilidad de vitamina C total de los extractos de jugo (A), cáscara (B) y bagazo de naranja (C)	52
18. Porcentajes de bioaccesibilidad de ácido ascórbico de los extractos de jugo (A), cáscara (B) y bagazo de naranja (C)	53
19. Porcentajes de bioaccesibilidad de ácido dehidroascórbico de los extractos de jugo (A), cáscara (B) y bagazo de naranja (C)	55
20. Porcentajes de bioaccesibilidad de polifenoles totales de los extractos de jugo (A), cáscara (B) y bagazo de naranja (C)	57
21. Porcentaje de inhibición del radical DPPH	58
22. Porcentajes de actividad antioxidante FRAP en la fracción	

bioaccesible de los extractos de cáscara, bagazo y jugo de naranja	60
23. Porcentaje de bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de los extractos de jugo, cáscara y bagazo.	63
24. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina por extractos de naranja y compuestos fenólicos puros	64

Lista de abreviaturas

2K-1C	2 riñones-1clip
AA	Ácido ascórbico
ACh	Acetilcolina
ADHA	Ácido dehidroascórbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AAPH	diclorhidrato de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) / 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride
Ca ²⁺	Ion calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CaM	Calmodulina citoplasmática
DE	Disfunción endotelial
DPPH	2,2-difenil-1-picrylhydrazyl
EC	Células endoteliales
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDRF	Factores relajantes derivados del endotelio
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ET-1	Endotelina-1
Fe ⁺²	Óxido de hierro (II)
FRAP	Ferric ion reducing antioxidant power
g	Gramo
GAE	Gallic acid equivalent (Equivalente de ácido gálico)
HAT	Hydrogen Atom Transfer
HCl	Ácido clorhídrico
HHL	Hipuril-L-histidil-L-leucina
HTA	Hipertensión arterial

IECA	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina
K ⁺	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
kg	Kilogramo
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
mg	Miligramo
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
MLC	Cadena ligera de la miosina
mm Hg	Milímetros de mercurio
mmol	Milimol
mmol/l	Milimol por litro
Na ⁺	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
Pa	Presión acústica
PAD	Presión arterial diastólica
Ph	Presión hidrostática
PAHO	Organización Panamericana de la Salud
PAS	Presión arterial diastolica
PE	Fenilefrina
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGL ₂	Prostaciclina
RAA	Renina-Angiotensina-Aldosterona
RL	Radicales libres

ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAGARPA	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
SE	Extracción por solvente
SET	Single Electron Transfer
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SNP	Nitroprusiato de sodio
SNP	Nitroprusiato de sodio
TXA2	Tromoboxano A2
UAE	Extracción asistida por ultrasonido
UI	Unidad Internacional
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
VSMC	Células del músculo liso vascular
β	Beta

Resumen

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad que se presenta cuando los niveles de presión arterial aumentan de manera sostenida por arriba de 140/90 mmHg (PAHO/OMS, 2018). Uno de los mecanismos para regular la presión arterial es el sistema renina-angiotensina-aldosterona, en donde es notable que el paso crítico es la conversión de la angiotensina I en angiotensina II por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Tortora & Derrickson, 2013).

Los compuestos fenólicos (CF) como la hesperidina han sido relacionados con efectos benéficos en enfermedades humanas como la HTA debido a su capacidad de inhibir ciertas enzimas y a su actividad antioxidante (Wunpathe et al., 2018). Por lo que el objetivo del presente estudio es evaluar el potencial antihipertensivo, mediante la inhibición *in vitro* de la ECA y el perfil antioxidante, de los extractos obtenidos de diferentes secciones de la naranja (*Citrus sinensis*) sometidos a digestión *in vitro*.

Se obtuvieron tres extractos de diferentes secciones de la naranja: jugo, cáscara y bagazo. A estos se le realizó un proceso de digestión *in vitro* donde las fracciones resultantes fueron evaluadas para determinar el contenido de ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico y vitamina C total, así como la actividad antioxidante por las técnicas DPPH y FRAP, también se identificaron y cuantificaron los CF mayoritarios por HPLC. Finalmente se realizó la determinación de la capacidad de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) de la fracción bioaccesible de los extractos.

Según los resultados, después de la digestión *in vitro* fue el extracto de cáscara de naranja el que presentó mayor porcentaje de bioaccesibilidad de vitamina C total, ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, actividad antioxidante FRAP y DPPH. En la mayoría de los casos el % IECA era mayor en los extractos de jugo, cáscara y bagazo en comparación con CF puros, sin embargo, la mezcla de estos últimos mostró un mayor %IECA que las concentraciones al 75 y 100% de los extractos.

En conclusión, los subproductos de naranja mostraron IECA *in vitro*, señalándolos como componentes de valor agregado por su posible actividad antihipertensiva.

Abstract

Arterial hypertension (HTN) is a disease that occurs when blood pressure levels increase steadily above 140/90 mmHg (PAHO/WHO, 2018). One of the mechanisms to regulate blood pressure is the renin-angiotensin-aldosterone system, where it is notable that the critical step is the conversion of angiotensin I into angiotensin II by the action of angiotensin-converting enzyme (ACE) (Tortora & Derrickson, 2013). Phenolic compounds (CF) such as hesperidin have been related to beneficial effects in human diseases such as hypertension due to their ability to inhibit certain enzymes and their antioxidant activity (Wunpathe et al., 2018). Therefore, the objective of this study is to evaluate the antihypertensive potential, through *in vitro* ACE inhibition and the antioxidant profile, of the extracts obtained from different sections of orange (*Citrus sinensis*) subjected to *in vitro* digestion.

Three extracts were obtained from different sections of the orange: juice, peel and bagasse. An *in vitro* digestion process was carried out on these, where the resulting fractions were evaluated to determine the content of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and total vitamin C, as well as the antioxidant activity by DPPH and FRAP techniques. Major CF by HPLC. Finally, the determination of the inhibition capacity of the angiotensin converting enzyme (ACEI) of the bioaccessible fraction of the extracts was carried out.

According to the results, after *in vitro* digestion, the orange peel extract presented the highest percentage of bioaccessibility of total vitamin C, ascorbic acid, dehydroascorbic acid, FRAP and DPPH antioxidant activity. In most cases, the % ACEI was higher in the extracts of juice, peel and bagasse compared to pure CF, however, the mixture of the latter showed a higher % ACEI than the concentrations at 75 and 100% of the extracts.

In conclusion, orange by-products showed *in vitro* inhibition capacity of the angiotensin converting enzyme, pointing them out as components of added value due to their possible antihypertensive activity.

1. Introducción

La principal causa de defunción en el mundo son las enfermedades cardiovasculares (ECV), las cuales son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. La hipertensión es considerada parte de estos trastornos, debido a que es caracterizada por que los vasos sanguíneos presentan una tensión persistentemente alta. Es considerada al mismo tiempo una enfermedad y un factor de riesgo para el desarrollo de ECV, siendo la causa prevenible más importante de ECV y accidente cerebrovascular del mundo (PHAO/OMS, 2018; OMS,2015).

La hipertensión arterial (HTA) representa uno de los problemas médicos más importantes de la medicina contemporánea y se le ha conocido "la plaga silenciosa del Siglo XXI", debido a que la mayoría de las personas con HTA no muestra ningún síntoma (Martínez & Gort, 2015).

Se han identificado múltiples mecanismos involucrados en su fisiopatología, uno de ellos es la disfunción endotelial (DE), donde varios estudios experimentales y clínicos sugirieron que la DE es consecuencia de la HTA (León, Guerra, Yanes, Calderín & Gutiérrez, 2019). Según León y colaboradores (2019), la DE se caracteriza fundamentalmente por el desequilibrio en la producción de sustancias con acciones vasoconstrictoras y vasodilatadoras, con predominio de las primeras, lo cual lleva a un estado de disfunción hemodinámica de intensidad variable. Generalmente, este desequilibrio se debe a un deterioro en la producción y biodisponibilidad de factores vasodilatadores, principalmente el óxido nítrico (NO).

Actualmente se dispone de una variedad de fármacos, entre ellos los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) que, utilizados de manera adecuada, de acuerdo con las características particulares de cada paciente, logran modificar el curso de la enfermedad. A pesar de la efectividad de los fármacos antihipertensivos modernos, aproximadamente el 70% de los pacientes hipertensos no logran el objetivo terapéutico de la presión arterial <140/90 mmHg con monoterapia; e incluso menos pacientes alcanzarán las nuevas metas terapéuticas recomendadas <130/80 mmHg, utilizando solo un fármaco

antihipertensivo. De manera que cuando los pacientes hipertensos no logran un control adecuado de su presión arterial, las opciones de tratamiento para lograr los objetivos requeridos son aumentar la dosis de monoterapia (que aumenta el riesgo de efectos secundarios) o usar combinaciones de medicamentos con efectos secundarios mínimos (Guerrero-García & Rubio-Guerra, 2018).

De acuerdo con Guerrero, (2009) las alternativas farmacológicas a partir de productos naturales podrían contribuir a reducir el impacto de la hipertensión. Un ejemplo de estos compuestos es la hesperidina, la cual es un flavonoide que se encuentra en altas concentraciones en frutas y cáscaras de una variedad de especies de cítricos entre los que destaca la naranja (*Citrus sinensis*).

La evidencia de los efectos antihipertensivos de los flavonoides de cítricos está respaldada por los resultados de estudios realizados en modelos animales, con flavonoides aislados (Yamamoto, Suzuki & Hase, 2008; Ikemura, Sasaki, Giddings, & Yamamoto, 2012; Wunpathe, Potue, Maneesai, Bunbupha, Prachaney & Kukongviriyapan, 2018) y en humanos tanto con flavonoides aislados como con jugos ricos en flavonoides (Homayouni, Haidari, Hedayati, Zakerkish & Ahmadi, 2018; Morand, Dubray, Milenkovic, Lioger, Martin, Scalbert & Mazur, 2010).

Además, se han encontrado evidencias del efecto que tienen las flavononas puras de la naranja en la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Wunpathe et al., 2018), lo cual puede no solo tener un efecto directo en la reducción de la presión arterial debido a que se bloquea la acción de la angiotensina II, sino que además puede tener un efecto sobre la DE, ya que se potencia el efecto benéfico de la bradicinina, lo cual contrarresta la vasoconstricción. La acción de la hesperidina en la mejora de las funciones endoteliales vasculares ha sido señalada tanto en modelos experimentales como en estudios en humanos (Homayouni, et al., 2018).

Para vincular la acción de compuestos fenólicos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) a un efecto de salud, es conveniente la caracterización de su perfil fenólico (Iglesias et al., 2019). Ya que es importante señalar que ningún alimento contiene una sola clase de polifenoles, y es probable que la naturaleza complementaria y /

o sinérgica de estos compuestos naturales en los alimentos contribuya a su actividad biológica (Oak et al., 2018).

Por lo tanto, solo el perfilado de los jugos de cítricos puede llevar a una menor cuantificación del contenido fenólico real en este tipo de fruta. Ya que de acuerdo con Iglesias y colaboradores (2019) el perfil fenólico de las cáscaras de cítricos difiere de las pulpas y jugos en términos del tipo de compuestos fenólicos, sin embargo, las diferencias en los perfiles fenólicos de los jugos y pulpas de cítricos son principalmente cuantitativas

La fracción no comestible de la naranja actualmente es en su mayoría un residuo que se presenta posterior a la elaboración del jugo, por otro lado, la obtención de un extracto a partir de un producto cítrico permite concentrar los compuestos y metabolitos secundarios que posee. Por esta razón el determinar la capacidad IECA tanto del jugo, como de la cáscara y el bagazo de naranja representaría un nuevo valor agregado del cultivo de naranja además del consumo de esta fruta.

Así mismo se requieren más investigaciones para determinar el papel específico de los compuestos fenólicos en el beneficio a la salud inducido por el consumo de alimentos cítricos. En este sentido los estudios *in vitro* son útiles para caracterizar el mecanismo subyacente, sin embargo, solo la experimentación *in vivo* evaluará la actividad biológica de los productos naturales en un sistema integrado teniendo en cuenta la influencia de las fuerzas mecánicas ejercidas por el flujo sanguíneo, la interacción de la sangre y las células sanguíneas con la pared arterial y también los mecanismos reguladores neurovasculares (Oak et al., 2018).

Por lo tanto, esta investigación dentro de la línea de alimentos funcionales plantea la obtención de tres extractos, provenientes de las diferentes partes de una fruta muy consumida dentro de la población a nivel mundial: la naranja. Con un enfoque en el efecto antihipertensivo. Estos extractos podrían representar un coadyuvante para el manejo de complicaciones cardiovasculares.

2. Antecedentes

2.1 Presión arterial

La presión arterial es la fuerza que la sangre ejerce contra una pared vascular, esta se expresa en mmHg. La medición directa de la presión arterial implica la colocación de un catéter dentro del vaso sanguíneo conectado a un manómetro externo. No obstante, para fines clínicos prácticos, solo se realiza una medición indirecta de la presión arterial sistemática, mediante un esfigmomanómetro conectado a un manguillo inflable que se coloca alrededor del brazo, debido a que la arteria braquial pasa por esta zona y esta arteria está cerca del corazón. Por lo que la presión arterial medida en esta zona es una aproximación a la máxima en cualquier parte del cuerpo (Saladin, 2013; Berenguer & Lázaro, 2016).

La presión arterial se representa como la relación entre la presión la sistólica y la diastólica. Para una persona sana en un rango de edad de 20-30 años esta relación se deber ser 120/75 mmHg (Saladin, 2013).

La presión sistólica es el valor máximo, obtenido cada que el corazón bombea sangre hacia las arterias (contracción ventricular) y la presión diastólica es el valor mínimo, que se presenta cuando él corazón está en reposo entre un latido y otro (relajación ventricular entre latidos) (Saladin, 2013; Berenguer & Lázaro, 2016).

2.1.1 Regulación de la presión arterial

En condiciones normales las variables que influyen en la presión arterial están autorreguladas, estas variables son la interacción del flujo sanguíneo dependiente de: los latidos cardiacos (gasto cardiaco), del volumen de sangre circulante controlado por la función renal, y de las resistencias periféricas de los vasos sanguíneos a través de las resistencias arteriolas. Esto con el fin de mantener la presión arterial normal para la perfusión sanguínea de acuerdo con las necesidades orgánicas (Figura 1).

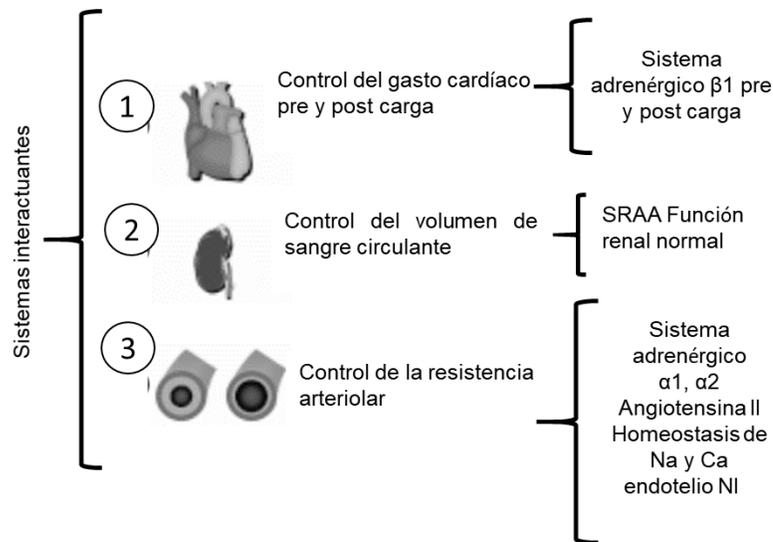


Figura 1. Variables de la regulación de la presión arterial. Recuperado de Gamboa & Benavides,(2016).

El desequilibrio en la relación entre el flujo sanguíneo y las resistencias periféricas se presenta cuando ocurre un daño en la autorregulación de estas variables revelándose así la hipertensión (presión arterial $\geq 140/90$ mmHg) (Gamboa & Benavides,2016).

2.2 Hipertensión

Durante décadas la hipertensión ha sido conocida como el “asesino silencioso”, ya que, aunque generalmente es asintomática, los marcadores tempranos del síndrome están a menudo presentes antes que la elevación de la presión arterial se mantenga, por lo que pueden pasar varios años antes de que sus efectos destructivos se detecten en los órganos diana (Gamboa & Benavides, 2016; González & Chirino, 2014).

Según Saladin, (2013) la hipertensión presiona los vasos sanguíneos y desgarrar el endotelio, lo que crea lesiones que se vuelven puntos focales de aterosclerosis. Éste empeora entonces la hipertensión y se establece un ciclo de retroalimentación positiva insidioso. Otro ciclo de retroalimentación positiva afecta los riñones. Sus arteriolas engrosan como respuesta a la tensión, sus luces se vuelven más estrechas, declina el flujo sanguíneo renal, lo que lleva a la formación del vasoconstrictor angiotensina II y la liberación de la hormona aldosterona que

promueve la retención de sal. Estos efectos empeoran la hipertensión que ya existía. Si la presión diastólica excede 120mmHg, los riñones y el corazón se pueden deteriorar con rapidez; los vasos sanguíneos del ojo sufren hemorragias, lo que puede llevar a ceguera, la muerte en un periodo de dos años. Los órganos diana de la hipertensión establecida son el riñón, corazón y cerebro. En la figura 2 se presenta la sintomatología presente en los órganos diana según el caso.

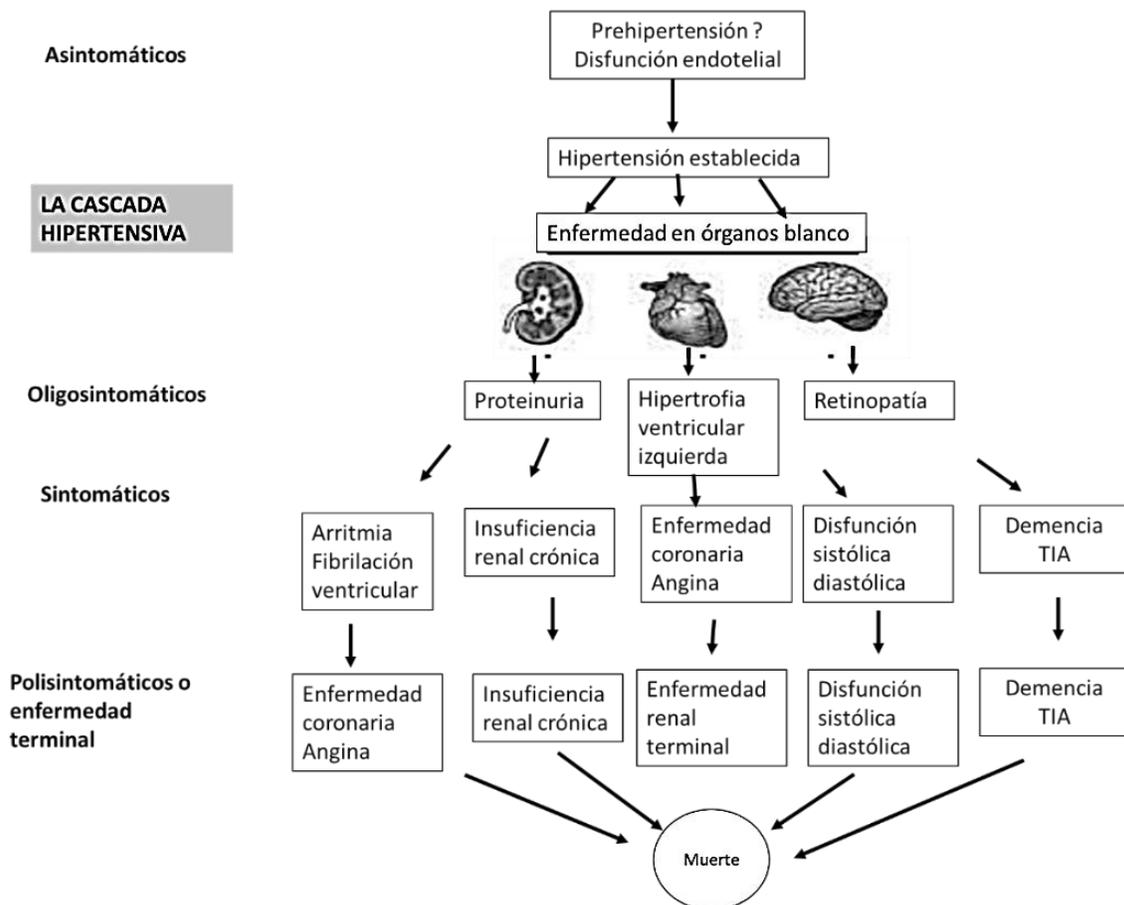


Figura 2. Sintomatología de la hipertensión. Recuperado de Gamboa y Benavides, (2016)

2.2.1 Causas de la hipertensión

De acuerdo con Ajeigbe, Ademosun y Oboh, (2020) la etiología de la hipertensión es multifactorial y existen factores de riesgo modificables y no modificables (Figura 3) que provocan la enfermedad.

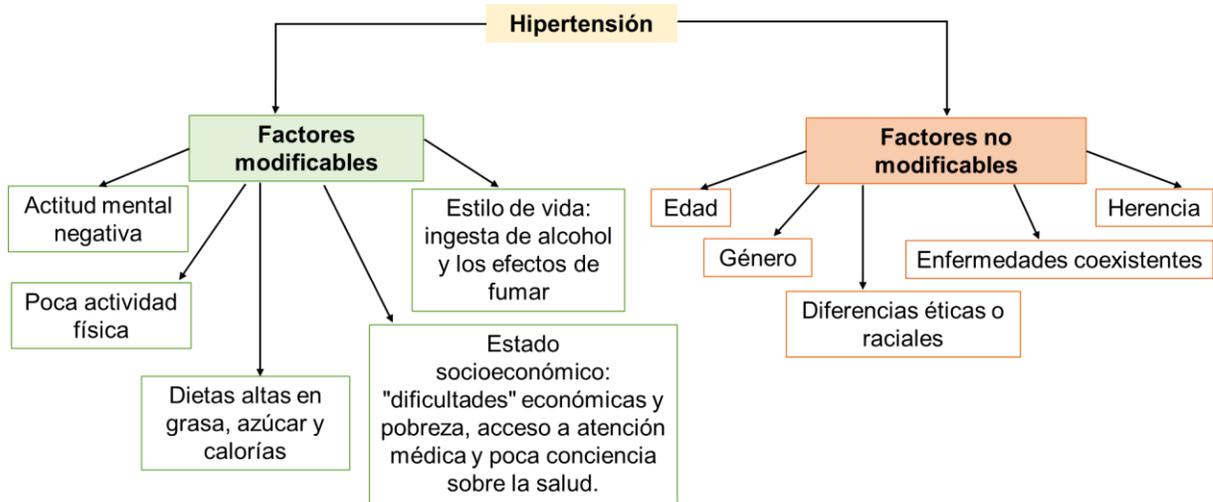


Figura 3. Representación esquemática de los factores causantes de la hipertensión arterial. Recuperado de Ajeigbe, et al., (2020)

2.2.2 La hipertensión en cifras

Según la encuesta nacional de salud, en México anualmente se diagnostican alrededor de 450 000 casos nuevos. Así mismo del año 2000 al año 2006 y del año 2006 al año 2012, hubo aumento del 69% y 25% respectivamente, en la detección de casos de hipertensión arterial (Campos, et.al., 2013).

De tal manera que en el año 2015 en México la hipertensión arterial fue considerada la responsable del 18.1% del total de muertes y el principal factor de muertes prevenibles. Además, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del año 2016, uno de cada cuatro mexicanos padece hipertensión (Campos, Hernández, Pedroza, Medina & Barquera, 2018; Shamah, Cuevas, Gaona, Gómez, Morales, Hernández & Rivera, 2018).

A nivel mundial de acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (PAHO) y la OMS (2018):

- 1 de cada 3 adultos sufre hipertensión
- 1 de cada 3 adultos con hipertensión desconoce su enfermedad
- 1 de cada 3 adultos que se está tratando por hipertensión no logra mantener su presión bajo 140/90mm Hg

Además, según la PAHO/OMS (2017), si se logra tratar a la mitad de la población con hipertensión no controlada, incluyendo aquellos tratados con valores de

presión arterial sub-óptimos y aquellos no tratados, en 10 años se podrían prevenir 10 millones de muertes en el mundo debidas a eventos cardiovasculares

2.2.3 Manejo de la hipertensión

El tratamiento de la hipertensión (Figura 4) puede seguirse siguiendo uno o más enfoques.

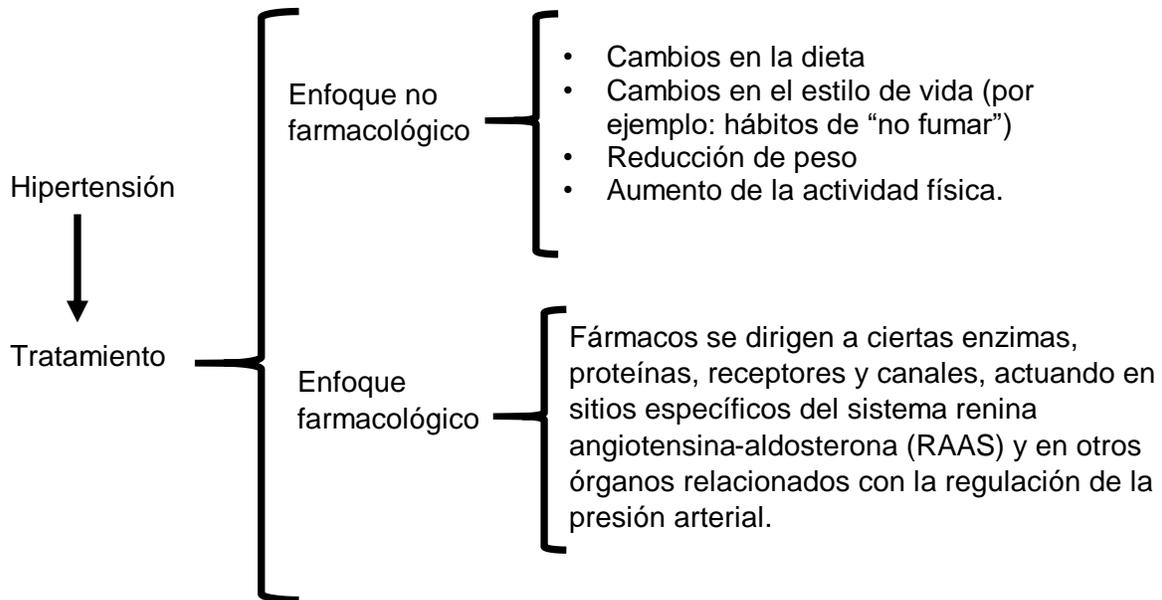


Figura 4. Enfoques de tratamientos para la hipertensión. Elaboración propia. Nota: Este diagrama esta realizado en base al texto de la publicación de Ajeigbe, O. F., Ademosun, A. O. & Oboh, G. (2020).

2.3 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

Este sistema consiste en una serie de proteínas y péptidos que reaccionan en una cascada para desencadenar una serie amplia de acciones, esto juega un papel muy importante en la regulación de la presión arterial y el volumen extracelular (Wein, Campbell & Walsh, 2008).

La vía renina-angiotensina-aldosterona (RAA) controla la secreción de aldosterona. La aldosterona es el mineralocorticoide que regula la homeostasis de dos iones minerales- específicamente, iones de sodio (Na⁺) y potasio (K⁺) y ayuda a modificar el volumen y la presión sanguínea) (Tortora & Derrickson, 2013).

La deshidratación, deficiencia de Na^+ o hemorragias estimulan el inicio de esta vía, por lo que el volumen o el flujo sanguíneo a los riñones disminuyen, lo cual lleva a una disminución de la presión sanguínea de manera que las células yuxtaglomerulares en los riñones segregan renina hacia el torrente sanguíneo. Consecuentemente se incrementa el nivel de renina en sangre). La renina convierte al angiotensinógeno (de 453 aminoácidos de largo) una glicoproteína plasmática producida en el hígado en angiotensina I constituida por 10 aminoácidos de largo). A medida que la sangre con niveles incrementados de angiotensina I fluye por los capilares de los pulmones, la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) convierte angiotensina I en la hormona angiotensina II (8 aminoácidos de largo), que eleva la tensión arterial de dos maneras. En primer lugar, la angiotensina II es un vasoconstrictor potente; eleva la presión a través del aumento de la resistencia vascular sistémica. En segundo lugar, estimula la secreción de aldosterona, que incrementa la reabsorción de iones sodio (Na^+) y agua por parte del riñón. La reabsorción de agua aumenta el volumen sanguíneo total, lo que a su vez eleva la tensión arterial (Tortora & Derrickson, 2013; Saladin, 2013).

Por lo tanto, es notable que el paso crítico en este sistema para regular la presión arterial es la conversión de la angiotensina I en angiotensina II por la acción de la ECA.

En personas sanas que consumen una dieta con contenido normal de sodio el sistema renina-angiotensina-aldosterona no desempeña un papel importante en el control de la presión arterial, sin embargo, en estado de hipertensión el control de este sistema es muy relevante (Wein, Campbell & Walsh, 2008).

2.3.1 Inhibidores de la enzima angiotensina (IECA)

Entre los tratamientos para la hipertensión humana se encuentra los inhibidores de la enzima angiotensina (IECA). El mecanismo de acción principal de los IECA se debe a la interacción que tienen los inhibidores con el átomo de cinc que contiene la ECA en su sitio activo, lugar de unión de la angiotensina I. Ya que los IECA no interactúan directamente con otros componentes del sistema renina angiotensina,

sus efectos primordiales derivan de la inhibición de la síntesis de angiotensina II (Figura 5) (Longo, Fauci, Kasper, Hauser, Jameson & Loscalzo, 2012; Lorenzo, et al., 2017).

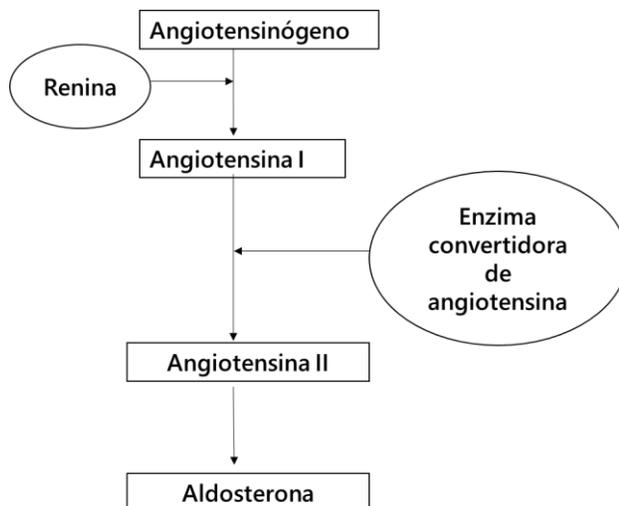


Figura 5. Efecto de la ECA en el sistema renina angiotensina aldosterona. Elaboración propia. Nota: Este diagrama esta realizado en base al texto de la publicación de Longo, et al. (2012)

2.3.2 Inhibidores de la ECA como reguladores de HTA

Los inhibidores sintéticos de la ECA (tabla 1) se usan para el tratamiento de enfermedades como la hipertensión. Sin embargo, se ha encontrado que estos se han asociado con efectos secundarios como tos, edema angioneurótico y efectos perjudiciales en el embarazo. Por lo que el desarrollo de inhibidores de la ECA a partir de productos naturales representaría un gran beneficio para pacientes hipertensos (Guerrero, et al., 2012).

Tabla 1. Clasificación de IECA en base a composición química. Recuperado de Longo, et al. (2012)

Inhibidores que contienen:	Estructuralmente relacionados con:
Grupo sulfhidrilo	Captopril
Grupo dicarboxilo	Enalapril
Grupo fosfato	Fosinopril

Se han investigado diferentes tipos de compuestos derivados de alimentos naturales con propiedades IECA. Un ejemplo son los derivados de proteínas de los alimentos, las cuales se pueden clasificar en tres categorías: 1) péptidos derivados de animales, 2) derivados de plantas 3) derivados de microorganismos. En la categoría 1, se incluye péptidos de leche, carne, pescado y huevos. Se ha informado que la caseína, los hidrolizados de proteína de suero de la leche y la ovocinina de los huevos son inhibidores de la ECA eficaces tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. En cuanto a las proteínas de la carne y el pescado, estas se hidrolizan utilizando diferentes enzimas como las químicas y las fracciones resultantes se someten a la determinación de las propiedades inhibitorias de la ECA. Entre las especies de peces utilizadas para derivar péptidos inhibidores de la ECA están el bonito, la sardina, el salmón, la merluza y el atún. Los péptidos derivados de plantas también se han identificado a partir de diferentes fuentes, incluida la soya, la linaza, el girasol, el arroz y el maíz (Balasuriya & Rupasinghe, 2011).

Además, metabolitos secundarios producidos en las plantas como los fenoles son otro grupo de compuestos naturales que se identifican con potencial IECA (Balasuriya & Rupasinghe, 2011).

Así mismo es importante resaltar que Guerrero y colaboradores (2012), también han reportado que varios extractos y compuestos obtenidos de plantas se han identificado como inhibidores de la ECA *in vitro*. Estos efectos beneficiosos se han atribuido en gran parte a la presencia de moléculas de flavonoides, que generan complejos de quelatos dentro del centro activo de la ECA.

Diversos estudios han demostrado la eficacia de la fermentación microbiana para la producción de péptidos inhibidores de la ECA. Pan y Guo (2010) expusieron la actividad inhibidora de la ECA en leche agria fermentada con *Lb. helveticus* LB10, y el péptido bioactivo Arg-Leu-Ser-Phe-Asp-Pro [de hidrolizado de β -lactoglobulina (f148-153)] se aisló y purificó, y exhibió un valor de IC₅₀ de 177 μ M. En otra investigación, se encontró actividad inhibidora de la ECA en una fracción bioactiva (que contiene seis péptidos) de leche fermentada con *Lactococcus lactis* DIBCA2

(IC₅₀ = 5 ± 2 µg / mL) (Nejati et al., 2013). Además, la fermentación de la leche bovina con *Lactobacillus helveticus* KLDS.31 y *Lactobacillus casei* KLDS.105 produce una leche fermentada rica en péptidos con actividad inhibidora de la ECA (Li, Zhao, Wang, Qayum, Hussain & Liang, 2019).

2.4 Radicales libre y estrés oxidativo

Es bien conocido a que la hipertensión se asocia con niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de estrés oxidativo, esto se debe a que el sistema renina-angiotensina-aldosterona ejerce un efecto vasoconstrictor directo y tiene interacciones importantes con los ROS y NO (Konukoglu & Uzun, 2017).

El cuerpo humano requiere especies oxidantes y antioxidantes para el metabolismo normal, la transducción de señales y la regulación de las funciones celulares. El estrés oxidativo es la alteración en el equilibrio entre los estados oxidante-antioxidante lo que beneficia la producción de especies oxidantes (Devasagayam, Tilak, Bolor, Sane, Ghaskadbi & Lele, 2004).

La transformación de los nutrientes orgánicos y la obtención de la energía química almacenada en sus enlaces involucra reacciones químicas de óxido-reducción que suceden en el proceso de respiración celular que acontece en las mitocondrias, durante este proceso se consume oxígeno. No obstante, en este proceso también se produce la oxidación de moléculas orgánicas a través de reacciones secuenciales que no implican la adición directa del oxígeno. Por oxidación se entiende a la eliminación de electrones, no sólo a la adición de átomos de oxígeno, y la reducción implica adición de electrones.

Sin embargo, durante la respiración celular, además de consumirse oxígeno y de obtenerse energía generándose ATP, quedando como subproductos CO₂ y H₂O, también se producen otras moléculas residuales: los radicales libres (RL) (Galván, Guisado, García, Ochoa & Ocaña, 2008).

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el objetivo de alcanzar su estabilidad electroquímica. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos (Avello & Suwalsky, 2006).

Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones y en presencia de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de este, inhibiendo la tasa de oxidación (Galván, et al., 2008).

2.5 Sistema antioxidante

El sistema de defensa antioxidante está conformado por un grupo de sustancias que, al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente -membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas -lípidos, proteínas, ADN, etc.- funcionalmente vitales o más importantes. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadores (scavengers), con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos (Venereo, 2002). Estos mecanismos son adecuados a la muy corta vida media de los radicales libres (Avello & Suwalsky, 2006).

La vitamina C y los compuestos fenólicos son conocidos por su actividad antioxidante.

2.5.1 Vitamina C

La vitamina C es un factor esencial para la supervivencia, que existe en dos estados redox, el ácido ascórbico (AA) y su forma oxidada, el ácido deshidroascórbico (ADHA) (Cisternas et al., 2014).

Es de destacar que cuando la vitamina C dona electrones, se pierden secuencialmente. La especie formada después de la pérdida de un electrón es un radical libre, ácido semidehidroascórbico o radical ascorbilo. En comparación con otros radicales libres (una especie con un electrón no apareado), el radical ascorbilo es relativamente estable con una vida media de $10 \geq 5$ segundos y es bastante no reactivo. Esta propiedad explica por qué el ácido ascórbico puede ser uno de los antioxidantes preferidos. En términos simples, un radical libre reactivo y posiblemente dañino pueden interactuar con el ácido ascórbico. El radical libre reactivo se reduce y el radical ascorbilo formado en su lugar es menos reactivo. La reducción de un radical libre reactivo con la formación de un compuesto menos reactivo a veces se denomina eliminación de radicales libres. El ácido ascórbico es, por lo tanto, un buen eliminador de radicales libres debido a sus propiedades químicas (Padayatty, et al., 2003).

El radical ascorbilo, con su electrón no apareado, no es un compuesto de larga vida. Tras la pérdida de un segundo electrón, el compuesto formado es ácido deshidroascórbico. Es decir, cuando se expone al oxígeno, el ácido ascórbico (AA) se oxida reversiblemente a ácido deshidroascórbico (ADHA), que también ejerce una eficacia vitamínica. Según la mayoría de los informes, la eficacia de la vitamina C se pierde con la degradación irreversible de ADHA a ácido 2,3-dicetogulónico (Aschoff, et al. 2015).

La estabilidad del ácido deshidroascórbico depende de factores como la temperatura y el pH, pero a menudo es de solo unos minutos. Una vez formado, el radical ascorbilo y el ácido deshidroascórbico pueden reducirse de nuevo a ácido ascórbico mediante al menos tres vías enzimáticas separadas, así como mediante la reducción de compuestos en sistemas biológicos como el glutatión (Padayatty, et al., 2003).

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se destaca como un método confiable para la determinación de vitamina C. La estabilidad de AA es un problema muy crítico porque se degrada rápidamente a ADHA, por lo tanto, el ácido metafosfórico se emplea como un estabilizador para el análisis de AA. Como

la detección de ADHA se ve obstaculizada por su débil absorción molar, la mayoría de los investigadores eligen reducirlo a AA antes de la separación cromatográfica, haciendo una cuantificación indirecta por diferencia. Entre los agentes reductores, el ditiotreitól (DTT) destaca por ser ampliamente utilizado (Kim & Kim, 2020; Campos, Ribeiro, Della Lucia, Pinheiro-Sant'Ana & Stringheta, 2009)

2.5.1.1 Vitamina C como agente antihipertensivo

La vitamina C es un antioxidante potente y ampliamente utilizado, característicamente soluble en agua. Los efectos antihipertensivos de la vitamina C se hipotetizaron ya en 1946, y muchos estudios de laboratorio y humanos han establecido la plausibilidad biológica. Los estudios observacionales basados en la población han mostrado una asociación inversa entre las concentraciones plasmáticas de vitamina C y la ingesta de vitamina C con la presión arterial (PA), lo que justifica los ensayos que evalúan la complementación de vitamina C y la reducción de la PA (Rodrigo, Brito & Gonzalez, 2016; Juraschek, Guallar, Appel & Miller, 2012)

En la actualidad, la teoría principal es que la vitamina C aumenta las concentraciones intracelulares de tetrahidrobiopterina, un cofactor endotelial de óxido nítrico sintasa que promueve la producción de óxido nítrico, que es un vasodilatador potente. También hay evidencia de que la vitamina C aumenta la actividad biológica del óxido nítrico. Además, la suplementación con vitamina C mejoró la función endotelial en las arterias coronarias en los ensayos a corto plazo en humanos. Todos los informes mencionados anteriormente sugieren que la Vit C es un suplemento preventivo y terapéutico eficaz en la hipertensión esencial (Guan, Dai & Wang, 2020).

El metaanálisis realizado por Guan y colaboradores (2020) es la primera revisión cuantitativa de prueba controlada aleatorizada que evalúa el efecto de la suplementación con vitamina C sobre la hipertensión esencial. El metaanálisis incluyó 8 estudios con 614 participantes y los resultados mostraron que la suplementación con vitamina C puede reducir significativamente la PAS y la PAD en pacientes con hipertensión esencial.

Se ha determinado en condiciones experimentales que el efecto antihipertensivo de la vitamina C es alcanzable a una concentración plasmática de 10 mM. Esta concentración permite que la vitamina C compita eficientemente contra la reacción entre NO (óxido nítrico) y superóxido, que aumenta en condiciones relacionadas con el estrés oxidativo como hipertensión. El nivel plasmático mencionado anteriormente no es accesible a través de la administración oral de vitamina C. Las dosis orales diarias de vitamina C entre 60 y 100 mg son suficientes para que se produzca el umbral de renal-ascorbato. El plasma está completamente saturado a dosis de 400 mg diarios, lo que lleva a un nivel de estado estable de 80 μ M. Por lo tanto, es plausible proponer que el efecto antihipertensivo del ascorbato solo sea accesible con una infusión de dosis alta (Rodrigo, Brito & Gonzalez,2016).

Aunque el mecanismo exacto del efecto de la terapia antioxidante sobre la presión arterial aún no se ha dilucidado por completo, cada vez hay más pruebas de que la terapia adyuvante antioxidante puede reducir la presión arterial en pacientes con hipertensión para proteger a los órganos objetivo. Se espera obtener información más detallada sobre este mecanismo en futuros estudios (Guan, Dai & Wang,2020).

2.5.2 Técnicas de análisis de la actividad antioxidante

Existe una gran cantidad de mecanismos de cómo los antioxidantes alimentarios pueden ejercer su acción, entre aquellos compuestos que reaccionan directamente con los radicales libres, como polifenoles, deteniendo el proceso en cadena de oxidación lipídica. Esta reacción se puede llevar a cabo por dos posibles vías: reacciones de transferencia de un átomo de H⁺ (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET) (Prior, Wu & Schaich, 2005).

Existen diferentes métodos reportados por la literatura para determinar la actividad antioxidante de los sistemas biológicos y ningún ensayo refleja con exactitud el mecanismo de acción de todas las fuentes de oxidantes o todos los antioxidantes en un sistema complejo. Por lo cual los investigadores concuerdan sobre la

necesidad de emplear más de un método para determinar la capacidad antioxidante a fin de comparar el modo de acción y obtener una respuesta más completa (Becker, Nunes, Ribeiro, Silva, Catanante & Marty, 2019).

2.5.2.1 DPPH

La metodología del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH•), se basa en la reducción del DPPH•, la cual se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales (Bondet, Brand-Williams & Berset, 1997)

2.5.2.2 FRAP

Se trata de una reacción SET, este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe⁺³) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe⁺²), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm (Benzie & Strain, 1996).

2.6 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos sintetizados por las plantas vasculares como parte de su metabolismo secundario, por lo cual se encuentran muy distribuidos dentro del reino vegetal. Se localizan en todas las partes de la planta y su formación se da principalmente durante la fase de crecimiento de estas. Su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo ya que se ve influenciado por factores endógenos o genéticos y factores exógenos o ecológicos que pueden ser además bióticos o abióticos. Ejemplos de estos factores son los ataques por parásitos, cultivos en terrenos no adecuados, sequías, cambios de temperatura o elevada altitud, estos factores dan como resultado la síntesis de compuestos del metabolismo secundario. Tales factores ocasionan estrés para la planta, sin embargo, sus efectos se ven disminuidos debido las reservas de antioxidantes (Paladino, 2008; Repilado, 2016).

Entre las funciones de los compuestos fenólicos se encuentran la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Además, influyen en diversas características tanto sensoriales como nutritivas de los alimentos de origen vegetal. y también en propiedades antioxidantes. Dichas propiedades antioxidantes se ven influenciadas por el anillo aromático de la estructura de los compuestos fenólicos (Paladino, 2008; Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila & Bravo, 2014).

De acuerdo con Arroyo y León (2014) la distribución de los metabolitos secundarios dentro de los grupos de las plantas presenta algunas características particulares, entre las que cabe mencionar las siguientes:

- Una planta contiene una mezcla de metabolitos secundarios con cantidades variables en diferentes células, tejidos y órganos;
- En el organismo individual o de tejido, las cantidades y tipos de productos del metabolismo secundario varían con la edad o con las condiciones ambientales de la planta.
- Especies de géneros afines o familias de plantas pueden presentar los mismos metabolitos secundarios.

2.6.1 Estructura química de los compuestos fenólicos

La estructura de los compuestos fenólicos consiste en un anillo aromático unido a uno o más compuestos hidroxilo (Figura 6), comprenden desde moléculas fenólicas simples hasta compuestos altamente polimerizados, sin embargo, comúnmente se les denomina “polifenoles” (Ozcan, Akpınar-Bayizit, Yılmaz-Ersan y Delikanli, 2014).

En la figura 6 se presenta la estructura base de los polifenoles.

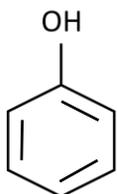


Figura 6. Estructura básica de compuesto fenólico. Adaptado de Balasundram, Sundram & Samman, (2006). Nota: solo se muestra la sección de la estructura básica de un compuesto fenólico.

Los compuestos fenólicos naturales en su mayoría se presentan como conjugados con mono y polisacáridos, unidos a uno o más de los grupos fenólicos, además pueden aparecer como derivados funcionales como ésteres metílicos (Balasundram, Sundram & Samman, 2006)

2.6.2 Clasificación de los compuestos fenólicos

Debido a su diversidad estructural hay una amplia gama de compuestos fenólicos que se producen en la naturaleza, los compuestos fenólicos pueden clasificarse básicamente en varias clases (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los principales compuestos fenólicos de origen vegetal, de acuerdo con su estructura química básica. Recuperado de Gil, et al. (2013)

Esqueleto carbonado	Clasificación
C_6	Fenoles simples, benzoquinonas
$C_6 - C_1$	Ácidos fenólicos
$C_6 - C_2$	Ácido fenilacético, acetofenoles
$C_6 - C_3$	Ácido hidroxicinámico, polipropano, cumarina, isocumarina
$C_6 - C_4$	Naftoquinona
$C_6 - C_1 C_6$	Xantanos
$C_6 - C_2 - C_6$	Estilbeno, antraquinona
$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoides, isoflavonas
$(C_6 - C_3)_2$	Lignanós, neolignanós
$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	Bioflavonoides
$(C_6 - C_3)_n$	Ligninas
$(C_6)_n$	Melanoidinas
$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Taninos

De acuerdo con Guerrero y colaboradores (2012) la estructura de los compuestos fenólicos juega un papel muy importante en su función biológica, de manera que la posición y el número de sustituyentes en la estructura básica del flavonoide afectan significativamente las actividades antiproliferativas, citotóxicas,

antioxidantes y antienzimáticas de dichas moléculas. También se ha encontrado que ciertos flavonoides exhiben una capacidad para inhibir diferentes metaloproteinasas de cinc, incluida la ECA.

2.6.2.1 Flavonoides

Los compuestos llamados flavonoides tienen un bajo peso molecular y un esqueleto difenilpirano (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. Los átomos de carbono individuales de los anillos A, B y C se numeran con números ordinarios para los anillos A y C, números primos para el anillo B. El anillo A se biosintetiza a través de la ruta de los poliacetatos y el anillo B junto con la unidad C₃ proceden de la ruta del ácido siquímico (Figura 7). Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, de manera que son estructuras polifenólicas (Cartaya & Reynaldo, 2001)

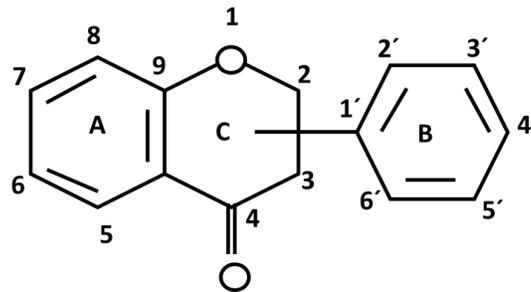


Figura 7. Estructura básica del esqueleto flavonólico. Recuperado de Cartaya y Reynaldo, (2001)

La mayoría de los flavonoides se encuentran como glucósidos, sin embargo, también pueden aparecer en forma libre (también llamados agliconas flavonoides). Además, se pueden presentar como sulfatos, dímeros o polímeros. Los glucósidos se pueden encontrar de dos formas: como O-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal), o como C-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de enlaces carbono-carbono. De todas estas formas naturales, los O-glucósidos son los mayoritarios (Quiñones, Miguel & Aleixandre, 2012).

Existen varios subgrupos de flavonoides y su clasificación se hace en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B. Además, dentro de cada familia existen una gran variedad de compuestos, los cuales se diferencian por el número y la posición de los grupos hidroxilos y grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos). Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Figura 8) (Quiñones, Miguel & Aleixandre, 2012).

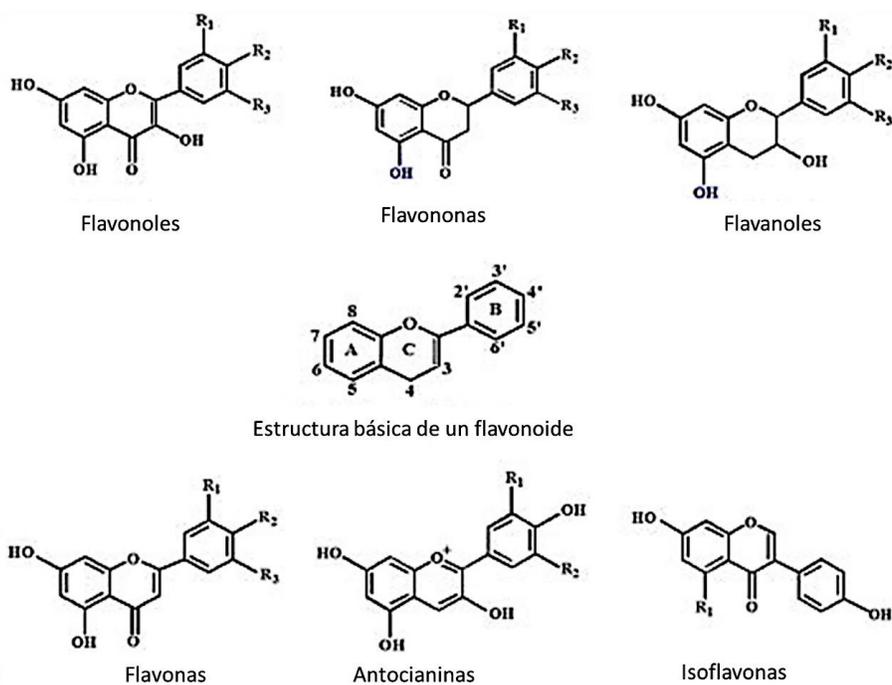


Figura 8. Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides. Recuperado de Pandey & Rizvi, (2009).

2.6.3 Compuestos fenólicos como inhibidores naturales de la ECA

Algunos metabolitos secundarios producidos en las plantas como los fenoles son otro grupo de compuestos naturales que se identifican con potencial IECA (Balasuriya & Rupasinghe, 2011).

Guerrero y colaboradores (2012), también han reportado que varios extractos y compuestos obtenidos de plantas se han identificado como inhibidores de la ECA

in vitro. Estos efectos beneficiosos se han atribuido en gran parte a la presencia de moléculas de flavonoides, que generan complejos de quelatos dentro del centro activo de la ECA.

La revisión sistemática realizada por Wang y colaboradores, (2013) así como la realizada por Hartley y colaboradores, (2013) señalan que la ingesta dietaria de flavonoides, entre los que se destacan los flavonoles, antocianinas, proantocianidinas, flavonas, flavononas e isoflavonas (Figura 9) disminuyen significativamente el efecto de las ECV (Hügel, Jackson, May, Zhang & Xue, 2016).

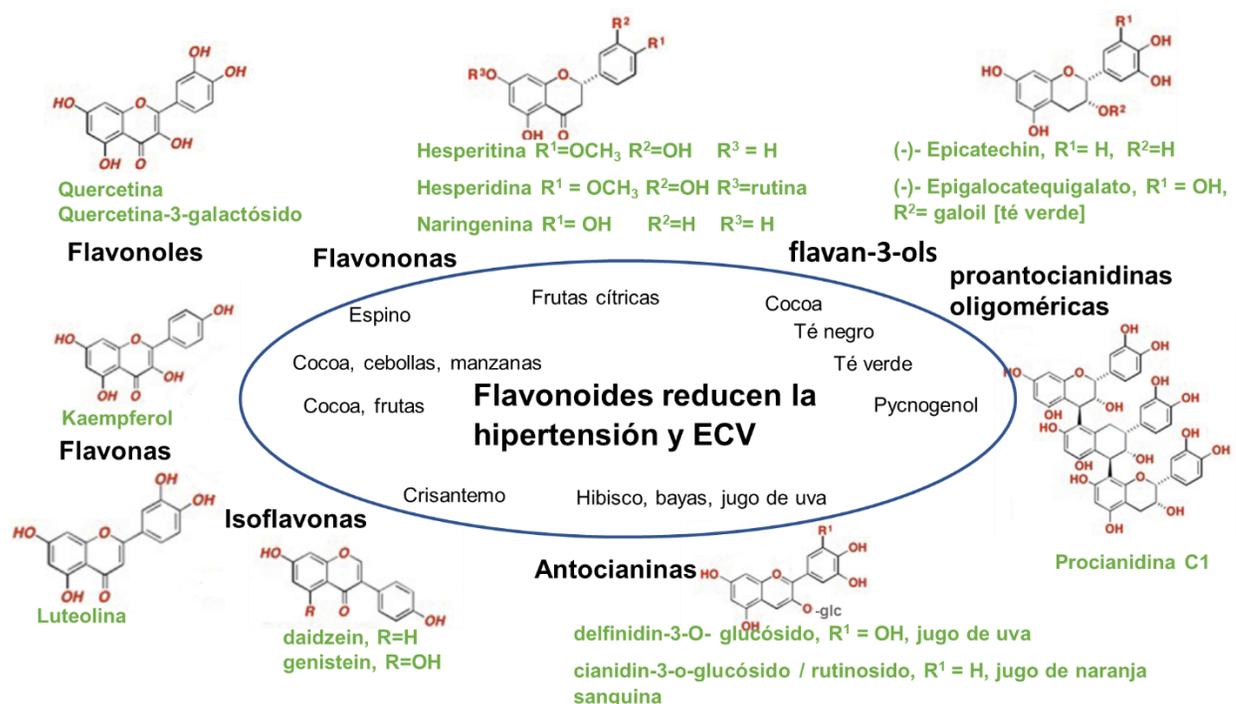


Figura 9. Flavonoides dietéticos protectores contra la hipertensión y las enfermedades cardiovasculares. Recuperado de Hügel et al., (2016).

2.6.4 Extracción de compuestos fenólicos

La extracción de compuestos naturales parece ser de considerable interés debido a las propiedades de algunos extractos naturales. Además, la extracción de compuestos bioactivos puede aumentar el valor de algunos subproductos de la industria alimentaria, un ejemplo es la extracción de flavonoides de la cáscara de cítricos que podrían ser explotados por las industrias farmacéutica y alimentaria.

Las técnicas convencionales de extracción líquido-sólido son laboriosas, requieren mucho tiempo y a menudo requieren grandes volúmenes de solventes orgánicos. Hoy en día, la tendencia es utilizar solventes más amigables con el medio ambiente, como las mezclas de alcohol y agua, lo que aumenta los costos y disminuye el rendimiento de extracción (Esclapez, García, Mulet & Cárcel, 2011)

2.6.4.1 Extracción asistida por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido se ha utilizado ampliamente en las últimas dos décadas como un método de extracción eficiente en las industrias alimentaria y farmacéutica (Esclapez, et al., 2011).

El ultrasonido es una forma de energía asociada con el sonido a frecuencias superiores a las detectadas por el oído humano. En el rango de frecuencia de sonido (Fig. 10), el ultrasonido se sitúa por encima de 16 kHz (Lavilla & Bendicho, 2017).

El ultrasonido se basa en la propagación de ondas mecánicas, formadas por un conjunto de ciclos definidos como la combinación de presiones altas y bajas, llamadas compresiones y rarefacciones, respectivamente. Las características principales de las ondas de ultrasonido de acuerdo son:

- Longitud: distancia entre dos puntos de compresión o rarefacción.
- Amplitud: altura máxima de una ola.
- Frecuencia (Hz): número de ciclos por unidad de tiempo.
- Velocidad (m / s): producto de frecuencia por longitud de onda.
- Potencia (W): relación entre la energía transportada y el tiempo considerado.
- Intensidad: relación de una unidad de potencia en una unidad de área.

Cuando se sónica un medio líquido, una presión acústica (Pa) se agrega a la presión hidrostática (Ph) que ocurre en el medio. No se produce interacción directa entre las ondas de ultrasonido y las moléculas químicas porque las frecuencias ultrasónicas y la energía son demasiado bajas. La concentración de energía es, fundamentalmente, la causa de la interacción indirecta del ultrasonido con la

materia. Los efectos químicos del ultrasonido se deben al fenómeno de cavitación que se basa en la formación de burbujas de vapor (Lavilla & Bendicho, 2017).

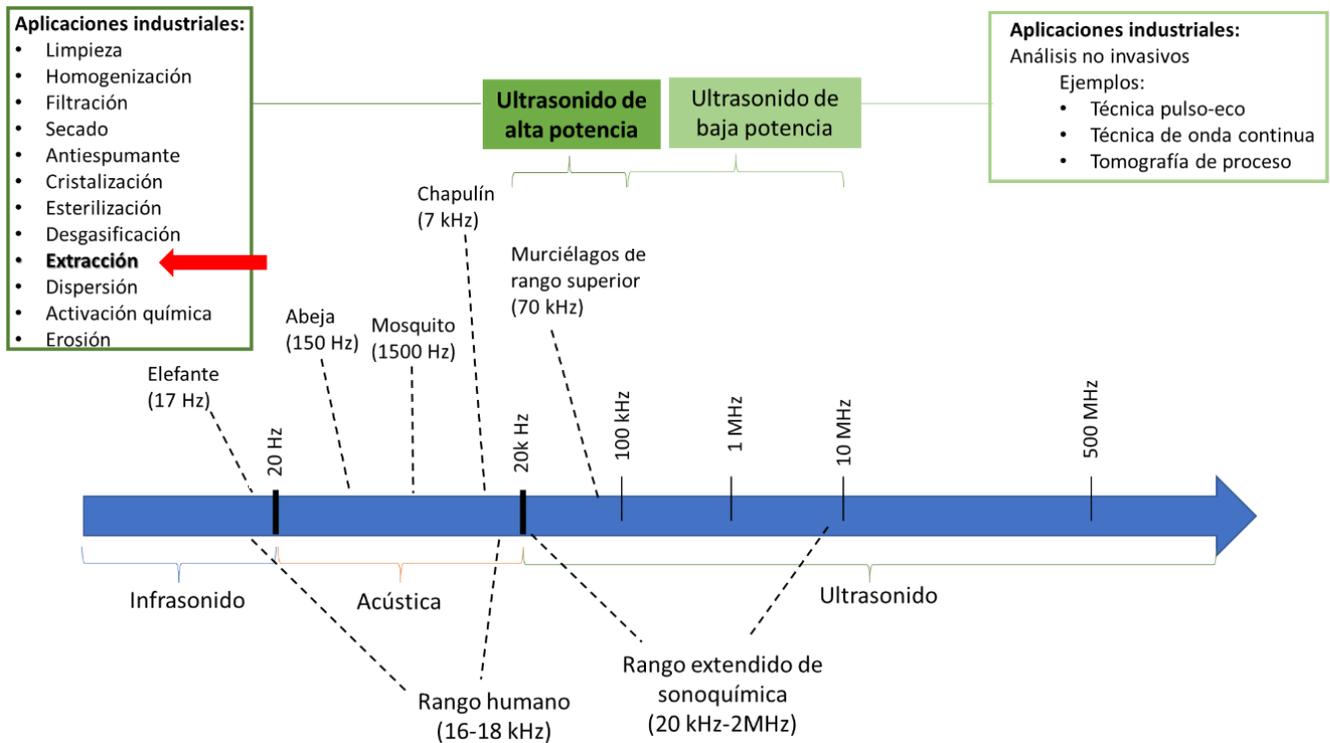


Figura 10. Rango de frecuencia de sonido (incluidos algunos sonidos y procesos naturales) y aplicaciones industriales del ultrasonido. Adaptado de Lavilla & Bendicho, (2017). Nota: a la imagen se le agregaron las aplicaciones industriales.

Cuando se aplica una onda de ultrasonido a un líquido, la estructura molecular del medio pasa por ciclos alternos de refacción y compresión (Figura 11). La compresión ejerce una presión positiva, haciendo que las moléculas del medio se acerquen. Las ondas ultrasónicas se atenúan cuando penetran en un medio líquido, si la onda de ultrasonido es lo suficientemente fuerte, el ciclo de refracción puede superar las fuerzas de unión intermoleculares y provocar una caída de presión (presión negativa) repentina acompañada de cierta producción de calor y la creación de burbujas de sustancias gaseosas en el líquido. El calentamiento y el enfriamiento tienen lugar durante los ciclos de compresión y refacción,

respectivamente. Las burbujas crecen en tamaño con los ciclos de expansión de ultrasonido que siguen hasta que alcanzan un tamaño inestable y luego colapsan violentamente (Figura 12). Las temperaturas y presiones alcanzadas en el líquido circundante después del colapso están de acuerdo con la teoría del “punto caliente”. Las temperaturas en el rango de 4500-5000K y presiones superiores a 1000 atm se alcanzan dentro de las burbujas de cavitación. Debido a que las burbujas de cavitación se producen en muy poco tiempo, se producen velocidades de enfriamiento de aproximadamente 10^{10} K / s (Lavilla & Bendicho, 2017; Izadifar, Babyn & Chapman, 2018).

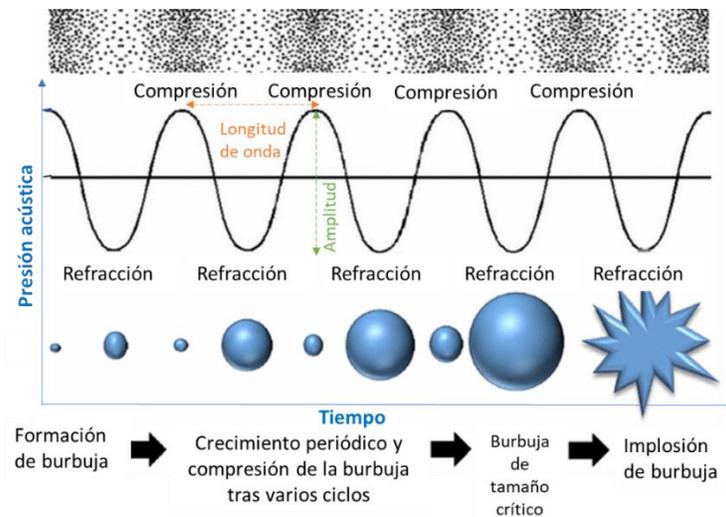


Figura 11. Ondas de ultrasonido en un medio líquido. Ciclos de compresión / rarefacción y burbujas de cavitación. Adaptado de Izadifar, Babyn, & Chapman, (2018). Nota: a la imagen se le agregaron las flechas de presión, tiempo, longitud de onda y amplitud.

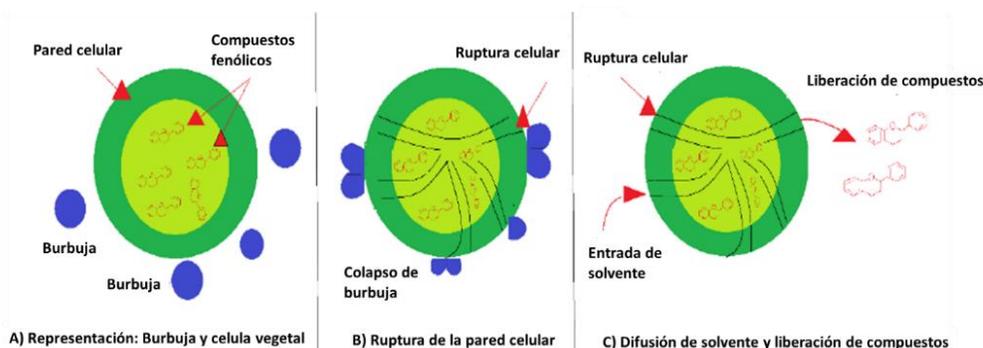


Figura 12. Representación gráfica del colapso de burbujas de cavitación y la liberación de material vegetal en tres pasos. Recuperado de Medina et al., (2017).

2.7 Bioaccesibilidad de compuestos bioactivos

Los compuestos fenólicos totales y otros antioxidantes naturales presentes en los alimentos no siempre reflejan la cantidad total disponible para ser absorbida y metabolizada por el cuerpo humano. Durante el proceso de digestión, los componentes de los alimentos están constantemente expuestos a diferentes condiciones fisicoquímicas y bioquímicas y, en consecuencia, la biodisponibilidad y la actividad biológica de las posibles moléculas bioactivas de los alimentos pueden verse afectadas. La biodisponibilidad se define como la fracción de nutrientes ingeridos o compuestos bioactivos que se digieren, absorben y metabolizan a través de vías normales. Además, el concepto de bioaccesibilidad se puede definir como la fracción que se libera de la matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal y está disponible para su absorción (Gunathilake, Ranaweera & Rupasinghe, 2018). De tal manera, que un compuesto solo puede ejercer beneficios para la salud si permanece disponible para la absorción después de que todas las fases involucradas en el proceso de digestión gastrointestinal hayan tenido lugar (Blancas-Benítez, Montalvo-González, González-Aguilar & Sáyago-Ayerdi, 2019).

Los ensayos de digestión *in vitro* simulan las condiciones fisiológicas de la digestión *in vivo* y son herramientas útiles para estudiar y comprender los cambios, las interacciones, así como la bioaccesibilidad de nutrientes, medicamentos y compuestos no nutritivos. Si bien muchos estudios han utilizado diferentes patrones de digestión para emular el proceso digestivo *in vivo*, la mayoría coinciden en el uso de enzimas digestivas comerciales como pepsina, pancreatina, lipasas y amilasas, en condiciones controladas de pH y temperatura, para emular todo el proceso digestivo (Velderrain- Rodríguez, Blancas-Benítez, Wall-Medrano, Sáyago-Ayerdi & González-Aguilar, 2017).

En los últimos 40 años, se han publicado más de 2500 artículos de investigación utilizando ensayos de digestión *in vitro* (85% de los cuales se han publicado en las últimas dos décadas) para dilucidar múltiples aspectos como la digestibilidad de proteínas, las interacciones de nutrientes o la viabilidad de microorganismos

encapsulados. La tendencia más reciente en el uso de esta técnica implica la determinación de la actividad antioxidante de los compuestos bioactivos después de la digestión (Lucas-González, Viuda-Martos, Pérez-Alvarez & Fernández-López, 2018).

Estudios anteriores han demostrado que la bioaccesibilidad de antioxidantes y vitamina C del jugo de naranja está influenciada por las condiciones de procesamiento, como el tratamiento térmico y de alta presión. Stinco y colaboradores (2012) midieron la bioaccesibilidad de carotenoides y algunos atributos de calidad en el jugo de naranja hecho de la variedad "Valencia Late" después de diferentes tratamientos de procesamiento: exprimido a mano, exprimido industrialmente y pasteurizado (99 ° C durante 15 s). Descubrieron que el jugo de naranja exprimido industrialmente tenía la mayor bioaccesibilidad de carotenoides y que el jugo de naranja exprimido a mano y el pasteurizado no eran significativamente diferentes (Stinco et al. 2012). Por el contrario, Aschoff y colaboradores (2015) encontraron que el jugo de naranja Lane Late Navel procesado térmicamente (90 ° C durante 1 min) tenía mayor bioaccesibilidad de carotenoides y vitamina C que el jugo sin procesar (Mennah-Govela & Bornhorst, 2017).

2.8 Naranja (*Citrus sinensis*)

El naranjo es un árbol perteneciente a la familia de las Rutáceas, que puede llegar medir hasta unos 10 metros de altura, bien vestido de hojas coriáceas, elípticas, agudas y con un tallo ligeramente espinoso. Crece en suelos permeables y poco calizos, con pH de 5.5 a 6, la temperatura óptima para su desarrollo es de 20-25°C. Su fruto la naranja que llegó a América en el segundo viaje de Cristóbal Colón, consta de once gajos, fáciles de separar, los cuales contienen una pulpa de color variable entre el anaranjado y rojo, jugosa y succulenta, con un sabor que va de lo ácido a lo dulce; además posee varias semillas y tiene fuerte olor característico (SAGARPA, 2016; Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, n.d.).

2.8.1 Anatomía de la naranja

Las naranjas están formadas por 8–16 carpelos agrupados y unidos al eje floral, que forman el núcleo de la fruta. Estos forman lóculos, o segmentos, en los cuales crecen las semillas y los sacos de jugo (vesículas). El pericarpio o cáscara consiste en exocarpo (flavedo) y mesocarpo (albedo) (Escobar, 2019) (Figura 13).

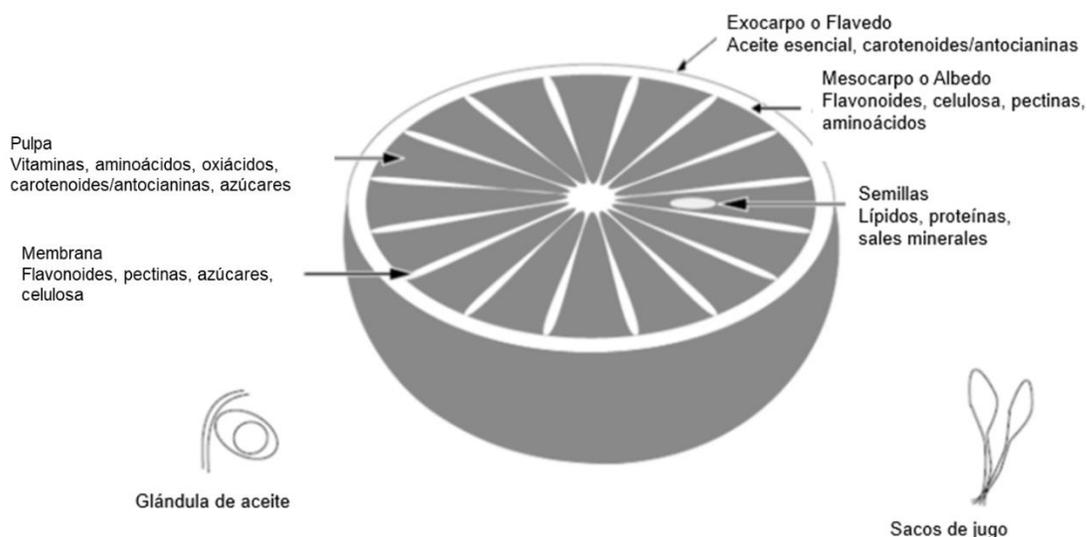


Figura 13. Corte transversal de naranja (*Citrus sinensis*). Recuperado de Lanza, (2004).

El flavedo es la parte exterior de las capas de tejido (epidermis) que tiene color, el albedo, la parte interna es incolora (blanca), sin embargo, en ocasiones aparece teñida (como en el pomelo rojo o las naranjas de sangre). El flavedo consta de epicarpio, hipodermis, mesocarpo externo y glándulas sebáceas. Encima del epicarpio hay una piel protectora conocida como cutícula de varias capas que consiste en una capa interna de cutina, que es un polímero heterogéneo de ácidos grasos y celulosa; una capa externa que consiste en cutina cuya matriz se forma con cutina, cera y una pared celular. La cutícula es compleja tanto en su origen como en estructura y desarrollo. Además, el epicarpio también tiene células con cloroplastos que cambian gradualmente en cromoplastos a medida que cambian las estaciones (colores de verde a amarillo de la fruta) (Arroyo & León, 2014).

2.8.2 Situación mundial de los cítricos

Uno de los principales cultivos frutales en el mundo son los cítricos, los cuales se producen en muchos países con clima tropical o subtropical, Brasil, Estados

Unidos, Japón, China, México, Pakistán, países de la región del Mediterráneo (es decir, Siria) y el sur de Asia son los principales productores de cítricos. La producción mundial según la USDA alcanza los 48 millones de toneladas métricas, lo que confirma la importancia de este cultivo (Nader & Ibrahim, 2018).

2.8.2.1 Situación nacional de los cítricos

En México, en el ciclo agrícola del año 2017, se sembraron 21,163,051.24 hectáreas de naranja (*Citrus sinensis*) en su modalidad de riego y temporal, con un valor de \$641,026,369.01 (SIAP, 2017).

2.8.2.2 Situación regional de los cítricos

Nuevo León es conocido como un estado cítrícola, de tal manera que en el ciclo agrícola del año 2017 se sembraron 116,034.20 hectáreas de naranja (*Citrus sinensis*) en su modalidad de riego y temporal, con un valor de \$2,366,963.79. Ubicándose en los municipios de Anáhuac, Bustamante, Lampazos de Naranjo, Sabinas Hidalgo, Vallecillo, Villaldama, Agualeguas, Cerralvo, China y Ciénega de Flores (SIAP, 2017).

2.8.3 Aplicaciones industriales de la naranja (*Citrus sinensis*)

Las frutas cítricas, entre las que destaca la naranja (*Citrus sinensis*); tienen un alto valor comercial tanto en el mercado de productos frescos como en la industria alimentaria. La industria de procesamiento de cítricos se ha enfocado en la producción de jugos y aceites esenciales. Aproximadamente el 33% de la producción de cítricos en el mundo se utiliza para la industria de jugos y al menos el 50% de la masa de fruta entera es residuo. Claramente, esta enorme cantidad de residuos de cítricos generados se debe gestionar e industrializar adecuadamente, ya que tiende a constituir un grave problema ambiental (Padilla de la Rosa et al., 2018).

Sin embargo, las partes no comestibles de los cítricos también se pueden procesar para utilizar los nutrientes o los compuestos bioactivos, y convertirlos en productos de valor agregado para el diseño de alimentos saludables, suplementos nutricionales, agentes aromatizantes en el procesamiento de alimentos,

conservantes, bebidas saludables y energéticas. Además, las pulpas de cítricos secas se agregan como suplementos a la dieta de cereales para las vacas lecheras lactantes. Los fitoquímicos derivados de los desechos cítricos también se utilizan en formulaciones cosméticas para la piel, el cabello y las uñas, lociones antimicóticas y antibacterianas, jabones, perfumes y artículos de tocador (Mahato, Sharma, Sinha & Cho, 2018).

El utilizar residuos industriales de cáscaras de cítricos como la naranja tiene como ventaja principal el hecho de que son fácilmente disponibles y son una fuente barata de biomasa que se puede renovar (Singh, Singh, Kaur & Singh, 2020)

2.8.4 Composición nutricional de la naranja (*Citrus sinensis*)

Las frutas cítricas en general han sido reconocidas como un alimento importante e integradas como parte de nuestra dieta diaria, desempeñando un papel clave en el suministro de energía y nutrientes y en la promoción de la salud (Tabla 3). Tienen un bajo contenido de proteínas y muy poco contenido de grasa, además aportan principalmente carbohidratos, entre los que destacan la sacarosa, la glucosa y la fructosa. Además, son una buena fuente de fibra dietética, lo cual contribuye en la prevención de enfermedades gastrointestinales y a la reducción del colesterol circulante. La vitamina C, es el nutriente más abundante, así mismo son fuente de vitaminas B (tiamina, piridoxina, niacina, riboflavina, ácido pantoténico y folato) y contribuyen con fitoquímicos como carotenoides y flavonoides, los cuales son compuestos biológicos de vital importancia para la mejora de la salud humana debido a sus propiedades antioxidantes, la capacidad de los carotenos para convertirse en vitamina A (por ejemplo, β -criptoxantina) y la protección contra diversas enfermedades crónicas (Liu, Heying & Tanumihardjo, 2012).

Tabla 3. Composición nutrimental de la naranja. Recuperado de Department of Agriculture of the United States (USDA) (2018)

Nutriente	Unidades	Porción comestible (100g)	Cáscara de naranja (100g)
Proximal			
Agua	g	86.75	72.50
Energía	kcal	47	97
Proteínas	g	0.94	1.50
Lípidos totales	g	0.12	0.20
Carbohidratos ^b	g	11.75	25
Fibra total dietaria	g	2.4	10.6
Azúcares, total	g	9.35	--
Minerales			
Calcio	mg	40	161
Hierro	mg	0.10	0.80
Magnesio	mg	10	22
Fósforo	mg	14	21
Potasio	mg	181	212
Sodio	mg	0	3
Zinc	mg	0.07	0.25
Vitaminas			
Vitamina C	mg	53.2	136
Tiamina	mg	0.087	0.120
Riboflavina	mg	0.040	0.090
Niacina	mg	0.282	0.900
Vitamina B-6	mg	0.060	0.176
Folatos, total	µg	30	30
Vitamina A	IU	225	420
Vitamina E	mg	0.18	0.25
Lípidos			
Ácidos grasos saturados, total	g	0.015	0.024
Ácidos grasos monoinsaturados, total	g	0.023	0.036
Ácidos grasos polinsaturados, total	g	0.025	0.040
Ácidos grasos trans, total	g	0.000	0.000

^b Por diferencia

2.8.5 Naranja (*Citrus sinensis*) y compuestos fenólicos

Los frutos cítricos contienen diversos flavonoides, entre ellos se encuentra la naringina que les da el sabor amargo a los jugos. Otros flavonoides como la hesperidina y la eriodictina les dan a los jugos propiedades importantes.

La hesperidina es uno de los glucósidos más importantes contenidos en las naranjas (*Citrus sinensis*). Se encuentra tanto en la corteza como en la pulpa de la naranja dulce (*Citrus sinensis*) y en la naranja amarga (*C. aurantium*)., además aparece en las hojas, ramas y cortezas de los árboles cítricos. En las naranjas (*Citrus sinensis*) de tamaño pequeño y verdes, alcanza porcentajes muy elevados. Tiene un sabor insípido, es insoluble en agua caliente, poco soluble en alcohol y muy soluble en hidróxidos alcalinos. Además, con cloruro férrico produce un color rojo intenso si encuentra muy diluida y color casi negro a concentraciones elevadas (Primo, 2007).

La hesperidina (Figura 14) es un glucósido de flavanona, compuesto por una aglicona, hesperetina o metil eriodictyol y un disacárido adjunto. La hesperidina es, por lo tanto, una β -7-rutinosida de hesperetina (Garg, Garg, Zaneveld & Singla, 2001).

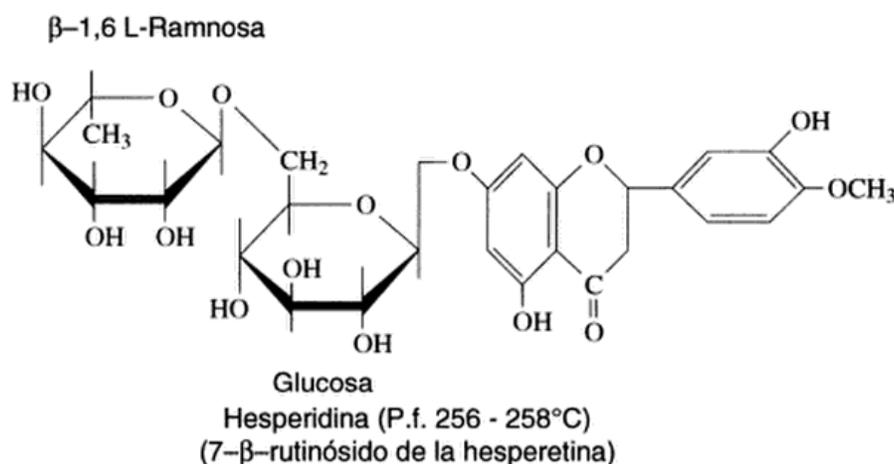


Figura 14. Estructura química de la hesperidina. Recuperado de Primo, (2007)

De acuerdo con Primo (2007) la hesperidina puede extraerse de las pieles trituradas de los frutos cítricos con cal para insolubilizar la pectina e hidróxido sódico al 23 % para solubilizar la hesperidina. La masa se prensa y se filtra. La hesperidina, disuelta por sus grupos fenólicos, cristaliza al llevar el extracto a pH ácido. El método puede servir para la recuperación de cualquier glucósido flavonoide. La hesperidina se puede recrystalizar, en formamida.

En las fábricas de concentrados de naranja (*Citrus sinensis*), la hesperidina existente en el zumo precipita en los tubos y paredes de los concentradores, donde aparece en forma de costra haciendo necesaria su limpieza periódica. La incrustación, se disuelve en forma de fenolato, haciendo circular NaOH. La hesperidina puede obtenerse de este subproducto. Sin embargo, hasta ahora no se ha obtenido ningún derivado con aplicaciones interesantes para dar lugar a un aprovechamiento industrial importante de este glucósido (Primo, 2007)

Es importante señalar también que el contenido de compuestos fenólicos de todas las plantas y frutos varía según la zona donde hayan sido sembrados (Peñarrieta, et al., 2014).

2.8.6 Propiedades antihipertensivas de la naranja (*Citrus sinensis*)

La evidencia epidemiológica y los estudios clínicos y preclínicos sugieren que los flavonoides presentes en el género *Citrus* influyen positivamente en los parámetros cardiometabólicos, previniendo enfermedades cardiovasculares (Testai & Calderone, 2017). Los flavonoides en particular son moléculas de polifenoles de bajo peso molecular que muestran una amplia gama de efectos biológicos, incluidos los efectos antiinflamatorios y antioxidantes (López-Carreras, Castillo, Muguera & Aleixandre, 2019).

Según la base de datos Phenol-Explorer, un solo vaso de jugo de naranja (150 ml) puede contener ≈90 mg de glucósidos de flavanona. La hesperidina (hesperetina-7-O-rutinósido) representa el 90% del total de flavanonas en la naranja (Morand *et al.*, 2010).

Morand *et al.* (2010) en un estudio en humanos de tipo aleatorio cruzado con placebo encontró que la presión arterial diastólica (PAD) fue significativamente

menor ($P < 0.05$) después de 4 semanas de consumo de jugo de naranja (500ml) o capsulas de hesperidina (146mg) que después del consumo del placebo (146mg almidón).

De igual manera Ikemura y colaboradores (2012) sugieren que los flavonoides podrían contribuir a efectos beneficiosos sobre los mecanismos de hipertensión y trombosis al aumentar la biodisponibilidad del óxido nítrico”, esto en base a los resultados obtenidos en un ensayo con ratas espontáneamente hipertensas propensas a apoplejía (SHRSP) donde la administración de dosis de 250 - 2000 mg de hesperidina disminuyó la presión arterial de SHRSP de manera dependiente de la dosis. Así mismo Wunpathe y colaboradores (2018) reportan que no hubo diferencia significativa entre un medicamento usado para bajar la presión arterial conocido como losartán (10 mg / kg.) y hesperidina con (40 mg / kg) en un ensayo con ratas inducidas a hipertensión mediante un modelo con dos riñones y oclusión parcial de una arteria renal, es decir, dos riñones y un clip (2K-1C).

Dadas las propiedades antihipertensivas de la naranja anteriormente señaladas, así como la contribución que el procesamiento industrial de estas mismas aporta a problemas ambientales debido a los residuos generados, en el presente estudio se planteará la evaluación *in vitro* del efecto antihipertensivo de extractos obtenidos de subproductos de naranja mediante la determinación del contenido de vitamina C, de la actividad antioxidante, del contenido de polifenoles totales, así como la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC. Así como la inhibición de ECA en la fracción bioaccesible de los extractos.

3. Hipótesis

Los extractos obtenidos de diferentes secciones de la naranja (*Citrus sinensis*) y sometidos a digestión *in vitro* tienen un efecto antioxidante y antihipertensivo en un modelo *in vitro* de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina

4. Objetivo general

Evaluar el potencial antihipertensivo, mediante la inhibición *in vitro* de la enzima convertidora de angiotensina y el perfil antioxidante, de los extractos obtenidos de diferentes partes de la naranja (*Citrus sinensis*) sometidos a digestión *in vitro*.

4.1 Objetivos específicos

- 1) Extraer mediante digestión *in vitro* las fracciones gástrica, intestinal y bioaccesible de extractos alcohólicos del jugo, cáscara y bagazo de la naranja (*Citrus sinensis*).
- 2) Analizar el perfil de polifenoles del extracto crudo y las fracciones de la digestión de los extractos naranja (*Citrus sinensis*).
- 3) Cuantificar la capacidad antioxidante y vitamina C total del extracto crudo y las fracciones de la digestión de los extractos de naranja (*Citrus sinensis*).
- 4) Evaluar la capacidad IECA de la fracción bioaccesible de los extractos de naranja (*Citrus sinensis*) mediante un ensayo *in vitro*.

5. Material y método

5.1 Diseño del estudio

El proyecto consistió en un estudio experimental transversal.

5.1.1 Esquema general de trabajo

En la figura 15 se presenta el esquema general metodológico para las determinaciones realizadas en los extractos de jugo, cáscara y bagazo de naranja.

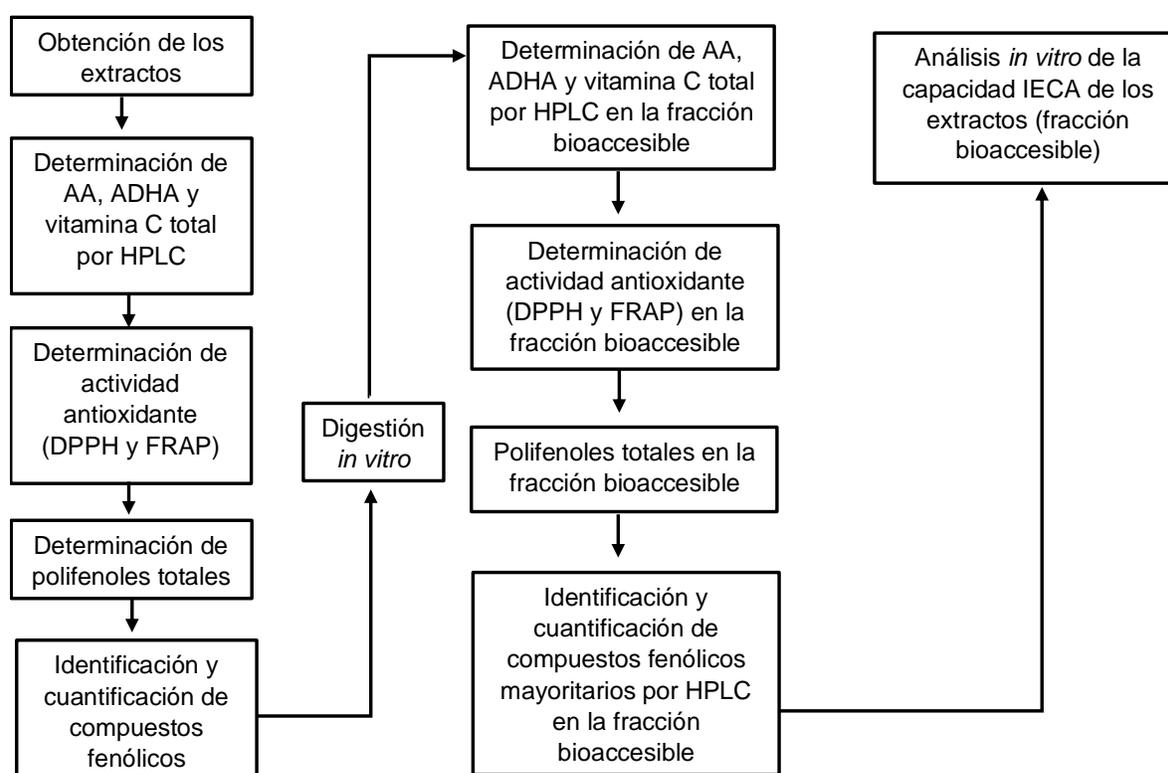


Figura 15. Esquema general de trabajo

5.2. Obtención de las muestras de naranja (*Citrus sinensis*)

Las naranjas (*Citrus sinensis*) Valencia se obtuvieron de diversos supermercados de Nuevo León, estas se lavaron cuidadosamente con agua corriente hasta que estén completamente limpias y se les retiró la cáscara.

5.3 Obtención de extractos

5.3.1 Estandarización

Para la obtención se realizaron pruebas preliminares para realizar la comparación del efecto de dos métodos de extracción: maceración de acuerdo con la metodología de Ordoñez-Gómez, Reátegui-Díaz & Villanueva-Tiburcio, (2018) y sonicación de acuerdo con la metodología de Safdar y colaboradores, (2017), así como el efecto de los solventes metanol al 80% y etanol (70% y 80%) en el contenido polifenoles totales y la actividad antioxidante por DPPH.

Después de analizar los resultados se optó por la técnica de extracción por sonicación con etanol al 80%, cuyo procedimiento se describe a continuación.

5.3.2 Extracto de jugo de naranja (*Citrus sinensis*)

Se procedió a la obtención del jugo por medio de un exprimidor manual, el cual permita separar el bagazo, cáscara y las semillas. Posteriormente se pesaron 5 gramos de jugo y se mezclaron en un procesador de alimentos con 45ml de etanol al 80%. De acuerdo con Safdar et al., 2017 la mezcla se llevó a un sonicador por 60 min a 45° C. Después se centrifugó a 3500 rpm por 15 min y se evaporó el sobrenadante a 45°C.

5.5.2 Extracto de bagazo de naranja (*Citrus sinensis*)

Del bagazo obtenido en la elaboración del extracto de jugo de naranja se pesaron 5 gramos, los cuales se mezclaron en un procesador de alimentos con 45ml de etanol al 80%. La mezcla se llevó a un sonicador por 60 min a 45°C. Después se centrifugó a 3500 rpm por 15 min y se evaporó el sobrenadante a 45°C.

5.3.3 Extracto de cáscara de naranja (*Citrus sinensis*)

De las cáscaras obtenidas en la elaboración del extracto de jugo de naranja se pesaron 5 gramos, los cuales se mezclaron en un procesador de alimentos con 45ml de etanol al 80%. La mezcla se llevó a un sonicador por 60 min a 45°. Después se centrifugó a 3500 rpm por 15 min y se evaporó el sobrenadante a 45°C.

5.4 Determinación de vitamina C en extractos de naranja

Para la determinación de ácido ascórbico se utilizó el método de Sánchez- Moreno et. al. 2003.

Se realizó una curva de calibración con ácido ascórbico (1 a 30 mg/100ml)

A 0.5 µl del extracto y se agregaron 400 µl de una solución de extracción (ácido metáfosforico 3% en solución de ácido acético al 8%), después se agitó por 15 min en un vortex, posteriormente se centrifugó a 10,000rpm por 5 min y se aforó el sobrenadante a 1 ml con agua destilada. Esta solución se dividió en 2 partes iguales (500 µl). Para la determinación de ácido ascórbico, una parte de la solución se filtró con membrana de celulosa de 0.45 µm y se analizó en HPLC en las condiciones establecidas. Para la determinación de AA total (ácido ascórbico + ácido dehidroascórbico), a la otra parte de la solución se le agregó 100 µl de ditiotreitól y se mantuvo a temperatura ambiente en oscuridad por 2 horas. Posteriormente se filtró con membrana de celulosa de 0.45 µm y se analizó en HPLC en las condiciones establecidas.

Los resultados fueron expresados como mg de vitamina C/100ml. El ácido dehidroascórbico se calculó por diferencia entre el contenido total de vitamina C y el ácido ascórbico total.

Condiciones del HPLC:

- Columna hypersil ODS 5 mm i.d (250 x 4.6 mm)
- Gradiente isocratico:
- Fase móvil H₂SO₄ 0.01% pH 2.5-2.6
- Velocidad de flujo: 1.0 ml/ml
- Detector de UV visible: 245 nm
- Volumen de inyección: 20 µl

5.5 Determinación de actividad antioxidante

5.5.1 DPPH

La determinación de actividad antioxidante DPPH se llevó a cabo siguiendo la metodología de Bondet et al., (1997) con modificaciones. Se realizó una curva patrón de trolox (100-1000µM).

En celdas para espectrofotómetro se añadió 25 µl de la concentración correspondiente de la curva más 975µl del reactivo DPPH. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 1 hora. Posteriormente se leyó la absorbancia a 515 nm. El análisis de las muestras de los extractos se realizó de la misma manera, pero se partió de una serie de diluciones (5mg/l, 10mg/l y 15 mg/l) de las muestras. Estas mediciones se realizaron contra un blanco, en el cual se sustituyó el volumen de la muestra por agua destilada.

La capacidad de los extractos para inhibir el radical DPPH se estimó usando la fórmula:

$$\% \text{ inhibición del radical DPPH} = \frac{\text{Abs. Control} - \text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Control}} \times 100$$

Fórmula 1. Porcentaje de inhibición del radical DPPH

La concentración para la inhibición del 50% (IC₅₀) se calculó mediante la ecuación de regresión lineal entre la concentración del extracto y el % de inhibición del radical DPPH. Se utilizó el intercepto y la pendiente de la línea de regresión lineal para calcular el valor de IC₅₀, aplicando la fórmula 2 (Ruiz Reyes, 2018).:

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{m}$$

Fórmula 2. Concentración inhibitoria media máxima

5.5.2 FRAP

La determinación de la actividad antioxidante FRAP se realizó siguiendo la metodología de Benzie y Strain, (1996).

Se realizó una curva de calibración con trolox (50-500 μM). En celdas para espectrofotómetro se añadió 30 μl de la concentración correspondiente de la curva más 90 μl de agua destilada y 900 μl del reactivo de FRAP (precalentado a 37°C). Se incubó por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se leyó la absorbancia a 593nm. El análisis de las muestras de los extractos se realizó de la misma manera, pero se partió de una dilución 1:3 para el extracto de jugo y 1:4 para los extractos de bagazo y cáscara.

La actividad antioxidante se expresó como μM equivalentes de trolox en base a la ecuación de la recta de la curva de calibración del material de referencia de trolox.

5.6 Análisis de la composición fenólica de los extractos obtenidos

5.6.1 Determinación de polifenoles totales.

La determinación de polifenoles totales en extractos de naranja se realizó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton, et al., 1999). Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (10-150 mg/l).

En celdas para espectrofotómetro se añadió 100 μl de la concentración correspondiente de la curva más 750 μl del reactivo de Folin 0.2N y 750 μl de solución de carbonato de sodio al 6%. Se dejó reposar por 90 min a temperatura ambiente y en oscuridad. El análisis de las muestras de los extractos se realizó de la misma manera, pero se partió de una dilución 1:10 de las muestras. Pasado el tiempo de reposo (desarrollo de color) se leyó la absorbancia a 760nm con un espectrofotómetro UV-VIS.

El contenido de fenoles de cada extracto se expresó como mg/100g de peso seco de la naranja, en base a la curva de calibración del material de referencia (ácido gálico), de donde proviene el término unidades de ácido gálico por 1000 gramos de extracto.

5.6.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC

Las muestras de los extractos crudos, así como la fracción bioaccesible de los mismos fueron analizadas sin hidrolizar (para cuantificar los compuestos fenólicos en forma de glucósidos) y posterior a la hidrólisis (para cuantificar las agliconas).

5.6.2.1 Escisión hidrolítica de los glicósidos de polifenoles

Previo al análisis por HPLC se realizó una hidrólisis ácida de los compuestos fenólicos con el fin de liberar la aglicona, siguiendo la metodología reportada por Taga, Miller y Pratt, (1984) con algunas modificaciones. Se tomaron alícuotas de 5ml de extracto agregando 7 ml de HCl- metanol 5M. Las muestras fueron cerradas herméticamente y calentadas a 100°C durante 45 minutos. Posteriormente, se añadieron 7 ml de agua y se agitó durante 60 segundos. La hidrólisis se llevó a cabo utilizando un embudo de separación y realizando lavados por tres ocasiones utilizando 9 ml de éter dietílico en cada una de ellas. La fase acuosa fue descartada y las fases etéreas fueron combinadas y llevadas a sequedad. Por último, el residuo fue resuspendido en 1 ml de metanol 70% grado HPLC para su posterior análisis en las siguientes 24 horas.

5.6.2.2 Análisis por HPLC

La identificación de ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos se determinó mediante cromatografía líquida de alto eficacia (HPLC) según el método descrito por M'hiri, Ioannou, Mihoubi Boudhrioua & Ghoul, (2015) con algunas modificaciones. Las muestras de extractos filtradas a través de un filtro de membrana de 0,45 µm se inyectaron en el sistema de HPLC equipado con una bomba de LC binaria 250, un detector de UV / VIS con dimensiones internas de 4-6 mm x 250 mm, 5 µm. La fase móvil consistió en un gradiente lineal con una combinación de solvente A (agua-ácido acético 3%) y solvente B (metanol- ácido acético). El siguiente programa de gradiente se usó para la separación: 5 min, 10% B; 55 min 100% B; 57 min, 10% B. Los análisis se realizaron a un caudal de 1 ml / min, con una temperatura horno de columna de 40°C, con el detector de UV establecido a 280 nm y 350 nm y un volumen de inyección de muestra de 20 µL. Los analitos se identificaron comparando los tiempos de retención y las muestras

de picos con estándares de polifenol (se determinó la subsiguiente cuantificación de compuestos fenólicos Sigma Aldrich; hesperidina, naringenina, kaempferol, mirecitina, hespertina, narirutina).

Todas las operaciones de cromatografía se llevaron a cabo a temperatura ambiente y por triplicado. El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se calculó en función de la desviación estándar de las respuestas y la pendiente utilizando tres curvas de calibración independientes.

5.6.3 Análisis estadístico

Los experimentos fueron realizados por triplicado y el análisis de los datos se analizaron mediante estadística descriptiva.

5.7 Bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos

Para la determinación de la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos se siguió la metodología de Gil-Izquierdo, et al. (2001) (Figura 16).

El porcentaje de bioaccesibilidad (Fórmula 3) se determinó dividiendo el contenido de compuestos bioactivos en la fracción bioaccesible entre los compuestos bioactivos en el extracto crudo.

$$\% \text{ Bioaccesibilidad} = \frac{\text{Compuestos bioactivos en fracción bioaccesible}}{\text{Compuestos bioactivos en el extracto}} \times 100$$

Fórmula 3. Porcentaje de bioaccesibilidad de compuestos bioactivos

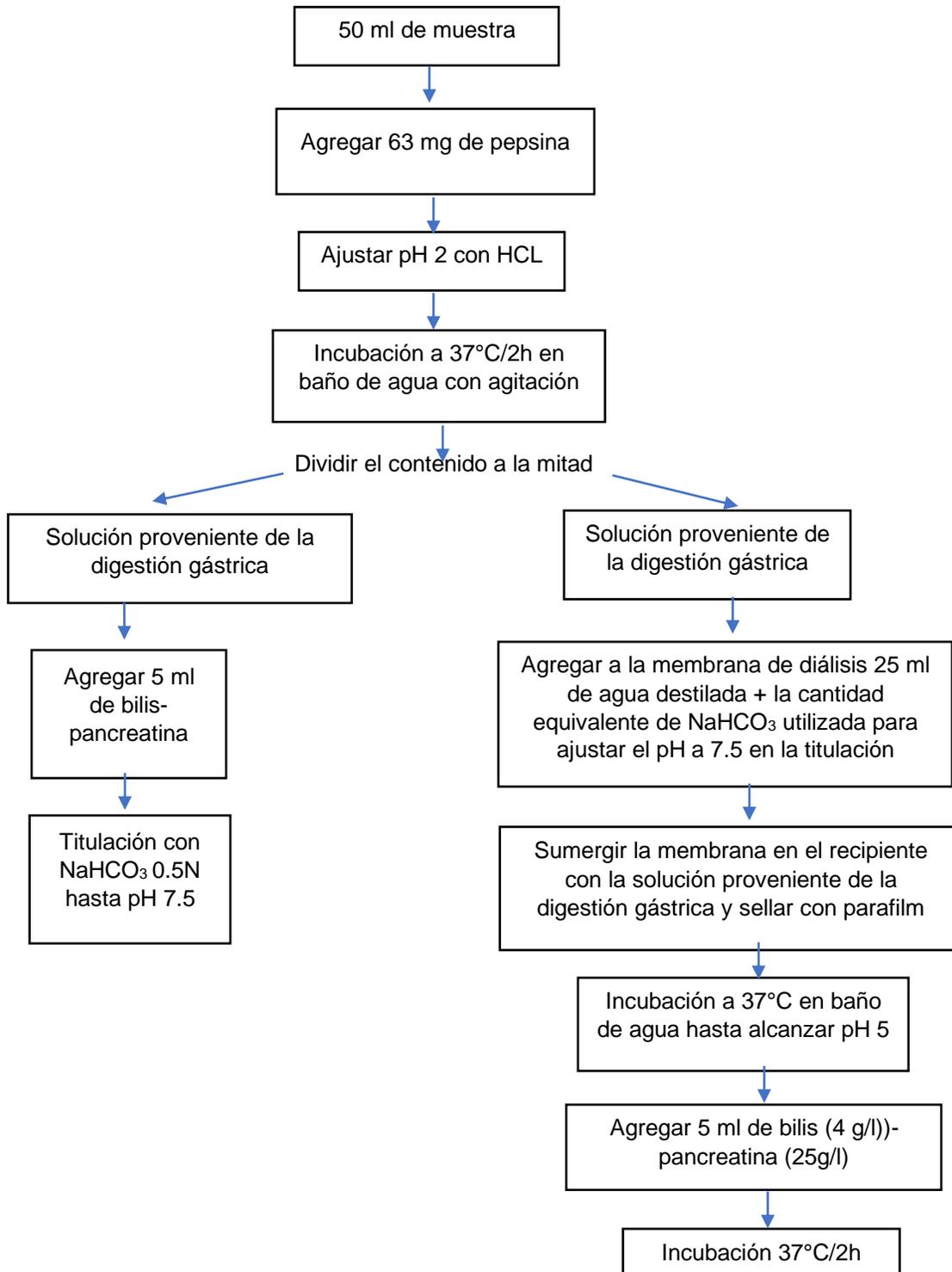


Figura 16. Diagrama metodología digestión *in vitro*. Adaptado de Gil-Izquierdo, et al. (2001)

5.8 Análisis de la capacidad IECA mediante ensayo *in vitro*.

El análisis se realizó siguiendo la metodología propuesta por Wu y colaboradores (2002), basado en la cuantificación de ácido hipúrico mediante la actividad que ejerce la enzima convertidora de angiotensina (ECA) sobre el sustrato Hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL).

El ensayo consistió en una simulación *in vitro* de la reacción enzimática en el organismo utilizando los extractos de la muestra de naranja (*Citrus sinensis*), solución de ECA de pulmón de conejo (Sigma-Aldrich) y solución de sustrato de Hipuril-L-histidil-L-leucina (Sigma-Aldrich).

- a) Los tubos se pre-incubaron por separado a 37°C durante 10 min
- Tubo con 10 µL de muestra (extracto crudo, extracto bioaccesible, compuesto fenólico)
 - Tubo con 10 µL de solución 40 mU de enzima convertidora de angiotensina de pulmón de conejo* (Sigma-Aldrich)
 - Tubo con 40 µL de solución 2 mM de sustrato Hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL)* (Sigma-Aldrich).

*La enzima y el sustrato fueron disueltos en buffer de boratos (100 mM) (Sigma-Aldrich) con NaCl (300 mM) (CTR) ajustado a pH 8.3.

- b) Posteriormente los tubos se incubaron a 37°C con agitación a 300 rpm
- Tubo con muestra (extracto), ECA y HHL
 - Tubo con muestra, buffer de boratos (control -) y HHL
 - Tubo con captopril (control +), ECA y HHL
 - Tubo con estándar compuesto fenólico (hesperidina, hesperitina y naringenina), ECA y HHL
- c) La reacción se detuvo con HCl 2N
- d) La solución se filtró con una jeringa de nylon de 0.45 µm
- e) Cuantificación del ácido hipúrico mediante HPLC empleando una curva de calibración (25-1000µl) del estándar.

Condiciones:

- Fase estacionaria: Columna Synchronis C18-RP (150mm x 4.6 mm;5µm) (Thermo Scientific)
- Fase móvil:
 - A) Ácido trifluoroacético al 0.05% en agua (Sigma-Aldrich).
 - B) Ácido trifluoroacético al 0.05% en acetonitrilo (TEDIA)
 - Solución isocrática de 75% de A y 25% de B

El tiempo de corrida fue de 15 minutos, con un flujo de 0.70 mL/min y volumen de inyección de 20 µL.

Cada extracto (jugo, cáscara y bagazo) se analizó en tres concentraciones: (100%:0.0467 g/ml, 75%: 0.0350 g/ml y 50%: 0.0234 g/ml). Para fines de comparación los siguientes compuestos fenólicos puros: hesperidina, naringenina, hesperitina y la mezcla de estos, fueron analizados con el mismo tratamiento que los extractos bioaccesibles de naranja. La concentración de estos compuestos fenólicos puros fue elegida en base los resultados del contenido de compuestos fenólicos obtenidos de la fracción bioaccesible de los extractos, por lo que para hesperidina se eligió la concentración 0.0893mg/ml, para naringenina 0.0320mg/ml y para la hesperitina 0.0853mg/ml, estas concentraciones fueron también diluidas al 75 y 50%.

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la ecuación (Fórmula 4) de Hernández-Ledesma, Martín-Álvarez y Pueyo, (2003):

$$\% \text{ IECA} = 100[A-(B-C)]/A$$

Fórmula 4. Porcentaje de inhibición IECA

A: absorbancia en presencia de la enzima convertidora de angiotensina

B: Absorbancia en presencia de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y el inhibidor

C: Absorbancia del blanco de la muestra

Se procedió a realizar el gráfico de la concentración del extracto/compuesto fenólico puro (%) vs % inhibición ECA y se calculó de la concentración necesaria para inhibir la actividad enzimática en un 50% (IC₅₀).

5.8.1 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 15.0. Se revisó si se cumplía con los criterios de normalidad y homocedasticidad, los datos se analizaron mediante ANOVA y para establecer diferencias entre los extractos de naranja (*Citrus sinensis*) con los controles, con un valor de significancia de $p \leq 0.05$

5.9 Implicaciones de bioseguridad

En esta investigación no se utilizaron dispositivos generadores de radiaciones ionizantes y electromagnéticas, isotopos radioactivos, microorganismos patógenos o material biológico que los contenga y otros procedimientos que puedan establecer un riesgo para la salud.

6. Resultados

6.1 Métodos de extracción. Pruebas preliminares

Se realizaron pruebas preliminares para evaluar el efecto de dos métodos diferentes (maceración y sonicación) en el contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante (Tablas 4 y 5).

El contenido polifenoles totales obtenido por sonicación en el extracto crudo de jugo fue un 15.08% mayor al obtenido por maceración. En el extracto de bagazo se obtuvieron mejores resultados con la extracción por maceración. Sin embargo, en el extracto de cáscara la extracción por sonicación con etanol al 80% fue 13.62% mayor a la extracción por maceración.

Con respecto a la actividad antioxidante por DPPH, en la muestra de jugo los resultados de la extracción por maceración fueron 7.37% mayores a los de extracción por sonicación. En el extracto de bagazo el contenido de polifenoles obtenido por ambos métodos fue muy similar. Sin embargo, en el extracto de cáscara los resultados obtenidos con sonicación con etanol al 70% y 80% fueron mayores en un 27.86% y 8.63%, respectivamente, mayores a los métodos de extracción de extracción por maceración.

Tabla 4. Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante en muestra de jugo y en los extractos obtenidos por maceración

Muestra	Polifenoles totales (mg/100g)	% Inhibición del radical DPPH
Jugo	368.27±9.42	94.15±0.21
Bagazo (metanol 80%)	962.31±14.62	64.43±1.02
Cascara (metanol 80%)	1133.46±8.46	76.25±0.19

Todos los resultados son expresados como media ± DE de tres repeticiones.

Tabla 5. Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante en muestra de jugo y en los extractos obtenidos por sonicación

Muestra	Polifenoles totales (mg/100g)	% Inhibición del radical DPPH
Jugo	423.79±33.45	87.69±0.20
Bagazo (etanol 70%)	871.21±11.21	64.50±3.81
Bagazo (etanol 80%)	311.21±10.86	61.73±1.91
Cascara (etanol 70%)	1090.69±52.41	97.49±0.16
Cascara (etanol 80%)	1287.8±12.22	82.83±0.26

Todos los resultados son expresados como media ± DE de tres repeticiones.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en estas pruebas preliminares, así como el tiempo de extracción de cada técnica se optó por elegir la extracción por sonicación con etanol al 80% para realizar los extractos finales para los ensayos siguientes, esto con el fin de priorizar la rapidez de los análisis.

6.2 Rendimiento de los extractos

Después de haber obtenido los resultados preliminares y elaborar los extractos con jugo, cáscara y bagazo por sonicación para análisis posteriores, se calculó el rendimiento de los extractos, en los que se usaron las mismas cantidades y se obtuvieron las mismas proporciones presentadas en la tabla 6.

Tabla 6. Rendimiento obtenido en los extractos

Volumen solvente inicial (ml)	Muestra (g)	Volumen final (ml)	Rendimiento (g/ml)
1800	200	360	0.56

De manera que hay 0.56g de jugo, cáscara o bagazo, según sea el caso por mililitro de extracto.

6.3 Vitamina C

El ácido ascórbico (AA) se oxida reversiblemente a ácido dehidroascórbico (DHAA), al exponerlo al oxígeno, el cual también ejerce una eficacia vitamínica. Según la mayoría de los informes, la eficacia de la vitamina C se pierde con la degradación irreversible de DHAA a ácido 2,3-dicetogulónico (Aschoff et al. 2015). En consecuencia, los niveles de AA y DHAA fueron monitoreados en nuestro estudio, los resultados de estas determinaciones se presentan en las tablas 7, 8 y 9. Donde el extracto crudo es presentado como control y la fracción bioaccesible es presentada como compuestos bioaccesibles de los extractos.

6.3.1 Vitamina C total

El contenido de vitamina C total en los extractos crudos fue significativamente mayor en el jugo, siendo casi el doble del obtenido con respecto a la cáscara y 7% mayor al obtenido en el extracto de bagazo. También puede observarse que el contenido de vitamina C va disminuyendo al avanzar en las etapas de la digestión *in vitro*. Sin embargo, aunque la fracción bioaccesible de la vitamina C es mayor en el extracto de jugo, es el extracto de cáscara el que presenta el mayor porcentaje de bioaccesibilidad (Figura 17B)

Tabla 7. Determinación de vitamina C total en extractos de jugo, cáscara y bagazo de naranja antes y después de la digestión *in vitro*

Vitamina C total en extractos (mg/100g)			
Fase de digestión <i>in vitro</i>	Jugo de naranja	Cáscara de naranja	Bagazo de naranja
Control	51.47 ± 0.00 ^a	22.86 ± 1.47 ^c	48.11 ± 0.14 ^b
Fase gástrica	32.86 ± 1.52 ^a	15.25 ± 0.26 ^c	22.18 ± 1.29 ^b
Fase Intestinal	25.52 ± 0.25 ^a	14.11 ± 1.57 ^b	14.07 ± 0.19 ^b
Compuestos bioaccesibles	8.36 ± 0.25 ^a	5.71 ± 0.38 ^c	7.05 ± 0.42 ^b

Todos los resultados son expresados como media ± DE de tres repeticiones: ^{a-c}. Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

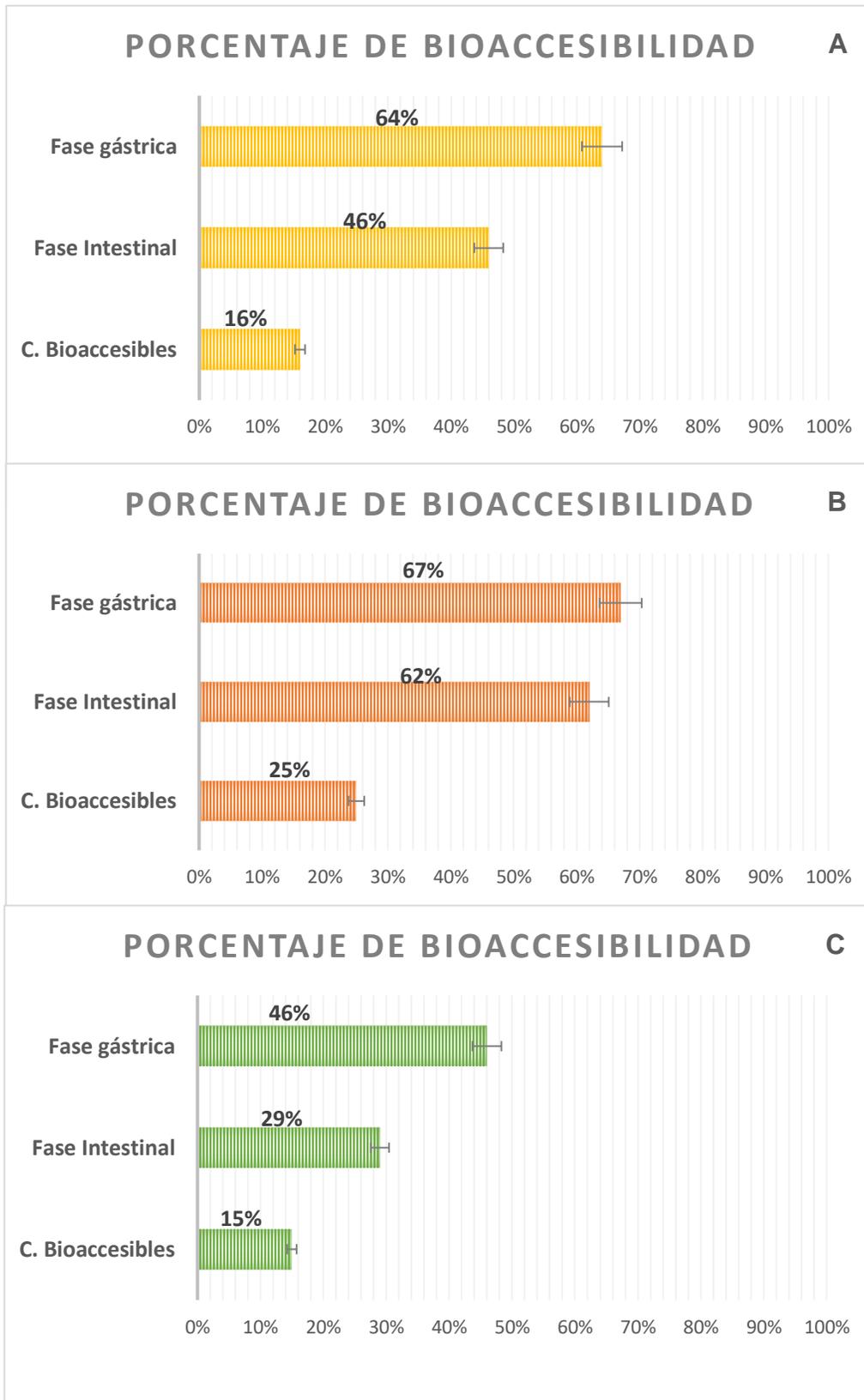


Figura 17. Porcentajes de bioaccesibilidad de vitamina C total de los extractos de jugo (A), cáscara (B) y bagazo de naranja (C)

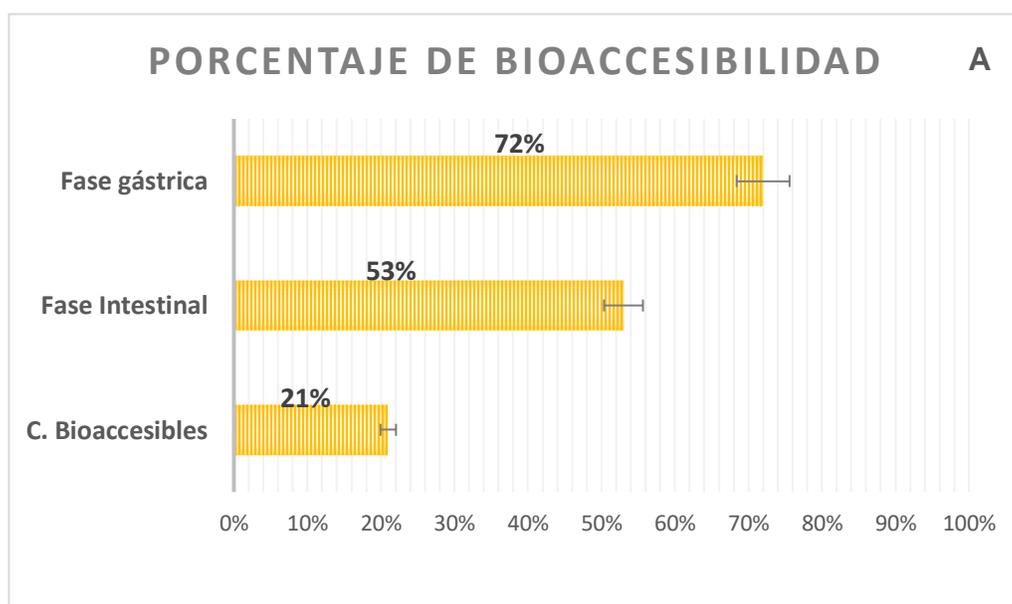
6.3.2 Ácido ascórbico

El contenido de ácido ascórbico en los extractos crudos fue mayor en el jugo y bagazo, siendo 64.77% y 83.68% mayor al obtenido en el extracto de cáscara, respectivamente. También puede observarse como el contenido de ácido ascórbico va disminuyendo en las siguientes etapas de la digestión *in vitro*. Sin embargo, aunque la fracción bioaccesible del ácido ascórbico es mayor en el extracto de jugo (6.67mg/100g), es el extracto de cáscara el que presenta el mayor porcentaje de bioaccesibilidad (Figura 18B).

Tabla 8. Determinación de ácido ascórbico en extractos de jugo, cáscara y bagazo de naranja antes y después de la digestión *in vitro*.

Ácido ascórbico en extractos (mg/100g)			
Fase de digestión <i>in vitro</i>	Jugo de naranja	Cáscara de naranja	Bagazo de naranja
Control	31.90 ± 0.03 ^b	19.36 ± 0.85 ^c	35.56 ± 0.08 ^a
Fase gástrica	22.96 ± 2.41 ^a	12.61 ± 0.17 ^b	13.79 ± 0.72 ^b
Fase Intestinal	16.88 ± 0.30 ^a	12.09 ± 0.77 ^b	11.51 ± 0.22 ^b
Compuestos bioaccesibles	6.67 ± 0.00 ^a	5.12 ± 0.67 ^{a,b}	5.82 ± 0.32 ^b

Todos los resultados son expresados como media ± DE de tres repeticiones. a-c, Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).



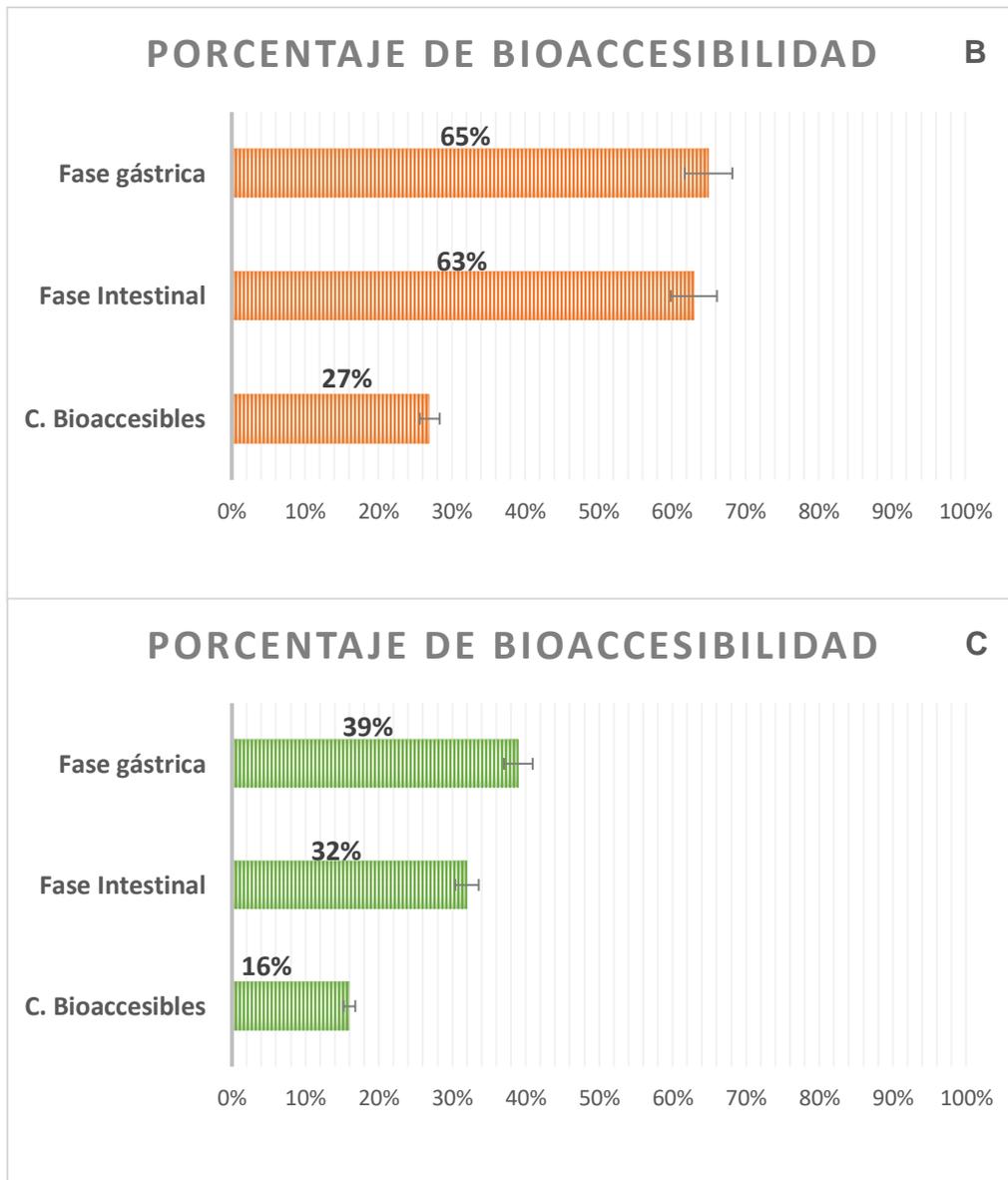


Figura 18. Porcentajes de bioaccesibilidad de ácido ascórbico de los extractos de jugo (A), cáscara (B) y bagazo de naranja (C)

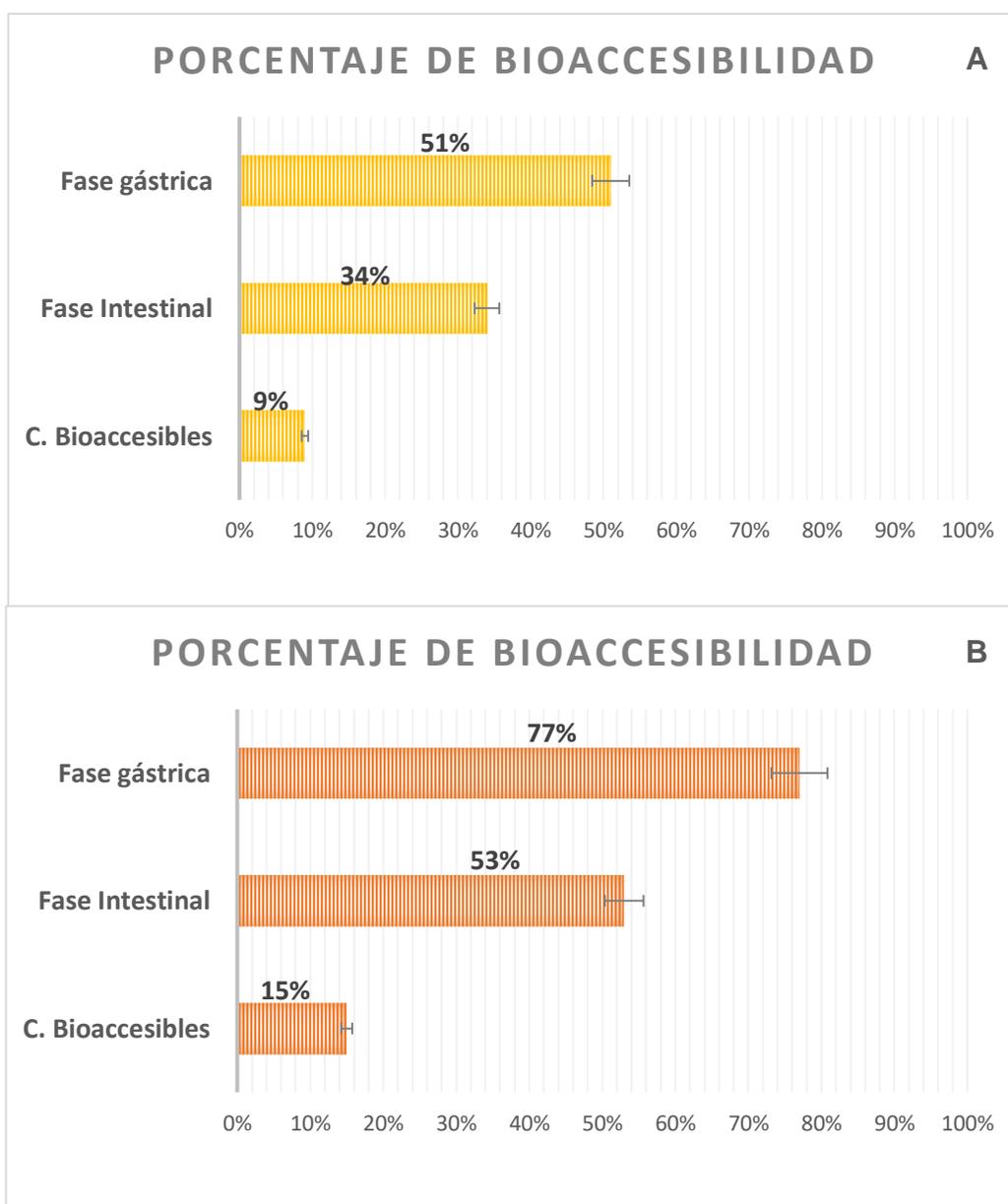
6.3.3 Ácido dehidroascórbico

El contenido de ácido dehidroascórbico en los extractos crudos fue mayor en el jugo, (19.57 mg/100ml). También puede observarse como el contenido de ácido dehidroascórbico va disminuyendo en las siguientes etapas de la digestión *in vitro*. Sin embargo, aunque la fracción bioaccesible del ácido dehidroascórbico es mayor en el extracto de jugo (1.69 mg/100ml), es el extracto de cáscara el que presenta el mayor porcentaje de bioaccesibilidad (16.9%) (Figura 19B).

Tabla 9. Determinación de ácido dehidroascórbico en extractos de jugo, cáscara y bagazo de naranja antes y después de la digestión *in vitro*.

Ácido dehidroascórbico en extractos (mg/100g)			
Fase de digestión <i>in vitro</i>	Jugo de naranja	Cáscara de naranja	Bagazo de naranja
Control	19.57 ± 0.03 ^a	3.50 ± 0.87 ^c	12.44 ± 0.16 ^b
Fase gástrica	9.90 ± 3.93 ^a	2.64 ± 0.23 ^b	8.39 ± 1.11 ^a
Fase Intestinal	6.64 ± 0.05 ^a	2.03 ± 1.61 ^b	2.56 ± 0.11 ^b
Compuestos bioaccesibles	1.69 ± 0.25 ^a	0.59 ± 0.57 ^a	1.23 ± 0.10 ^a

Todos los resultados son expresados como media ± DE de tres repeticiones. ^{a-c}. Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).



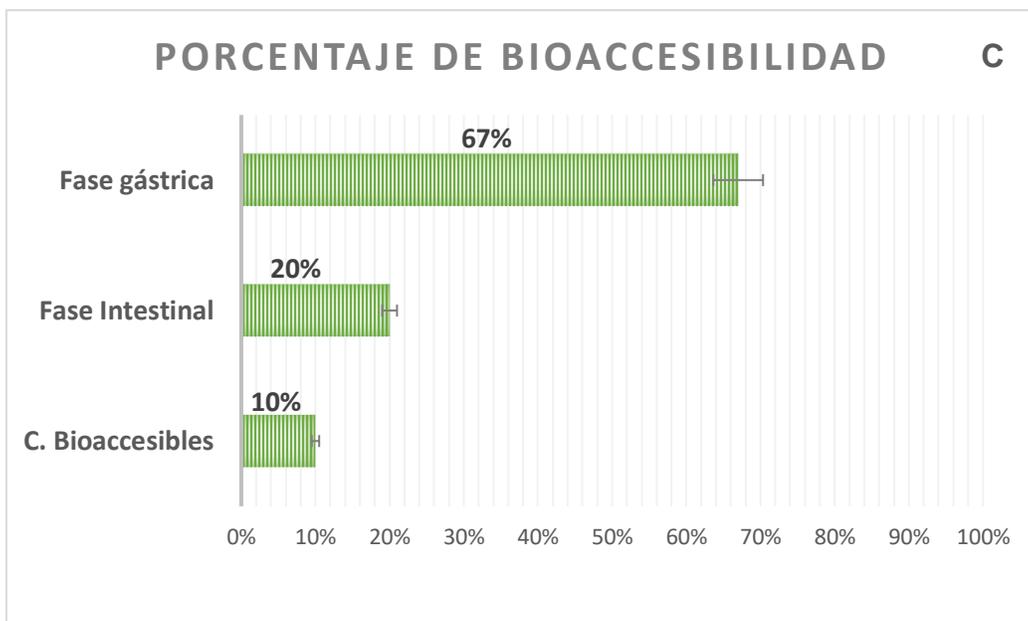


Figura 19. Porcentajes de bioaccesibilidad de ácido dehidroascórbico de los extractos de jugo (A), cáscara (B) y bagazo de naranja (C)

6.4 Polifenoles totales

En la tabla 10 se presenta el contenido de polifenoles totales de los extractos donde se observa que el contenido en el extracto de cáscara (281.84 mg/100g) fue mayor al obtenido en los extractos de jugo y bagazo. Así mismo, fue el extracto de cáscara el que presentó mayor porcentaje de bioaccesibilidad (38%) (Figura 20B).

Tabla 10. Determinación de polifenoles totales en extractos de jugo, cáscara y bagazo de naranja antes y después de la digestión *in vitro*.

Polifenoles totales en extractos (mg GAE/100g)			
Fase de digestión <i>in vitro</i>	Jugo de naranja	Cáscara de naranja	Bagazo de naranja
Control	170.10 ± 1.4 ^b	281.84 ± 20.4 ^a	156.85 ± 48.3 ^b
Fase gástrica	156.67 ± 1.6 ^b	269.79 ± 30.6 ^a	119.13 ± 3.6 ^c
Fase Intestinal	135.23 ± 4.0 ^b	257.20 ± 13.5 ^a	111.80 ± 3.7 ^c
Compuestos bioaccesibles	61.95 ± 4.2 ^b	106.00 ± 13.7 ^a	48.70 ± 3.6 ^b

Miligramos equivalentes de ácido gálico/100g (mg GAE) Todos los resultados son expresados como media ± DE de tres repeticiones. ^{a-c}. Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

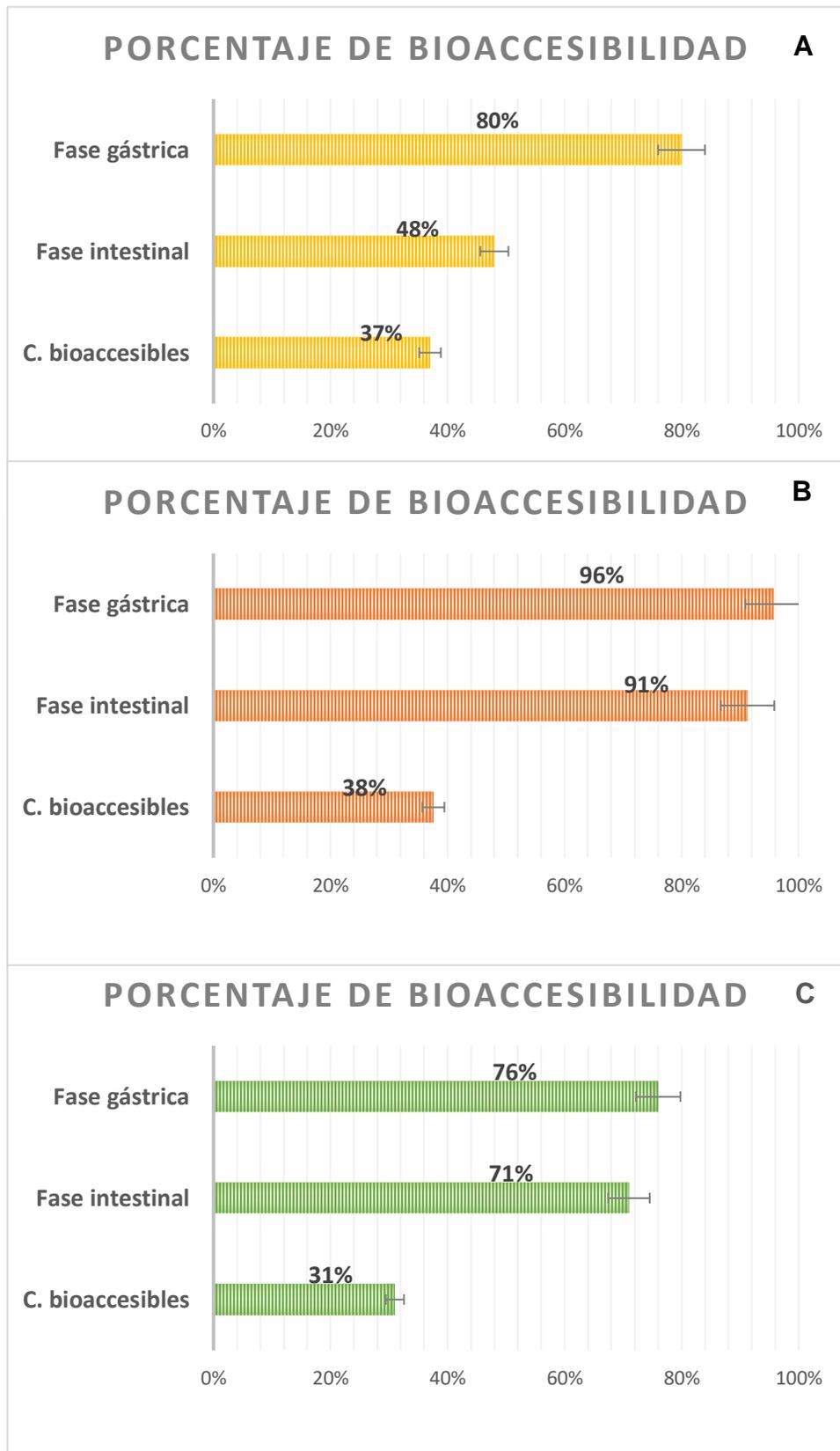


Figura 20. Porcentajes de bioaccesibilidad de polifenoles totales de los extractos de jugo (A), cáscara (B) y bagazo de naranja (C)

6.5 Actividad antioxidante

6.5.1 DPPH

Extracto crudo

El valor IC_{50} (concentración requerida para inhibir el 50% de los radicales libres para el extracto crudo de jugo no alcanzó los valores de prueba analizados, ya que la mayor concentración evaluada (15mg/l) fue 15.3% al valor IC_{50} .

El valor IC_{50} obtenido para el extracto crudo de cáscara es cercano a la concentración de prueba analizada de los extractos de 15mg/l (Figura 21). Por lo que el porcentaje de inhibición de esta concentración sería óptimo para el extracto de cáscara, sin embargo, esta concentración solo sería la mitad de la requerida por el extracto de bagazo, es decir, el valor IC_{50} del extracto crudo de bagazo es 32.82 mg/l (Tabla 11).

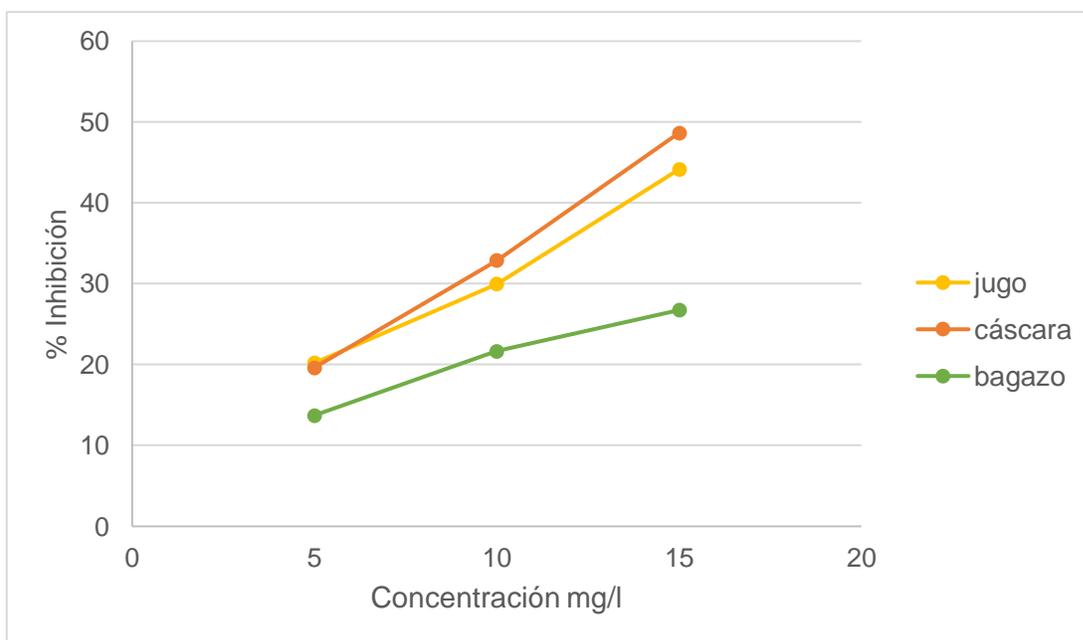


Figura 21. Porcentaje de inhibición del radical DPPH

Tabla 11. Actividad antioxidante DPPH en extractos crudos de naranja

Extracto crudo	IC₅₀ (mg/l)
Jugo	17.78±1.07 ^a
Cáscara	15.62±0.58 ^a
Bagazo	32.82±2.40 ^b

Todos los resultados son expresados como media ± DE de tres repeticiones^{a-b}. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Fracción bioaccesible

El porcentaje de inhibición de la fracción bioaccesible del extracto de jugo fue un 30% menor a la presente en la concentración de 5mg/l del extracto crudo (Tabla 12). Sin embargo, el porcentaje de inhibición de la fracción bioaccesible de los extractos de cáscara y bagazo era cercana a la presente en una concentración de 10mg/l de los extractos crudos.

Tabla 12. Actividad antioxidante DPPH en la fracción bioaccesible de extractos de naranja

Fracción bioaccesible	% Inhibición DPPH
Jugo	14.01±1.90 ^b
Cáscara	29.81±3.51 ^a
Bagazo	22.94±5.50 ^a

Todos los resultados son expresados como media ± DE de tres repeticiones^{a-b}. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

6.5.2 FRAP

De acuerdo con los resultados del análisis FRAP (Tabla 13), el extracto con mayor actividad antioxidante es el extracto de cáscara con un valor de 624.7 μ M TE/100g, el cual es 59% mayor al extracto de jugo y el extracto de bagazo tuvo un contenido 14.5% mayor al extracto de jugo. En la fracción bioaccesible la actividad

antioxidante FRAP del extracto de cáscara fue 147.7% mayor que en el extracto de bagazo, el cual fue 49.9% mayor que el extracto de jugo.

Por su parte, el porcentaje de bioaccesibilidad (Figura 22) del extracto de cáscara fue 80% mayor que el extracto de bagazo, el cual fue 25% mayor que el extracto de jugo.

Tabla 13. Actividad antioxidante FRAP en extractos de naranja. μM de TE*

	Jugo	Cáscara	Bagazo
Extracto crudo	392.38 \pm 102.38 ^c	624.70 \pm 53.33 ^a	458.76 \pm 112.64 ^b
Fracción bioaccesible	45.34 \pm 8.63 ^c	168.35 \pm 2.45 ^a	67.97 \pm 9.91 ^b

μM equivalente de Trolox/100ml (μM de TE). Todos los resultados son expresados como media \pm DE de tres repeticiones. ^{a-c}. Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

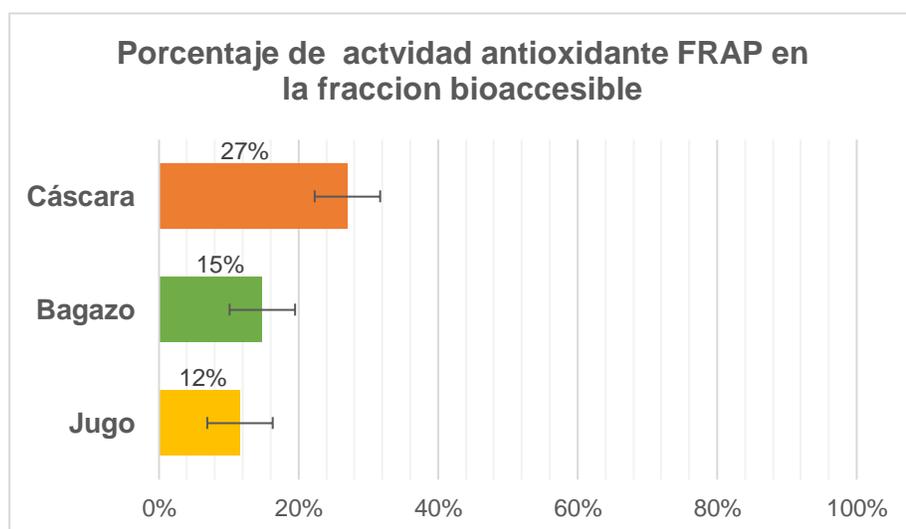


Figura 22. Porcentajes de actividad antioxidante FRAP en la fracción bioaccesible de los extractos de cáscara, bagazo y jugo de naranja

6.6 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC

Cáscara

El contenido de compuestos fenólicos en el extracto crudo de cáscara (Tabla 14) fue significativamente diferente ($p>0.05$) al presentado en la fracción bioaccesible, es decir, después de la digestión *in vitro*.

El contenido de glucósidos en el extracto crudo de cáscara (191.94 mg/100g) disminuyó un 89% después de la digestión *in vitro* (21.3 mg/100g), mientras que el contenido de agliconas de la fracción bioaccesible disminuyó un 51% con respecto al contenido presentado antes de la digestión *in vitro*. En general el porcentaje de bioaccesibilidad fue menor en los glucósidos con respecto a las agliconas.

Tabla 14. Caracterización de compuestos fenólicos en extracto de cáscara de naranja

Compuestos Fenólicos (mg/100g)		Cáscara extracto crudo	Total	Cáscara Compuestos bioaccesibles	Total	% Bioaccesibilidad
Glucósidos	NARTIRUTINA	35.46±0.95	191.94	5.22±0.33	21.3	14.72
	HESPERIDINA	156.48±6.40		16.08±1.08		10.28
Agliconas	QUERCETINA	0.98±0.07	9.06	0.69±0.01	4.42	70.41
	NARINGENINA	4.02±0.68		1.08±0.13		26.87
	HESPERITINA	3.00±0.58		1.75±0.12		58.33
	KAEMPFEROL	1.06±0.02		0.90±0.08		84.91

Todos los resultados son expresados como media ± DE de tres repeticiones.

Jugo

El contenido de compuestos fenólicos en el extracto crudo de jugo (Tabla 15) fue significativamente diferente ($p > 0.05$) al presentado en la fracción bioaccesible, es decir, al encontrado después de la digestión *in vitro*.

El contenido de glucósidos en el extracto crudo de jugo (36.78 mg/100g) disminuyó un 91% después de la digestión *in vitro* (3.16 mg/100g), mientras que el contenido de agliconas de la fracción bioaccesible disminuyó un 7.7% con respecto al contenido presentado antes (4.52 mg/100g) de la digestión *in vitro*. En general el porcentaje de bioaccesibilidad fue menor en los glucósidos con respecto a las agliconas.

Tabla 15. Caracterización de compuestos fenólicos en extracto de jugo de naranja

Compuestos Fenólicos (mg/100g)		Jugo extracto crudo	Total	Jugo Compuestos bioaccesibles	Total	% Bioaccesibilidad
Glucósidos	NARTIRUTINA	11.70±1.12	36.78	2.66±0.09	3.16	22.74
	HESPERIDINA	25.08±1.20		0.50±0.37		1.99
Agliconas	QUERCETINA	0.74±0.02	4.52	0.68±0.01	4.17	91.89
	NARINGENINA	1.08±0.00		0.95±0.09		87.96
	HESPERITINA	1.80±0.00		1.67±0.09		92.78
	KAEMPFEROL	0.90±0.02		0.87±0.02		96.67

Todos los resultados son expresados como media ± DE de tres repeticiones.

Bagazo

El contenido de compuestos fenólicos en el extracto crudo de bagazo (Tabla 16) fue significativamente diferente ($p>0.05$) al presentado en la fracción bioaccesible, es decir, al presente después de la digestión *in vitro*.

El contenido de glucósidos en el extracto crudo de bagazo (60.96 mg/100g) disminuyó un 86% después de la digestión *in vitro* (8.42 mg/100g), mientras que el contenido de agliconas de la fracción bioaccesible disminuyó un 43% con respecto al contenido presentado antes (7.76 mg/100g) de la digestión *in vitro*. En general el porcentaje de bioaccesibilidad fue menor en los glucósidos con respecto a las agliconas.

Tabla 16. Caracterización de compuestos fenólicos en extracto de bagazo de naranja

Compuestos Fenólicos (mg/100g)		Bagazo extracto crudo	Total	Bagazo Compuestos bioaccesibles	Total	% Bioaccesibilidad
Glucósidos	NARTIRUTINA	38.88±3.14	60.96	7.70±0.34	8.42	19.80
	HESPERIDINA	22.08±2.13		0.72±0.03		3.26
Agliconas	QUERCETINA	0.80±0.02	7.76	0.69±0.01	4.42	86.25
	NARINGENINA	1.26±0.00		1.08±0.00		85.71
	HESPERITINA	1.80±0.00		1.76±0.09		97.78
	KAEMPFEROL	3.90±5.20		0.89±0.01		22.82

Todos los resultados son expresados como media ± DE de tres repeticiones.

De manera general, el contenido de compuestos fenólicos en forma de glucósidos en el extracto crudo de cáscara (191.94 mg/100g) solo fue significativamente ($p>0.05$) mayor al presentado en el extracto crudo de jugo (36.78mg/100g). Está misma tendencia se presentó en la fracción bioaccesible, donde el contenido de glucósidos en el extracto de cáscara (17.28 mg/100g) únicamente fue significativamente ($p>0.05$) mayor al presentado en el extracto de jugo (3.32 mg/100g).

En cuanto al contenido del agliconas el extracto crudo de cáscara fue el que presentó mayor contenido (9.6 mg/100g) sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con el contenido presentado en los extractos de jugo (4.52mg/100g) y bagazo (7.56 mg/100g). Esta misma tendencia se presentó en la fracción bioaccesible donde tampoco se encontraron diferencias significativas en el contenido de agliconas de las tres muestras.

Los extractos de jugo y bagazo presentaron mayor porcentaje de bioaccesibilidad (Figura 23) en la mayoría de los compuestos fenólicos (hesperitina, naringenina, quercetina, narirutina) con excepción del kaempferol, donde el extracto de cáscara fue 62% mayor al extracto de bagazo y la hesperidina, donde el extracto de cáscara fue 5% mayor al extracto de jugo y bagazo.

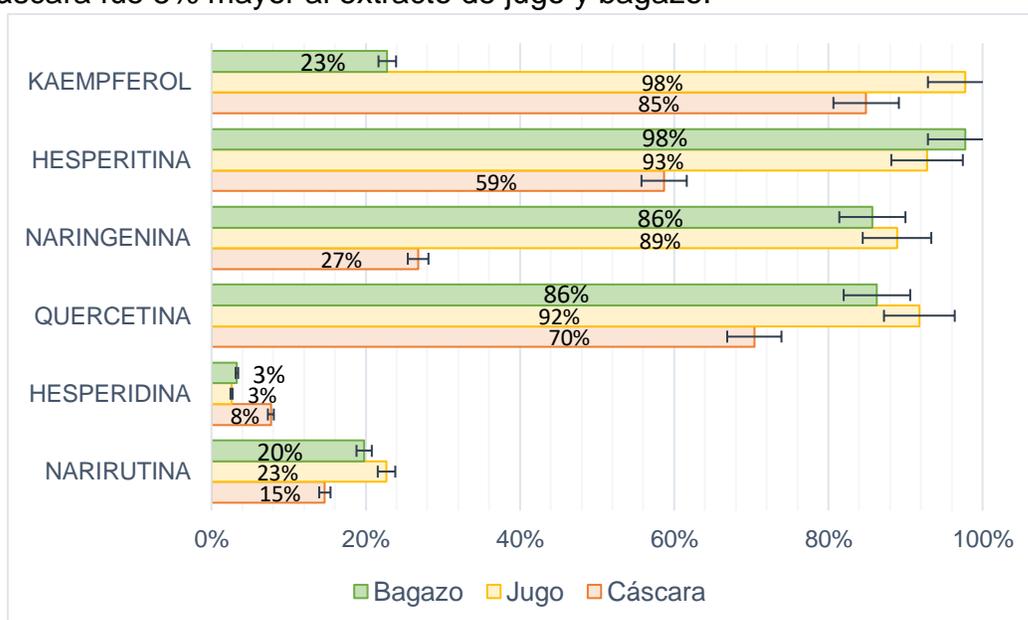


Figura 23. Porcentaje de bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de los extractos de jugo, cáscara y bagazo.

6.7 Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina

Se analizó el efecto de la fracción bioaccesible de los tres extractos de naranja, así como de los compuestos fenólicos: hesperidina, hesperitina, naringenina y la mezcla de estos, en la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina de acuerdo con la ecuación (fórmula 2, presentada en apartado 5.1). Con el fin de obtener el valor IC_{50} cada muestra se analizó en tres concentraciones (100%:0.0467 g/ml, 75%: 0.0350 g/ml y 50%: 0.0234 g/ml).

El extracto de cáscara de naranja presentó mayor porcentaje de inhibición con respecto a los extractos de jugo y bagazo en las todas las concentraciones, sin embargo, en la concentración 100% solo se presentó diferencia significativa ($p>0.05$) entre el extracto de cáscara y bagazo (Figura 24).

Aunque la mezcla de los compuestos fenólicos (hesperidina, hesperitina y naringenina) presentó un mayor porcentaje de inhibición en la concentración 75% y 100% que el extracto de cáscara, esta diferencia fue significativa ($p<0.05$) solo en la concentración al 100%.

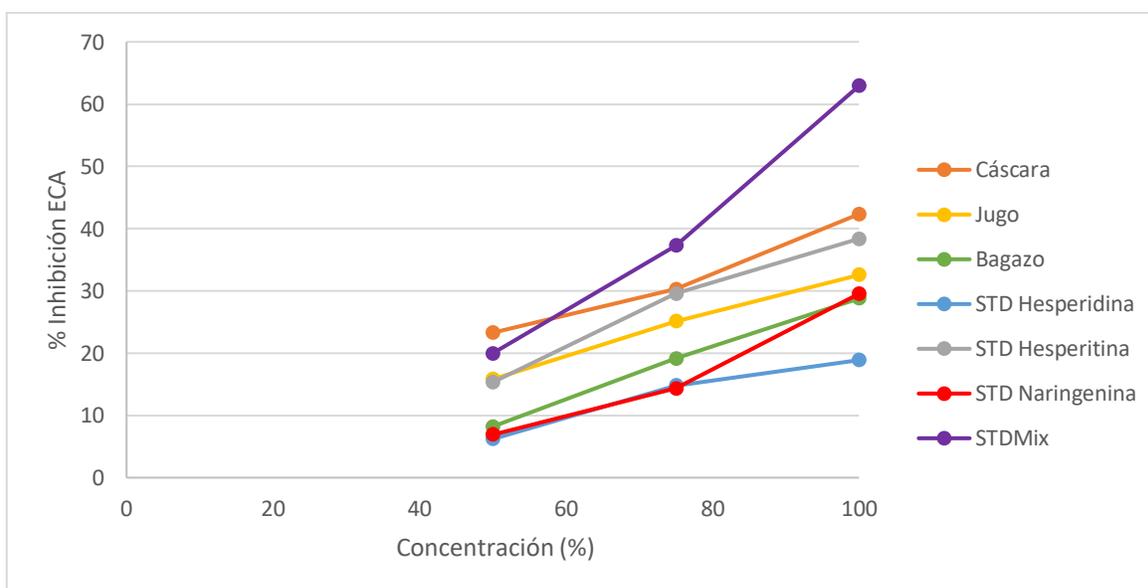


Figura 24. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina por extractos de naranja y compuestos fenólicos puros.

El valor de IC_{50} indica la concentración de la muestra necesario para inhibir al 50% la actividad de la ECA, mientras más bajo es el valor de IC_{50} más alta es la

actividad IECA de la muestra. Este valor se determinó para los tres extractos usando análisis de regresión lineal de gráficos logarítmicos. Se realizaron al menos 3 réplicas de cada extracto (Tabla 17). Los resultados expresados como valores de IC₅₀ son estimados ya que no se alcanzó la concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad IECA, estos resultados siguieron la misma tendencia que el porcentaje de inhibición, ya que la cáscara presentó mayor capacidad de inhibición seguido del jugo y por último el bagazo, sin embargo, no había diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tres extractos.

Tabla 17. IC₅₀ ECA de extractos de naranja

Muestra	IC ₅₀ (g/ml)	Estandar	IC ₅₀ (g/ml)
Cáscara	0.0593±0.01	Hesperidina	0.00020±0.00
Jugo	0.0773±0.03	Naringenina	0.00004±0.00
Bagazo	0.0722±0.01	Hesperitina	0.00011±0.00
		Mezcla	0.00018±0.00

Todos los resultados son expresados como media ± DE de tres repeticiones.

6.8 Correlaciones

Jugo

En la fracción bioaccesible del extracto de jugo (Tabla 18) la inhibición de la ECA estuvo influenciada por la vitamina C, ya que se presentó una alta correlación positiva entre el porcentaje de inhibición ECA y la vitamina C ($r=0.708^*$).

La actividad antioxidante DPPH mostró una correlación positiva muy alta con la hesperidina (0.925^{**}), la naringenina (0.925^{**}), la narirutina (0.888^*) y con la actividad antioxidante FRAP (0.992^{**}). Mientras que está última presentó una alta correlación positiva con la hesperidina ($r=0.869^{**}$), la naringenina (0.869^{**}) y la narirutina (0.940^{**}). Así mismo, la quercetina presentó una alta correlación positiva con el kaempferol ($r=0.711^*$). Mientras que la hesperidina y la naringenina presentaron una correlación positiva perfecta ($r=1.000^{**}$).

Además, el kaempferol y la vitamina C mostraron una alta correlación negativa (-0.886^{**}).

Tabla 18. Correlación de variables de la fracción bioaccesible del extracto de jugo

*. Los valores son significativos en el nivel 0.05. **. Los valores son significativos en el nivel 0.01.

	% Inhib. ECA	NARIT	HESPD	QUER	NARING	HESPT	KAEMP	PT	FRAP	DPPH
NARIT	-0.591	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HESPD	-0.347	0.647	-	-	-	-	-	-	-	-
QUER	-0.534	0.306	0.603	-	-	-	-	-	-	-
NARING	-0.347	0.647	1.000**	0.603	-	-	-	-	-	-
HESPT	-0.290	0.420	-0.420	-0.354	-0.420	-	-	-	-	-
KAEMP	-0.542	0.299	0.421	0.717*	0.421	-0.146	-	-	-	-
PT	-0.061	0.460	0.411	0.225	0.411	0.059	0.507	-	-	-
FRAP	-0.539	0.940**	0.869**	0.469	0.869**	0.084	0.383	0.483	-	-
DPPH	0.503	0.888**	0.925**	-0.515	0.925**	0.044	-0.403	-0.477	0.992**	-
Vit C	0.708*	-0.224	-0.224	-0.537	-0.224	0.000	-0.886**	-0.415	-0.246	0.247

% Inhib. ECA: Inhibición ECA, NART: naringina, HESPD: hesperidina, QUER: quercetina, NARING: naringenina, HESPT: hesperitina, PT: polifenoles totales

Cáscara

En la fracción bioaccesible del extracto de cáscara (Tabla 19) la vitamina C presentó una alta correlación positiva con la hesperidina ($r=0.723^*$), la actividad antioxidante FRAP ($r=0.996^{**}$) y los polifenoles totales ($r=0.855^{**}$). Así mismo, los polifenoles totales mostraron una alta correlación positiva con la actividad antioxidante FRAP ($r=0.858^{**}$), la quercetina ($r=0.836^{**}$) y el kaempferol ($r=0.836^{**}$). Entre estos dos últimos compuestos se presentó una correlación positiva perfecta ($r=1.000^{**}$). También entre el kaempferol mostró una alta correlación positiva la actividad antioxidante DPPH ($r=0.740^*$).

Además la hesperitina mostró una alta correlación negativa con la quercetina (-0.836^{**}), el kaempferol (-0.836^{**}) y la actividad antioxidante DPPH (-0.738^*).

Tabla 19. Correlación de variables de la fracción bioaccesible del extracto de cáscara

	% Inhib. ECA	NARIT	HESPD	QUER	NARING	HESPT	KAEMP	PT	FRAP	DPPH
NARIT	-0.331	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HESPD	-0.599	0.352	-	-	-	-	-	-	-	-
QUER	0.228	0.000	-0.185	-	-	-	-	-	-	-
NARING	-0.381	0.345	-0.240	0.371	-	-	-	-	-	-
HESPT	-0.585	0.328	0.635	-0.836**	-0.224	-	-	-	-	-
KAEMP	0.228	0.000	-0.185	1.000**	0.371	-0.836**	-	-	-	-
PT	0.111	-0.259	-0.361	0.836**	-0.224	0.414	0.836**	-	-	-
FRAP	-0.397	0.403	0.726*	0.462	0.086	0.069	0.462	0.858**	-	-
DPPH	-0.228	-0.009	0.538	0.740*	-0.618	-0.738*	0.740*	0.429	-0.145	-
Vit C	-0.429	0.342	0.723*	0.460	0.085	0.068	0.460	0.855**	0.996**	-0.145

*. Los valores son significativos en el nivel 0.05. **. Los valores son significativos en el nivel 0.01.
% Inhib. ECA: Inhibición ECA, NART: narirutina, HESPD: hesperidina, QUER: quercetina, NARING: naringenina, HESPT: hesperitina, PT: polifenoles totales

Bagazo

En la fracción bioaccesible del extracto de bagazo (Tabla 20) la inhibición de la ECA presentó una alta correlación positiva con la actividad antioxidante DPPH ($r=0.765^*$) y con la vitamina C ($r=0.734^*$). Además, el porcentaje de inhibición presentó una correlación negativa al contenido de hesperitina ($r=-0.778^*$). Así mismo, la narirutina presentó una correlación negativa alta ($r=-0.965^*$) con la hesperidina, mientras que con la naringenina presentó una correlación positiva alta ($r=0.822^{**}$). Está última también mostró una alta correlación negativa con la hesperidina (-0.862^{**}) y una alta correlación positiva con el contenido de polifenoles totales ($r=0.741^*$).

Además, la hesperitina mostró una alta correlación negativa con la actividad antioxidante FRAP ($r=-0.753^*$), DPPH ($r=-0.961^{**}$) y la vitamina C (-0.965^{**}). Así mismo, la actividad antioxidante DPPH presentó una correlación positiva

moderada con el kaempferol ($r=0.697^*$) y una correlación positiva muy alta con la vitamina C ($r=0.996^*$).

Tabla 20. Correlación de variables de la fracción bioaccesible del extracto de bagazo

	% Inhib. ECA	NARIT	HESPD	QUER	NARING	HESPT	KAEMP	PT	FRAP	DPPH
NARIT	-0.176	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HESPD	0.254	-0.965*	-	-	-	-	-	-	-	-
QUER	-0.463	0.203	-0.151	-	-	-	-	-	-	-
NARING	-0.085	0.822**	-0.862**	-0.151	-	-	-	-	-	-
HESPT	-0.778*	-0.184	0.116	0.698	-0.205	-	-	-	-	-
KAEMP	-0.254	-0.461	0.382	0.339	-0.471	0.505	-	-	-	-
PT	-0.237	0.304	-0.466	-0.311	0.741*	0.116	-0.098	-	-	-
FRAP	0.532	0.178	-0.197	-0.487	0.112	-0.753*	-0.062	-0.112	-	-
DPPH	0.765*	0.647	-0.145	-0.485	0.265	-0.961**	0.697*	-0.120	0.587	-
Vit C	0.734*	0.520	-0.163	-0.487	0.283	-0.965**	-0.700*	-0.077	0.590	0.996**

*. Los valores son significativos en el nivel 0.05. **. Los valores son significativos en el nivel 0.01.
% Inhib. ECA: Inhibición ECA, NART: narirutina, HESPD: hesperidina, QUER: quercetina, NARIN: naringenina, HESPT: hesperitina, PT: polifenoles totales

Los resultados presentados permiten conocer nuevos aspectos de la bioaccesibilidad de los nutrimentos y de compuestos bioactivos, así mismo muestran el potencial de la cáscara de naranja para la obtención de nutraceuticos.

7. Discusión

7.1 Vitamina C

- **Antes de la digestión *in vitro* (extracto crudo)**

En el presente estudio se determinó por HPLC que el extracto crudo de jugo de naranja tenía un contenido de ácido ascórbico de 31.9 ± 0 mg/100g, así como un contenido de 51.5 ± 0 mg/100g de vitamina C total y un contenido de 19.6 ± 0 mg/100g de ácido dehidroascórbico. Estos resultados varían respecto a lo reportado por Mazurek, Włodarczyk-Stasiak, Pankiewicz, Kowalski y Jamroz (2020), quienes reportaron un contenido de 23 mg/100g de ácido ascórbico, 25.2 mg/100g de vitamina C y 2.2 mg/100g de ácido dehidroascórbico determinado por HPLC en jugo de naranja cultivada en Polonia.

Sin embargo, se ha encontrado que el contenido de vitamina C, AA y ADHA también cambia de acuerdo con la variedad de la naranja (tabla 21), esto de acuerdo con lo reportado por Chebrolu, Jayaprakasha, Yoo, Jifon y Patil (2012).

Tabla 21. Contenido de AA, ADHA y Vit C total de diferentes variedades de naranja. Resultados reportados como mg/100g

Variedad de naranja	Ácido ascórbico mg/100g	Ácido dehidroascórbico mg/100g	Vitamina C total mg/100g
Temple	64.27 ± 03.08	14.78 ± 01.93	79.05 ± 00.59
OL marsh White	21.15 ± 0.88	27.82 ± 00.48	48.98 ± 00.58
Shimouti	36.46 ± 02.43	27.84 ± 00.76	64.31 ± 00.53
OL pineapple	24.22 ± 00.30	31.59 ± 00.31	55.81 ± 00.24
Thornton tangelo	38.56 ± 01.15	25.06 ± 00.43	63.62 ± 00.57

. Fuente: Chebrolu, K., Jayaprakasha, G., Yoo, K., Jifon, J., & Patil, B. (2012)

Otro factor por considerar es que, valores más altos en AA y DHA puedan deberse al uso de un agente reductor eficiente y / o variaciones en el cultivo y la estación (Chebrolu, K., et al., 2012).

El ácido ascórbico también se ha reportado mediante el método de titulación. En este método de valoración de oxidación-reducción, los ácidos ascórbicos se oxidan a ácido dehidroascórbico y el colorante de indofenol se reduce a un compuesto incoloro. El punto final de la titulación se puede detectar fácilmente

cuando un exceso del tinte no reducido da un color rosa rosado en una solución ácida (Ramli, & Azlan, 2017). Sin embargo, hay que considerar en esta técnica que la presencia de sustancias reductoras (ion ferroso, ion cobre, dióxido de azufre, sulfito y tiosulfato) en las muestras de fruta puede reaccionar con el colorante de indofenol y causar una sobreestimación de la vitamina C (Spínola, Mendes, Câmara, & Castilho, 2013). Además, los ácidos ascórbicos reducidos (ácidos deshidroascórbicos) tampoco se cuantifican en este método (Quiroz & Fernández, 2009).

Debido no fueron encontrados reportes del contenido del ácido ascórbico por HPLC en cáscara de naranja, se tomaron de referencia valores de ácido ascórbico por titulación. Elkhatim, Elagib y Hassan (2018) determinaron que el contenido de ácido ascórbico en cáscara de naranja por titulación era de 110.4mg/100g, además determinaron que el contenido de ácido ascórbico en la pulpa (junto con las semillas) de naranja era de 90 mg/100g.

Contrario a lo reportado por Elkhatim y colaboradores (2018), en el presente estudio se determinó que el contenido de ácido ascórbico era superior en la parte interna de la fruta, ya que el extracto de cáscara solo presentaba 19.4 ± 0.6 mg/100g y el extracto de bagazo 35.6 ± 0.08 mg/100g de ácido ascórbico. En concordancia con nuestros resultados Barros y colaboradores, (2012) encontraron que el contenido de ácido ascórbico era mayor en las partes internas de la naranja.

Esta variación en los resultados podría deberse a la variación en los cultivares, las etapas de madurez y otros factores ambientales (Elkhatim, et al. 2018).

También hay las variaciones entre métodos ya que el método de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es una técnica específica, sensible y selectiva para determinar el contenido de vitamina C en muestras de frutas. Además, requiere solo una pequeña cantidad de muestra y productos químicos, es bastante rápido y menos susceptible a errores sistémicos debido a su alta especificidad (Quiroz & Fernández, 2009; Ramli & Azlan, 2017).

- **Después de la digestión *in vitro* (fracción bioaccesible)**

La diálisis es una técnica común que se ha utilizado para simular la obtención de la fracción bioaccesible de alimentos y extractos a nivel intestinal. En el modelo de diálisis, la fracción dializable representa la muestra con capacidad para atravesar la membrana semipermeable y está disponible para su absorción; mientras tanto, la fracción fuera de la membrana de diálisis representa la muestra no absorbible (Wojtunik-Kulesza, et al. 2020)

En el presente estudio el contenido de AA de la fracción bioaccesible del extracto de jugo de naranja fue 6.7 ± 0 mg/100g con un porcentaje de bioaccesibilidad de 21%. Con respecto a la vitamina C total, está presentó un contenido 8.3 ± 0.2 mg/100g con un porcentaje de bioaccesibilidad de 16%. El extracto de bagazo presentó un contenido de AA en la fracción bioaccesible del extracto de 5.8 ± 0.3 mg/100g con un porcentaje de bioaccesibilidad de 16%. Con respecto a la vitamina C total, está presentó un contenido 7.1 ± 0.4 mg/100g con un porcentaje de bioaccesibilidad de 15%.

Aschoff y colaboradores (2015) realizaron la determinación de vitamina C total y ácido ascórbico en la fracción bioaccesible de tres muestras de naranja: pulpa, jugo y una mezcla de pulpa- jugo (tabla 22).

Tabla 22. Contenido de AA y Vit C total en fracción bioaccesible de muestras de naranja

Autor	Muestra analizada	AA (mg/100 g)	Vitamina C total (mg/100 g)
Aschoff, et al. 2015	Segmentos de naranja (pulpa)	22.9	27.4
Aschoff, et al. 2015	Jugo	26.1	33.1
Aschoff, et al. 2015	Jugo y pulpa de naranja homogenizada	12.4	18
Presente estudio	Jugo y pulpa de naranja homogenizada	8.4	9.5

Fuente: Aschoff, et al. 2015

De acuerdo con Aschoff y colaboradores (2015), el porcentaje de bioaccesibilidad de vitamina C total de la muestra de pulpa fue 54% y 38% el de la muestra de pulpa-jugo homogenizada. Puede notarse como contrario a lo esperado tanto el

contenido de vitamina C total, así como el porcentaje de bioaccesibilidad de la muestra de pulpa-jugo fue menor al de las muestras individuales.

Los factores que mayormente pueden influir en la degradación del ácido ascórbico y la vitamina C en la fracción bioaccesible son: el oxígeno y el pH. Ya que, el alto aporte de aire durante la homogeneización de la muestra pulpa-jugo probablemente favoreció una mayor degradación de la vitamina C (Aschoff et al. 2015).

Así mismo, Mennah-Govela & Bornhorst (2017) plantean que la degradación del ácido ascórbico puede deberse al aumento del pH durante la fase del intestino delgado y la presencia de oxígeno durante la digestión *in vitro*, lo que puede mejorar la oxidación / degradación de este compuesto.

Todos estos factores estuvieron contribuyeron en las muestras del presente estudio, ya que parte del tratamiento que se le dio a las muestras para la elaboración de los extractos fue la sonicación y la centrifugación, lo cual generó un importante contacto con el oxígeno, el cual también estuvo presente en el mismo proceso de digestión *in vitro* al igual que el cambio de pH.

7.2 Polifenoles totales

▪ Antes de la digestión *in vitro* (extracto crudo)

El contenido de polifenoles totales en el extracto crudo de cáscara de naranja fue mayor al encontrado en los extractos de jugo y bagazo.

Tabla 23. Literatura consultada del contenido de polifenoles totales en extractos de naranja

Autor	Técnica	Polifenoles totales (mg GAE/100g)		
		Bagazo	Cáscara	Jugo
Presente estudio: febrero 2020	Extracto etanol 80% con sonicación	156.9	281.8	170.1
Al-Juhaimi, 2014	Extracto etanol 80% baño de agua con agitación		178.90	123.02
Khan, et al., 2010	Etanol 80% sonicación		275	
Khan, et al., 2010	Etanol 80% sin sonicación		200	
Montero-Calderon, et al., 2019	Etanol (50%) Sonicación (400 W, 30 min)		105.96	
Gorinstein et al.,2001	Etanol 95% baño de agua caliente con condensador		179	154

Además, el contenido de polifenoles totales en el extracto de cáscara de naranja del presente estudio es mayor al reportado por otros autores (tabla 23) que siguieron un proceso de extracción utilizando maceración o calor. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los obtenidos por Khan y colaboradores (2010) que utilizaron un proceso de extracción con sonicación, donde observaron que el contenido de polifenoles totales obtenidos por UAE (Ultrasound Assisted Extraction) durante 15 min era significativamente mayor que el obtenido por extracción sin sonicación durante 60 min.

Esto pudo deberse a que de acuerdo con Montero-Calderón y colaboradores (2019), la UAE está basada en la aplicación de ultrasonido (20-100kHz) que causan la implosión de las burbujas de cavitación de las células en las que se propagan las ondas acústicas, lo que provoca la interrupción de las membranas celulares. Esta acción facilita la penetración del disolvente en las células, mejorando así la transferencia de masa y la liberación de compuestos bioactivos.

Montero-Calderón y colaboradores (2019) también señalan que, si bien se ha verificado el rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos con EAU, los solventes utilizados (etanoato de etilo, acetona) producen una contaminación ambiental grave. Por lo tanto, es necesario continuar estudiando la optimización de la extracción de compuestos bioactivos utilizando "solventes verdes" como el etanol y el agua.

Si bien el metanol es un solvente efectivo para la extracción de hesperidina, su toxicidad limita su aplicación. El etanol es un sustituto que se utiliza como solvente en la industria alimentaria. Se ha demostrado que es útil en la extracción de compuestos fenólicos en algunos productos cítricos. Además, el etanol se considera un biodisolvente, ya que puede producirse a partir de recursos renovables. El proceso de extracción por en sí mismo presenta baja selectividad y, por lo tanto, es necesaria una purificación adicional del compuesto requerido (Montero-Calderón, et al., 2019)

- **Después de la digestión *in vitro* (fracción bioaccesible)**

Los extractos de jugo, cáscara y bagazo del presente estudio mostraron un porcentaje de bioaccesibilidad de 37, 38 y 31%, respectivamente.

Mennah-Govela y Bornhorst (2017) observaron que el contenido fenólico total de muestras de jugo de naranja Valencia tenía una alta estabilidad durante la digestión gastrointestinal *in vitro* (aproximadamente 75%). Las diferencias entre estos resultados con los del presente estudio pueden deberse principalmente a variaciones entre los métodos de digestión. Por ejemplo, Mennah-Govela & Bornhorst (2017) durante la fase gástrica fueron bajando el pH de 4 a 2 en un transcurso de 2 horas. También recurrieron a un proceso de ultra centrifugación de las muestras en vez de membranas de diálisis, en los modelos con centrifugación la muestra intestinal se centrifuga para obtener un sobrenadante (componentes solubles que podrían ser absorbidos potencialmente) y un precipitado (compuestos no absorbidos). Además, en el caso de la diálisis, parámetros como las dimensiones de la molécula, el grado de polimerización y la presencia de azúcar en la molécula, o incluso el procedimiento de lavado de la membrana, pueden modificar la cantidad de muestra capaz de permear a través de la membrana (Wojtunik-Kulesza, et al. 2020).

Por su parte, Su y colaboradores (2012) realizaron una digestión *in vitro* a muestras de cáscara de mandarina, donde al igual que en el presente estudio encontraron que en comparación con el grupo de control (una extracción con solvente de metanol), el contenido de polifenoles totales en los tratamientos de fase gástrica y fase intestinal disminuyó. Además, el efecto de la fase gástrica en el contenido de polifenoles totales de la cáscara de cítricos fue mayor que el del tratamiento de la fase intestinal.

En cuanto a digestión *in vitro* de los extractos de cáscara y bagazo, Fernández-Fernández y colaboradores (2021) también realizaron una digestión *in vitro* pero a diferencia del presente estudio, utilizaron muestras de cáscara, bagazo y semillas de naranja en conjunto y siguieron la metodología de superficie de respuesta (RSM) para modelar los tres pasos abióticos de la digestión precolónica, de esta

manera obtuvieron 25mg GAE/g en las muestras sin digerir y 7.5mg GAE/g después de la digestión, lo cual es equivalente a un 30% de bioaccesibilidad de los polifenoles totales. Mientras que en el presente estudio los polifenoles totales de las muestras de bagazo y cáscara tuvieron un porcentaje de bioaccesibilidad de 31% y 38%, respectivamente.

Por lo tanto, fue el extracto de cáscara el que presentó mayor porcentaje de bioaccesibilidad (38%), esto puede relacionarse con que la matriz alimentaria ejerce un efecto protector que impide a los compuestos fenólicos degradarse más fácilmente por las enzimas digestivas (Tarko & Duda-Chodak, 2020). Por su parte, Gunathilake y colaboradores (2018) destacan que la presencia de algunas macromoléculas como la fibra dietética (pectina, celulosa, etc.) podría interactuar con las biomoléculas y afectar su liberación en los medios digestivos. Además, la presencia de un pH bajo de alrededor de 2.0 en la digestión gástrica simulada podría afectar la estabilidad de los polifenoles de bajo peso molecular.

Sin embargo, Lucas-González y colaboradores (2018) resaltan pérdidas drásticas en los compuestos bioactivos después de la digestión intestinal, las cuales probablemente se deben a diferentes factores como lo son: interacciones con otros compuestos dietéticos, como fibra, proteínas, carbohidratos y minerales, las reacciones químicas, principalmente oxidación y polimerización, que permitieron la formación de otros derivados fenólicos, como las chalconas y los cambios en las estructuras moleculares debido a la acción enzimática y, en consecuencia, en su solubilidad.

7.3 Actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante *in vitro* es recomendable de considerar más de un método, ya que ningún ensayo refleja con precisión el mecanismo de acción de todas las fuentes de oxidantes o de todos los antioxidantes en un sistema complejo (Becker, et al. 2019). Por lo cual, se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos de naranja por los métodos: DPPH y FRAP. La tabla 11 12 y 13 muestran los valores de actividad antioxidante obtenidos por estos métodos.

7.3.1 DPPH

▪ Antes de la digestión *in vitro* (extracto crudo)

La actividad antioxidante encontrada en los extractos fue mayor en la cáscara seguido del jugo y el bagazo (tabla 11).

De manera similar al presente estudio, Elkhatim y colaboradores (2018), reportaron mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH en la cáscara que en el jugo, 70% y 50%, respectivamente. Sin embargo, Mamta y Parminder (2013), obtuvieron por maceración extractos etanólicos de cáscara y jugo de naranja, encontrando un porcentaje de inhibición del radical DPPH de 50% y 55%, respectivamente.

El valor IC_{50} (concentración requerida para inhibir el 50% de los radicales libres). El IC_{50} está negativamente correlacionado con la actividad antioxidante, mientras más bajo sea el valor de IC_{50} más alta es la actividad antioxidante de la muestra (Safdar, 2017). En este estudio el extracto de cáscara fue el que presentó el menor valor IC_{50} 0.0156 mg/ml, seguido del extracto de jugo (IC_{50} 0.01778 mg/ml) y el bagazo (IC_{50} 0.0325 mg/ml). Lagha-Benamrouche y Madani, (2013) analizaron la actividad antioxidante DPPH en cáscaras dos variedades de naranja: Washington Navel y Thomson Navel, las cuales presentaron un IC_{50} de 0.901mg/ml y 0.612 mg/ml, respectivamente.

▪ Después de la digestión *in vitro* (fracción bioaccesible)

La actividad antioxidante después de la digestión *in vitro* fue mayor en el extracto de cáscara, seguida del extracto de bagazo y el extracto de jugo (Tabla 12). Además, el porcentaje de inhibición de la fracción bioaccesible del extracto de jugo era menor al encontrado en una concentración de 5mg/ml del extracto crudo. Sin embargo, el porcentaje de inhibición de la fracción bioaccesible de los extractos de cáscara y bagazo era cercano al presente en una concentración de 10mg/l de los extractos crudos.

Se encontraron diferentes resultados en la literatura consultada referente a la actividad antioxidante medida por DPPH para la fracción bioaccesible de bebidas de frutas que contienen jugo de naranja. Así, Cilla et al. (2011) encontraron un

aumento significativo de actividad antioxidante en las bebidas de frutas digeridas en comparación con las bebidas no digeridas que no se correlacionó ni con la vitamina C ni con el contenido de polifenoles en la fracción bioaccesible. Por el contrario, Rodríguez-Roque et al. (2013) encontraron una disminución de la actividad antioxidante de una bebida con naranja luego del proceso de digestión que fue modulada por la matriz alimentaria y el tipo de procesamiento, donde después de analizar individualmente vitamina C y compuestos fenólicos, sugieren que los compuestos antioxidantes de los alimentos podrían sufrir efectos sinérgicos e interacciones antagonistas, dependiendo de la matriz alimentaria.

Mennah-Govela, (2017) también reporta que tras el proceso de digestión *in vitro*, se detectó una pérdida significativa de compuestos bioactivos antioxidantes (principalmente polifenoles debido a las condiciones intestinales alcalinas) en pulpas y jugos de naranjas. Mientras que la actividad antioxidante analizada por DPPH disminuyó significativamente entre 64-92%, en comparación con la actividad antioxidante de los jugos no digeridos. En comparación en el presente estudio la actividad antioxidante de los extractos crudos (concentración 15mg/l) de jugo, cáscara y bagazo disminuyó un 68, 39 y 14%, respectivamente, después de la digestión *in vitro*.

Mennah-Govela, (2017) también, sugiere que la depleción de la actividad antioxidante observada en la fracción bioaccesible podría estar relacionada con cambios de los compuestos antioxidantes analizados como compuestos fenólicos totales, ácido ascórbico, hesperidina y naringenina. Los cuales también disminuyeron después de la digestión *in vitro* en el presente estudio.

7.3.2 FRAP

▪ Antes de la digestión *in vitro* (extracto crudo)

La actividad antioxidante encontrada en el extracto de cáscara ($624.7 \pm 53 \mu\text{M}/100\text{ml}$) fue 1.6 veces mayor a la encontrada en el extracto de jugo ($392.4 \pm 102 \mu\text{M}/100\text{ml}$), así como en el de bagazo ($458.7 \pm 113 \mu\text{M}/100\text{ml}$).

Se encontraron diferentes resultados en la literatura consultada referente a la actividad antioxidante medida por FRAP para jugo de naranja los cuales se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Literatura consultada actividad antioxidante por FRAP en jugo de naranja

Jugo de naranja	$\mu\text{M TE}/100\text{ml}$
Gorinstein et al. (2006)	801 \pm 20
Proteggente, et al (2002)	1181 \pm 6.0
Pellegrini, et al (2003)	2050 \pm 4.1
Halvorsen, et al (2002)	1500 \pm 12
Szeto, et al (2002)	942 \pm 11
Saura-Calixto & Goñi, (2006).	515 \pm 41.5

En cuanto al contenido de actividad antioxidante FRAP en extractos de jugo de naranja, Chen, Wang, Tan, Hu, Sundararajan, & Zhou (2020) reportaron en *C. sinensis (L.) Osbeck* un contenido entre 2.45-3.87 $\mu\text{M}/\text{ml}$. Por su parte Assefa, Ko, Moon y Keum, (2016) reportaron un contenido de 119.9 \pm 3.8 mg TE/g en un extracto de jugo de naranja en etil acetato.

Con respecto a la actividad antioxidante FRAP en extractos de cáscara de naranja,

Zulkifli, et. al. (2012) reportaron un contenido de 20.03 \pm 1.464 (mM/100g), mientras que mientras que Chen y colaboradores (2020) reportaron un contenido entre 14.49-18.53 $\mu\text{M}/\text{ml}$.

▪ **Después de la digestión *in vitro* (fracción bioaccesible)**

La actividad antioxidante después de la digestión *in vitro* fue mayor en el extracto de cáscara (168.35 \pm 2.45 $\mu\text{M}/100\text{ml}$), seguido del extracto de bagazo (67.97 \pm 9.91 $\mu\text{M}/100\text{ml}$) y el extracto de jugo de naranja (45.34 \pm 8.63 $\mu\text{M}/100\text{ml}$). La fracción bioaccesible de los extractos de jugo, cáscara y bagazo representaron pérdidas del 88.45, 73.05 y 85.18%, respectivamente en comparación con la actividad antioxidante de los extractos crudos.

Ancos, Cilla, Reyes, Sánchez-Moreno y Cano (2017) reportaron la actividad antioxidante por FRAP en muestras de jugo y pulpa de naranja antes y después de la digestión *in vitro* (Tablas 25 y 26). En donde la actividad antioxidante de la fracción bioaccesible de la pulpa de naranja representó pérdidas de entre 58.94-

63.75% en comparación con la pulpa antes de la digestión, mientras que la actividad antioxidante de la fracción bioaccesible del jugo de naranja presentó pérdidas de entre 15.57-49%.

Tabla 25. Actividad antioxidante por FRAP en muestras de pulpa de naranja antes y después de la digestión *in vitro* (Ancos, Cilla, Reyes Barberá, Sánchez-Moreno y Cano (2017)).

Pulpa	Antes de la digestión <i>in vitro</i>	Fracción bioaccesible	% de pérdida
Navel-N	475.38 ± 9.15	186.69 ± 3.89	60.73%
Cara Cara-CC	467.49 ± 4.79	169.48 ± 13.50	63.75%
Clementine-M	343.69 ± 9.38	141.13 ± 5.5	58.94%
Clementine-M12	371.88 ± 15.65	150.79 ± 10.92	59.45%

Valores reportados como μmol de equivalentes de ácido ascórbico (AAE) por 100 g de peso fresco de muestra

Tabla 26. Actividad antioxidante por FRAP en muestras de jugo de naranja antes y después de la digestión *in vitro* (Ancos, Cilla, Reyes Barberá, Sánchez-Moreno y Cano (2017)).

Jugo	Antes de la digestión <i>in vitro</i>	Fracción bioaccesible	% pérdida
Navel-N	159.76 ± 10.75	134.89 ± 11.0	15.57%
Cara Cara-CC	186.80 ± 4.78	95.26 ± 4.5	49%
Clementine-M	170.96 ± 11.48	98.95 ± 0.80	42.12%
Clementine-M12	173.28 ± 16.10	92.51 ± 4.11	46.61%

Valores reportados como μmol de equivalentes de ácido ascórbico (AAE) por 100 g de peso fresco de muestra

Mientras que en el presente estudio la actividad antioxidante de la fracción bioaccesible del extracto de jugo de naranja representó pérdidas 88.45%.

Además, las variaciones en la actividad antioxidante de las diferentes partes de la naranja entre los diferentes estudios pueden estar influenciadas por la variedad de la naranja, solvente y concentración usada (Safdar, et al.2017).

Es de destacar que la actividad antioxidante en ambas determinaciones realizadas (FRAP y DPPH), fue superior en el extracto de cáscara de naranja en comparación con el extracto de jugo y bagazo, esta misma tendencia se presentó en la determinación de polifenoles totales. De igual manera, Rivas-Cantú y colaboradores (2013) señalan que el porcentaje de pectina (fibra dietética) es mayor en la cáscara (22.5%) que en la pulpa (10%) de la naranja.

Por lo tanto, de acuerdo con Mercado-Mercado y colaboradores (2020) el tipo y contenido compuestos fenólicos presentes en las diferentes cáscaras de cítricos influyen sobre la capacidad antioxidante en la interacción con la fibra dietética presente en las cáscaras. En consecuencia, la fibra dietética puede proteger a los compuestos de la oxidación, promoviendo una buena capacidad antioxidante.

7.4 Compuestos fenólicos por HPLC

- **Antes de la digestión *in vitro* (extracto crudo)**

La composición fenólica de los extractos crudos de jugo, cáscara y bagazo se presenta en las tablas 14, 15 y 16, respectivamente. Los dos grupos (glucósidos y agliconas) fueron cuantificados por HPLC.

En el extracto de jugo de naranja el contenido de hesperidina presentado fue de 25.08 ± 1.20 mg/100ml, mientras que en la literatura consultada (tabla 27) fueron encontrados valores de entre 24.7- 98.5 mg/100ml para jugo de naranja (no extracto). Además, en el presente estudio se encontró un valor de narirutina de 11.70 ± 1.12 mg/100ml, el cual es más del doble al encontrado en la literatura.

Tabla 27. Literatura consultada contenido de hesperidina y narirutina en jugo de naranja.

Compuesto fenólico	Contenido	Referencia
Hesperidina	44.1 ± 3.7	Gorinstein et al. (2006)
	98.5 ± 3.3	Proteggente, et al (2002)
	39.2 ± 3.0	Vanamala, et al (2006)
	24.7 ± 2.1	Kanaze et al. (2006)
	28.6	Gattuso, et. al. 2007
Narirutina	5.2	Gattuso, et. al. 2007

Valores reportados como mg/100ml de jugo

Se encontraron resultados variables en la literatura consultada en cuanto a la composición fenólica de extractos de cáscara de naranja (tabla 28). En comparación el extracto del presente estudio presenta valores superiores en ciertos compuestos fenólicos como naringenina, hesperidina y hesperitina, sin embargo, en compuestos como el kaempferol el contenido es menor.

Tabla 28. Literatura consultada contenido de compuestos fenólicos en cáscara de naranja.

Compuesto fenólico	Contenido	Referencia	Presente estudio
Quercetina	17.02 ± 0.49	Zulkifli, et al. (2012)	0.98±0.07
	ND a 0.19 ± 0.00	Montero-Calderón, 2019	
Naringenina	1.27 ± 0.40	Zulkifli, et al. (2012)	4.02±0.68
Kaempferol	26.71 ± 3.03	Zulkifli, et al. (2012)	1.06±0.02
Hesperidina	113.332	Khan, et al. 2010	156.48±6.40
	113.03 ± 0.08	Montero-Calderón, 2019	
Hesperitina	0.14 ± 0.00 a	Montero-Calderón, 2019	3.00±0.58
	1.20 ± 0.01		

Valores reportados como mg/100ml de cáscara

▪ **Después de la digestión *in vitro* (fracción bioaccesible)**

Los cambios en el perfil fenólico de los extractos debido a la digestión *in vitro* son presentados en las tablas 14,15 y 16.

Ancos y colaboradores (2017) reportaron el contenido de compuestos fenólicos en Navel-N y Cara Cara-CC (dos variedades de naranja dulce) así como en Clementine-M y Clementine-M12 (variedad de mandarina), antes y después de la digestión *in vitro*. Encontraron que el jugo de naranja presentaba un porcentaje de bioaccesibilidad de entre 38.80-58.14% para la narirutina y entre 35.40-57.16% para la hesperidina. En cuanto a las mandarinas estas presentaban un porcentaje de bioaccesibilidad de entre 2.58-6.07% para la narirutina y entre 6.38-19.17% para la hesperidina. Mientras que en el presente estudio el extracto de jugo de naranja presentó un porcentaje de bioaccesibilidad de 22.7% para la narirutina y 2% para la hesperidina.

En otros estudios, la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos fue >35%. Por ejemplo, Cilla, González-Sarrías, Tomás-Barberán, Espín y Barberá (2009) reportaron que una bebida de frutas elaborada con uva, naranja y albaricoque tenía entre 36 y 63% de bioaccesibilidad. Por su parte Gil-Izquierdo, Gil, Ferreres y Tomás-Barberán (2001), reportaron la bioaccesibilidad de flavanonas entre 11 y 36% en jugo de naranja. Mientras que en el presente estudio las flavanonas (hesperidina y naringenina) presentaron entre 2 y 88% de bioaccesibilidad en el extracto de jugo de naranja. Sin embargo, es importante destacar que Cilla y

colaboradores (2009) obtuvieron la fracción bioaccesible mediante centrifugación en lugar de diálisis lo cual puede haber contribuido a estas diferencias.

Fernández-Fernández y colaboradores (2021) señalan que los compuestos fenólicos en los subproductos de cítricos pueden protegerse de la degradación durante la digestión y el procesamiento, por la fibra dietética que compone el subproducto, debido a que los compuestos fenólicos se unen principalmente a los componentes estructurales de la pared celular como la pectina. Sin embargo, Sánchez-Aldana y colaboradores (2013) examinaron los polifenoles de cuatro extractos de bagazo y cáscara de limón mexicano y encontraron que los extractos de cáscara mostraron el mayor rendimiento de pectina y el menor contenido polifenólico, incluyendo naringina y hesperidina.

Las diferencias en la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos podrían también explicarse por una interacción sinérgica o antagonista entre los compuestos fenólicos con otras sustancias según la matriz alimentaria (D'Archivio et al., 2010). Además, las diferencias en la estructura afectan la estabilidad de los flavonoides, así mismo, la inestabilidad de estos compuestos en condiciones alcalinas podría atribuirse al hecho de que estos sufren varios cambios, como oxidación, polimerización y transformación. De hecho, la reducción en la concentración de sustancias fenólicas en condiciones alcalinas se ha relacionado con la formación de complejos entre estos compuestos e iones metálicos, proteínas y / o fibra (Argyri, Komaitis, & Kapsokefalou, 2006; Saura-Calixto & Goñi, 2007).

Asimismo, en condiciones subalcalinas, el 55-65% de las flavanonas se transforman en otro compuesto con diferentes propiedades químicas y físicas, como las chalconas. (Rodríguez-Roque et al., 2013; Pereira-Caro et al., 2014). Las chalconas, no son dializables por su alto peso molecular y baja solubilidad en condiciones intestinales (Gil-Izquierdo, Gil, Ferreres & Tomás-Barberán, 2001).

Por la tanto, las características químicas de los compuestos fenólicos, como la solubilidad, hidrofobicidad, peso molecular o incluso la configuración de isómeros, influyen en su estabilidad en el transcurso de la digestión (Quan et al., 2017). Así mismo, la interacción entre los flavonoides y las enzimas digestivas podría

dificultar la detección mediante el análisis HPLC (Rodríguez-Roque et al., 2013; Pereira-Caro et al., 2014).

7.5 Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina

Como ya se ha mencionado anteriormente, si bien se observan altas cantidades de polifenoles específicos en ciertos tipos de alimentos, es probable que la naturaleza complementaria y / o sinérgica de todos compuestos presentes en los alimentos contribuya a su actividad biológica. De igual manera, se ha reportado que extractos de alimentos como la soya y el frijol negro presentaron mayor actividad inhibitoria contra ciertas enzimas como la α -amilasa y la lipasa en comparación con compuestos fenólicos puros probados. Por lo cual se ha sugerido que debe haber cierto sinergismo entre los compuestos fenólicos en la actividad inhibitoria (Oak, Auger, Belcastro, Park, Lee & Schini-Kerth, 2018; Zhang, Pechan & Chang, 2018).

Con el fin de investigar el planteamiento anterior, se probaron soluciones estándar de hesperidina, hesperitina y naringenina a diferentes concentraciones con el mismo procedimiento utilizado para determinar el % IECA en los extractos de naranja.

De acuerdo con los resultados de la figura 24, se puede observar como en la mayoría de los casos el % IECA era mayor en los extractos de jugo, cáscara y bagazo en comparación con la hesperidina, hesperitina y la naringenina puras, sin embargo, la mezcla de estas últimas mostró un mayor %IECA que las concentraciones al 75 y 100% de los extractos. Lo cual refuerza lo sugerido anteriormente, es decir la actividad IECA esta mayormente influida por un posible efecto sinérgico de los compuestos más que por el compuesto mayoritario.

Kim y Lim, (2020) reportaron un porcentaje de inhibición de la ECA entre 12.8-48.9% en un extracto acuoso de cáscara de *C. unshiu* (mandarina). Por su parte Ruviano y colaboradores (2020) realizaron dos extractos; uno de residuo de jugo (cáscara, residuo de pulpa y semillas) de *Citrus latifolia* y *Citrus sinensis* y otro de pectina cítrica extraída de manera industrial. La actividad IECA presentada por el primer extracto fue de 48.1%, mientras que la del segundo fue de 79.2%. En el

presente estudio la actividad IECA presentada por el extracto de cáscara fue 23.28-42.34%, en el extracto de jugo 15.81-32.56% y en el extracto de bagazo 8.2-28.78%. Por lo tanto, la actividad IECA presentada por la fracción bioaccesible del extracto de cáscara de naranja fue superior a la de jugo y bagazo.

Estudios recientes han sugerido que la pectina puede tener un efecto benéfico en la inhibición de la ECA. Erkaya-Kotan, (2020) elaboró yogurts a los cuales les agregó 0.5%, 1%, 1.5% y 2% de fibra de naranja (cáscara y bagazo) y estudió su efecto sobre la inhibición de la ECA, encontrando que el yogurt control (sin fibra de naranja) tuvo la menor actividad inhibidora de la ECA mientras que el yogurt que contenía 1% de fibra de naranja tuvo la actividad IECA más alta. De manera que el incremento de la actividad IECA no es proporcional a la concentración de la fibra de naranja. Lo cual podría interpretarse como una interacción de unión entre los compuestos fenólicos y las proteínas de la leche que provocó una depreciación de la biodisponibilidad de los polifenoles en el yogurt como inhibidores de la ECA.

Ruviaró, Barbosa, Martins, Ávila, Nakajima & Dos Prazeres, (2020) también reportaron que la inhibición de la ECA por la hesperetina pura osciló en el rango de 82,8-100% de una manera dependiente de la concentración ($p < 0,05$). Además mencionan que la actividad IECA de la hesperetina fue alrededor de 1,5 veces mayor que la de la hesperidina en todas las concentraciones. En el presente estudio la hesperitina presentó una actividad IECA entre 15-38% también dependiente de la concentración, sin embargo, la actividad IECA presentada por la hesperitina fue alrededor de 2.17 veces mayor que la presentada por hesperidina en todas las concentraciones, pero esta diferencia solo fue significativa en la concentración más alta.

Las variaciones en el efecto IECA obtenido en la presente investigación en comparación con los otros estudios podría deberse a que algunos compuestos fenólicos que podrían inhibir la ECA, no lograron cruzar la membrana a la fracción bioaccesible en la digestión *in vitro*. Fernández y Labra (2013) reportaron que la inhibición de la ECA de extractos de uva presentaba una disminución aproximada del 10% después de la digestión *in vitro*.

7.6 Correlaciones de Pearson. Correlación de variables analizadas en los tres extractos

Jugo

En la fracción bioaccesible del extracto de jugo la inhibición de la ECA estuvo influenciada mayormente por la vitamina C, ya que fue la única que presentó una alta correlación positiva con el porcentaje de inhibición ECA ($r=0.708^*$). En cuanto a la actividad antioxidante FRAP y DPPH ambas presentaron una muy alta correlación (0.992^{**}), la cual en ambas estuvo influenciada mayormente por el contenido fenólico específicamente de dos glucósidos (narirutina y hesperidina) y una aglicona (naringenina). En el presente estudio se encontraron más correlaciones en la parte interna de la naranja, esto fue contrario a lo señalado por Elkhatim y colaboradores (2018) con referencia a que observaron una mayor correlación entre los metabolitos de la cáscara que en los de la parte interna de la fruta (pulpa).

Cáscara

En el presente estudio la fracción bioaccesible del extracto de cáscara el contenido de polifenoles totales presentó una alta correlación positiva con la actividad antioxidante FRAP ($r=0.858^{**}$) y con la vitamina C (0.855^{**}). Arena, Fallico y Maccarone (2001) afirmaron que los compuestos fenólicos en los cítricos contribuyeron menos que la vitamina C en el establecimiento del poder antioxidante. En el presente estudio la vitamina C contribuyó un 16 % más que los polifenoles totales al poder antioxidante FRAP.

Por su parte, Fidrianny, Harnovi & Insanu, (2014) también encontraron una correlación alta y positiva entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante por FRAP en extractos de cáscara de naranja Kintamani ($r = 0.984$), naranja Jember ($r = 0.998$) y naranja Banyuwangi ($r = 0.962$) y por DPPH ($r = 0.984$, $r = 0.730$ y $r = 0.976$, respectivamente). Así mismo, resaltan que los métodos FRAP y DPPH tienen un mecanismo de reacción diferente, donde el mecanismo de DPPH son ensayos de transferencia de electrones y en FRAP son

ensayos redox. Además, señalan que los resultados de su estudio mostraron que la capacidad de eliminación de DPPH de todas las muestras de cáscaras de naranja eran lineales con la capacidad de FRAP. También Elkhatim y colaboradores (2018) señalan que una correlación positiva entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles total indica que el contenido fenólico podría ser uno de los principales contribuyentes a las capacidades antioxidantes de estos residuos de frutas. En el presente estudio, si bien el contenido de polifenoles totales correlacionó con la actividad antioxidante, esto solo ocurrió con el método de FRAP ya que la correlación con DPPH no fue significativa.

Bagazo

En la fracción bioaccesible del extracto de bagazo la inhibición de la ECA estuvo influenciada por la actividad antioxidante y la vitamina C, ya que el porcentaje de inhibición ECA presentó una alta correlación positiva con la actividad antioxidante DPPH ($r=0.765^*$) y con la vitamina C ($r=0.734^*$). Arena, Fallico y Maccarone (2001) afirmaron que los compuestos fenólicos en los cítricos contribuyen menos que la vitamina C en el establecimiento del poder antioxidante. Lo cual coincide con el presente estudio ya que la vitamina C presentó una correlación positiva muy alta con la actividad antioxidante DPPH ($r=0.996^{**}$), mientras que el contenido de polifenoles totales no correlacionó de manera significativa con la actividad antioxidante.

7.7 Planteamientos finales

Aunque en el presente estudio se realizó la bioaccesibilidad de extractos de subproductos de naranja con el fin de comprobar si la fracción bioaccesible de estos podía inhibir la ECA, también es destacable el posible efecto sinérgico que se produjo entre los componentes de las diferentes matrices alimentarias, es decir, el jugo, la cáscara y el bagazo. Ya que es en la cáscara donde normalmente se encuentra más pectina, por lo que se puede sugerir que su presencia en el extracto de cáscara pudo haber tenido un efecto sinérgico con el contenido de polifenoles totales al protegerlos de la oxidación, esto contribuyó benéficamente a

la actividad antioxidante lo cual se tradujo en un efecto positivo en la inhibición de la ECA. Sin embargo, puede ser que la presencia de pectina en la cáscara haya tenido un efecto antagonista con la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos, ya que, a pesar de tener el mayor contenido de compuestos fenólicos, el extracto de cáscara fue el que presentó menor bioaccesibilidad de compuestos fenólicos.

Además, también se presentó un posible efecto sinérgico entre los mismos compuestos fenólicos en las diferentes matrices ya que al analizar la actividad IECA de algunos compuestos fenólicos individualmente, esta era menor a la presentada por los tres diferentes extractos. De manera que se acepta la hipótesis planteada para este estudio que “los extractos obtenidos de diferentes partes de la naranja (*Citrus sinensis*) y sometidos a digestión *in vitro* tienen un efecto antioxidante y antihipertensivo en un modelo *in vitro* de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina”. Sin embargo, son necesarios más estudios para entender la influencia de la matriz alimentaria en la asociación con los compuestos fenólicos, así como estudios *in vivo* para evaluar la biodisponibilidad de los compuestos de estos subproductos un sistema fisiológico integrado.

8. Conclusiones

- De los tres extractos fue el de bagazo de naranja el que presentó mayor contenido de ácido ascórbico, pero también fue el de menor bioaccesibilidad.
- El extracto de cáscara fue el que presentó mayor actividad antioxidante en la fracción bioaccesible.
- El extracto de cáscara fue el que presentó mayor contenido de polifenoles totales.
- El extracto de jugo de naranja presentó un mayor contenido en la mayoría de los compuestos fenólicos de la fracción bioaccesible, sin embargo los compuestos fenólicos del extracto de cáscara presentaron mayor bioaccesibilidad.
- Aunque el contenido de hesperidina en los tres extractos es elevado, su porcentaje de bioaccesibilidad fue el menor con respecto a los otros compuestos fenólicos analizados.
- Se observó un posible efecto sinérgico de los compuestos fenólicos puros en la inhibición de la ECA.
- El porcentaje IECA de la fracción bioaccesible de los extractos era mayor al producido por compuestos fenólicos puros individuales.
- La fracción bioaccesible del extracto de cáscara fue la que presentó mayor porcentaje de IECA de los tres extractos.
- Los subproductos de naranja (jugo, cáscara y bagazo) inhiben la actividad de la ECA *in vitro*, lo cual apunta a una posible actividad antihipertensiva.
- Aunque las conclusiones obtenidas con esta simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* no pueden estimar directamente las condiciones humanas *in vivo*, se resalta que este modelo es útil para estudiar el efecto de la matriz alimentaria sobre la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos.

9. Bibliografía

- Ajeigbe, O., Ademosun, A., & Oboh, G. (2020). Relieving the tension in hypertension: Food–drug interactions and anti-hypertensive mechanisms of food bioactive compounds. *Journal Of Food Biochemistry*. doi: 10.1111/jfbc.13317
- Al-Juhaimi, F. (2014). Citrus fruits by-products as sources of bioactive compounds with antioxidant potential. *Pakistan Journal of Botany*, 46(4), 1459-1462.
- Ancos, B., Cilla, A., Barberá, R., Sánchez-Moreno, C., Cano MP. (2017) Influence of orange cultivar and mandarin postharvest storage on polyphenols, ascorbic acid and antioxidant activity during gastrointestinal digestion. *Food Chem.* 2017 Jun 15; 225:114-124. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.12.098. Epub 2017 Jan 4. PMID: 28193404.
- Arena, E., Fallico, B., & Maccarone, E. (2001). Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chemistry*, 74, 423–427. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00125-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00125-X)
- Argyri, K., Komaitis, M., & Kapsokefalou, M. (2006). Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of *in vitro* digestion. *Food Chemistry*, 96(2), 281-289. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.02.035
- Arroyo, R., & Leon, R. (2014). Densidad de carga y método de extracción en el rendimiento y calidad de aceite esencial de los flaveados de dos variedades de naranja (*Citrus sinensis*) (Ingeniería agroindustrial). Universidad Nacional del Santa. Recuperado el 14 de junio de 2018 de: <http://repositorio.uns.edu.pe/handle/UNS/2064>.
- Aschoff, J., Kaufmann, S., Kalkan, O., Neidhart, S., Carle, R., & Schweiggert, R. (2015). *In Vitro* Bioaccessibility of Carotenoids, Flavonoids, and Vitamin C from Differently Processed Oranges and Orange Juices [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 578-587. doi: 10.1021/jf505297t
- Assefa, A., Ko, E., Moon, S., & Keum, Y. (2016). Antioxidant and antiplatelet activities of flavonoid-rich fractions of three citrus fruits from Korea. *3 Biotech*, 6(1). doi: 10.1007/s13205-016-0424-8
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494). doi: 10.4067/s0718-04622006000200010

- Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*.99(1). doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
- Balasuriya, B. W. N., & Rupasinghe, H. P. V. (2011). Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension. *Functional Foods in Health and Disease*, 5, 172–188. doi: 10.31989/ffhd. v1i5.132
- Barros, H., Ferreira, T., & Genovese, M. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, 134(4), 1892-1898. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.090
- Becker, M., Nunes, G., Ribeiro, D., Silva, F., Catanante, G., & Marty, J. (2019). Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. doi: 10.21577/0103-5053.20190003
- Benzie I. & Strain J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 239(1):70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Berenguer G., Lazaro J., (2016). Algunas consideraciones sobre la hipertensión arterial. *MEDISAN*, 20(11), 2434-2438. Recuperado en 23 de marzo de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192016001100015&lng=es&tlng=es.
- Blancas-Benítez, F., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G., & Sáyago-Ayerdi, S. (2019). Bioaccesibilidad y cinética de liberación *in vitro* de compuestos fenólicos en pulpas de guayaba (*Psidium guajava* L.) y guanábana (*Annona muricata* L.). *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 22. doi: 10.22201/fesz.23958723e.2019.0.169
- Bondet, V., Brand-Williams, W. & Berset C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmitt Wissenschaft Technologie Food Science and Technology*, 30(6), 609-615. doi: 10.1006/fstl.1997.0240
- Campos, F., Ribeiro, S., Della Lucia, C., Pinheiro-Sant'Ana, H., & Stringheta, P. (2009). Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. *Química Nova*, 32(1), 87-91. doi: 10.1590/s0100-40422009000100017
- Campos, I., Hernández, L., Pedroza, A., Medina, C.& Barquera, S., (2018) Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia, diagnóstico y tipo de

- tratamiento. *Ensanut MC* 2016. *Salud Pública de México*. 60 (3). 233-243. doi: <http://dx.doi.org/10.21149/8813>.
- Campos, I., Hernández, L., Rojas, R., Pedroza, A., Medina, C. & Barquera, S. (2013). Hipertensión arterial: prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos. *Salud Pública de México*. 55(2). 144-150. Recuperado el 1 junio de 2019 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342013000800011&lng=es&tlng=es.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001) Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22 (2), 5-14. Recuperado el 1 de junio de 2019 de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001>.
- Chebrolu, K., Jayaprakasha, G., Yoo, K., Jifon, J., & Patil, B. (2012). An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 443–449. doi: 10.1016/j.lwt.2012.02.004
- 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. doi: 10.3390/plants9020196
- Cilla, A., Perales, S., Lagarda, M., Barberá, R., Clemente, G., & Farré, R. (2011). Influence of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *Journal Of Food Composition and Analysis*, 24(1), 87-94. doi: 10.1016/j.jfca.2010.03.029
- Cilla, A., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F., Espín, J. & Barberá R. (2009). Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 114(3), 813-820. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.10.019
- Cisternas, P., Silva-Alvarez, C., Martínez, F., Fernandez, E., Ferrada, L., Oyarce, K., Salazar, K., Bolaños, J. & Nualart, F. (2014). The oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, regulates neuronal energy metabolism. *Journal of neurochemistry*, 129(4), 663–671. <https://doi.org/10.1111/jnc.12663>
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scaccocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321-1342. doi: 10.3390/ijms11041321
- Devasagayam, T. P., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and

future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794–804.

Elkhatim, K. A., Elagib, R., & Hassan, A. B. (2018). Content of phenolic compounds and vitamin C and antioxidant activity in wasted parts of Sudanese citrus fruits. *Food science & nutrition*, 6(5), 1214–1219. <https://doi.org/10.1002/fsn3.660>

Erkaya-Kotan, T. (2020). *In vitro* angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory and antioxidant activity of probiotic yogurt incorporated with orange fibre during storage. *Journal Of Food Science and Technology*, 57(6), 2343-2353. doi: 10.1007/s13197-020-04272-1

Esclapez, M., García J., Mulet, A., & Cárcel, J. (2011). Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108-120. doi: 10.1007/s12393-011-9036-6

Escobar, M. (2019). Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México. (Maestría). Instituto Politécnico Nacional de México. Recuperado el 1 de junio de 2019 de: <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/9612>.

Fernández-Fernández, A., Dellacassa, E., Nardin, T., Larcher, R., Gámbaro, A., Medrano-Fernandez, A., & del Castillo, M. (2021). *In Vitro* Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Citrus Pomaces and Orange Pomace Biscuits. *Molecules*, 26(12), 3480. doi: 10.3390/molecules26123480

Fernández, K., & Labra, J. (2013). Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chemistry*, 139(1-4), 196-202. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.021

Fidrianny, I., Harnovi, M., & Insanu, M. (2014). Evaluation of antioxidant activities from various extracts of sweet orange peels using DPPH, FRAP assays and correlation with phenolic, flavonoid, carotenoid content. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 186-190. Recuperado de: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/1400>

Galván, C., Guisado, R., García, M., Ochoa, J. & Ocaña, J. (2008). Antioxidantes y ejercicio físico: funciones de la melatonina. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 1(2),61-72. Fecha de Consulta 4 de mayo de 2020. ISSN: 1888-7546. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=3233/323327655004>

Gamboa, R. A., & Benavides, A. R. (2010). Artículo de revisión Más allá de la hipertensión arterial, 27(1), 45–52. *Acta Médica Peruana*, 27(1), 45-52. Recuperado en 13 de junio de 2019 de:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172010000100009&lng=es&tlng=es.

- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J. D., & Singla, A. K. (2001). Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15(8), 665-669. doi: 10.1002/ptr.1074.
- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., & Caristi, C. (2007). Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules*, 12(8), 1641-1673. doi: 10.3390/12081641
- Gil, A., (2013). *Tratado de nutrición. Tomo II. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos* Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Gil-Izquierdo, A., Gil, M., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. (2001). *In Vitro* Availability of Flavonoids and Other Phenolics in Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 1035-1041. doi: 10.1021/jf0000528
- González, J. & Chirino, D. (2014). Hipertensión arterial: el diagnóstico del daño en órganos diana en etapa subclínica. *Gaceta Médica Espirituana*, 16(1), 6-11. Recuperado el 01 de diciembre de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1608-89212014000100002&lng=es&tlng=en.
- Gorinstein, S., Huang, D., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Yamamoto, K., & Soliva-Fortuny, R. et al. (2006). Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography. The antioxidant potential of citrus fruit. *Acta Chromatographica*, 108-124. Recuperado el 8 de agosto de 20128, de <https://ipn.elsevierpure.com/es/publications/determination-of-naringin-and-hesperidin-in-citrus-fruit-by-high->
- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y., Haruenkit, R., Lojek, A., & Číž, M. et al. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74(3), 309-315. doi: 10.1016/s0308-8146(01)00157-1
- Guan, Y., Dai, P. & Wang, H., 2020. Effects of vitamin C supplementation on essential hypertension. *Medicine*, 99(8), p.e19274. doi: 10.1097/MD.00000000000019274
- Guerrero-García, C., & Rubio-Guerra, F. (2018). Combination therapy in the treatment of hypertension. *Drugs In Context*, 7, 1-9. doi: 10.7573/dic.212531
- Guerrero, M. Elementos para la evaluación eficaz de productos naturales con posibles efectos antihipertensivos. (2009). *Biomédica*, Bogotá, v. 29, n. 4, p. 547-557, Recuperado en 28 de mayo de 2019, de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572009000400008&lng=en&nrm=iso

- Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., Garcia, S., Arola, L., Pujadas, G., & Muguerza, B. (2012). Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by Flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies. *PLoS ONE*, 7(11), 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0049493.
- Gunathilake, K., Ranaweera, K., & Rupasinghe, H. (2018). Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of selected edible green leaves. Recuperado el 1 de mayo del 2020, de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.096>
- Halvorsen, B., Holte, K., Myhrstad, M., Barikmo, I., Hvattum, E., & Remberg, S. et al. (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal Of Nutrition*, 132(3), 461-471. Recuperado el 10 de agosto de 2019 de: <https://experts.umn.edu/en/publications/a-systematic-screening-of-total-antioxidants-in-dietary-plants>
- Hartley, L., Flowers, N., Holmes, J., Clarke, A., Stranges, S., Hooper, L., & Rees, K. (2013). Green and black tea for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013(6). doi: 10.1002/14651858.cd009934.pub2
- Hernández-Ledesma, B., Martín-Álvarez, P., & Pueyo, E. (2003). Assessment of the Spectrophotometric Method for Determination of Angiotensin-Converting-Enzyme Activity: Influence of the Inhibition Type. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4175-4179. doi: 10.1021/jf034148o
- Homayouni, F., Haidari, F., Hedayati, M., Zakerkish, M. & Ahmadi, K. (2018). Blood pressure lowering and anti-inflammatory effects of hesperidin in type 2 diabetes; a randomized double-blind controlled clinical trial. *Phytotherapy Research*. 32(6). 1073-1079. doi: 10.1002/ptr.6046.
- Hügel, H., Jackson, N., May, B., Zhang, A., & Xue, C. (2016). Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine*, 23(2), 220-231. doi: 10.1016/j.phymed.2015.12.012
- Iglesias, L., Mas, A., Bravo, F., Aragonès, G., Muguerza, B. & Arola, A. (2019) Optimization of a polyphenolextraction methodfor sweet orange pulp (*Citrus sinensis* L.) to identify phphenolic compounds consumedfrom sweet oranges. *PLoS ONE* 14(1): e0211267. doi: 10.1371/journal.pone.0211267.
- Ikemura, M., Sasaki, Y., Giddings, J. & Yamamoto, J. (2012). Preventive Effects of Hesperidin, Glucosyl Hesperidin and Naringin on Hypertension and Cerebral Thrombosis in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Phytotherapy Research*, 26(9). 1272-1277. doi: 10.1002/ptr.3724.

- Izadifar, Z., Babyn, P., & Chapman, D. (2018). Ultrasound Cavitation/Microbubble Detection and Medical Applications. *Journal of Medical and Biological Engineering*. doi:10.1007/s40846-018-0391-0
- Juraschek, S.P., Guallar, E., Appel, L.J., Miller, E.R., 2012. Effects of vitamin C supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*. doi:10.3945/ajcn.111.027995.
- Kanaze, F., Bounartzi, M., Georgarakis, M., & Niopas, I. (2006). Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(4), 472-477. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602543
- Khan, M., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851-858. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.08.046
- Kim, Y., & Kim, M. (2020). HPLC-UV method for the simultaneous determinations of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in human plasma. Consultado el 16 julio 2020, de: <http://dx.doi.org/10.12793/tcp.2016.24.1.37>
- Konukoglu, D. & Uzun, H. (2017). Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Hypertension: from basic research to clinical practice. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Cham. 956. 511-540. doi: 10.1007/5584_2016_90.
- Lagha-Benamrouche, S., & Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.048>
- Lanza, C. (2004). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Citrus Fruits. Processed and Derived Products of Oranges*. 1346–1354. doi: <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00243-1>
- Lavilla, I., & Bendicho, C. (2017). Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. *Water Extraction of Bioactive Compounds*, 291–316. doi:10.1016/b978-0-12-809380-1.00011-5
- León, J., Guerra, G., Yanes, M., Calderín, R. & Gutiérrez, A. (2014). Disfunción endotelial en hipertensos de reciente diagnóstico. *Revista Cubana de Medicina*, 53(4), 417-429. Recuperado en 28 de mayo de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232014000400006&lng=es&tlng=es

- Li, J., Zhao, J., Wang, X., Qayum, A., Hussain, M., & Liang, G. et al. (2019). Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibitory Peptides from Fermented Bovine Milk Started by *Lactobacillus helveticus* KLDS.31 and *Lactobacillus casei* KLDS.105: Purification, Identification, and Interaction Mechanisms. *Frontiers In Microbiology*, 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.02643
- Liu, Y., Heying, E., & Tanumihardjo, S. (2012). History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 530–545. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00201.x>
- Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Jameson, L. & Loscalzo, J. (2012). Harrison. *Principios de Medicina Interna*. (18th ed). México: Mcgraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. 1909-2044.
- López-Carreras, N., Castillo, J., Muguera, B. & Aleixandre, A. (2019). Endothelium-dependent vascular relaxing effects of different citrus and olive extracts in aorta rings from spontaneously hypertensive rats. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.021>
- Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J., Lizasoain, I., Moro, M., & Portolés, A. (2017). *Velázquez Farmacología básica y clínica* (19th ed.) México: Médica Panamericana. 383-394.
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J., & Fernández-López, J. (2018). *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, 107, 423-436. doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.055
- M'hiri, N., Ioannou, I., Mihoubi Boudhrioua, N., & Ghouil, M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food And Bioproducts Processing*, 96, 161-170. doi: 10.1016/j.fbp.2015.07.010
- Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M. & Cho, M. (2018). Citrus waste derived nutraceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives. *Journal of Functional Foods*, 40, pp.307-316.
- Mamta, A. & Parminder, K., (2013). Antimicrobial & Antioxidant Activity of Orange Pulp and Peel. *International Journal of Science and Research (IJSR)* ISSN (Online): 2319-7064
- Martínez, M. & Gort, M. (2015). Factores de riesgo en pacientes hipertensos en el Hospital Patacamaya, La Paz. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*. 19(5). 938-947. Recuperado en 28 de mayo de 2019 de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942015000500016&lng=es&tlng=es.

- Mazurek, A., Włodarczyk-Stasiak, M., Pankiewicz, U., Kowalski, R., & Jamroz, J. (2020). Development and validation of a differential pulse polarography method for determination of total vitamin C and dehydroascorbic acid contents in foods. *LWT*, 118, 108828. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108828
- Medina N., Ayora T., Espinosa H., Sánchez A. & Pacheco, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7(3), 47. doi:10.3390/agronomy7030047
- Mennah-Govela, Y., & Bornhorst, G. (2017). Fresh-Squeezed Orange Juice Properties Before and During *In Vitro* Digestion as Influenced by Orange Variety and Processing Method. *Journal of Food Science*, 82(10), 2438-2447. doi: 10.1111/1750-3841.13842
- Mercado-Mercado, G., de la Rosa, L., & Alvarez-Parrilla, E. (2020). Effect of pectin on the interactions among phenolic compounds determined by antioxidant capacity. *Journal Of Molecular Structure*, 1199, 126967. doi: 10.1016/j.molstruc.2019.126967
- Montero-Calderon, A., Cortes, C., Zulueta, A., Frigola, A., & Esteve, M. (2019). Green solvents and Ultrasound-Assisted Extraction of bioactive orange (*Citrus sinensis*) peel compounds. *Scientific Reports*, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-52717-1
- Morand, C., Dubray, C., Milenkovic, D., Lioger, D., Martin, J., Scalbert, A. & Mazur, A. (2010). Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(1), 73-80. doi: 10.3945/ajcn.110.004945.
- Nader, S., & Ibrahim, A. (2018). Orange peel fixed oil (*Citrus sinensis* "Valencia"), physiochemical properties, fatty acids profile, potencial uses and the effect of environmental factor son it, 24(1), 91–98. Recuperado el 15 de agosto del 2020 de: <http://journal.agrojournal.org/>.
- Nejati, F., Rizzello, C., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F., & Gobbetti, M. (2013). Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -amino butyric acid (GABA). *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 183-189. doi: 10.1016/j.lwt.2012.09.017
- Oak, M., Auger, C., Belcastro, E., Park, S., Lee, H., & Schini-Kerth, V. (2018). Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the

endothelium. *Free Radical Biology And Medicine*, 122, 161-170. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.018

Ordoñez-Gómez, E., Reátegui-Díaz, D, & Villanueva-Tiburcio, J. (2018). Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 113-121. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.13>

OMS, (2015). Preguntas y respuestas sobre la hipertensión. [online] Recuperado el 29 de mayo de 2019 de <https://www.who.int/features/qa/82/es/>.

Ozcan, T., Akpınar-Bayazit, A., Yılmaz-Ersan, L. & Delikanlı, B. (2014). Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), pp.393-396. doi. 10.7763/IJCEA. 2014.V5.416.

Padayatty, S., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K., & Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18–35. <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719272>

Padilla de la Rosa, J., Ruiz-Palomino, P., Arriola-Guevara, E., García-Fajardo, J., Sandoval, G. & Guatemala-Morales, G. (2018). A Green Process for the Extraction and Purification of Hesperidin from Mexican Lime Peel (*Citrus aurantifolia* Swingle) that is Extendible to the Citrus Genus. *Processes*. 6(12). 266. doi:10.3390/pr6120266.

PAHO/OMS. (2017). Día Mundial de la Hipertensión 2017: Conoce tus números. Recuperado en 25 de noviembre de 2018, de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13257:dia-mundial-de-la-hipertension-2017-conoce-tus-numeros&Itemid=42345&lang=es.

PAHO/OMS. (2018). Hipertensión. Recuperado en 25 de noviembre de 2018, de <https://www.paho.org/hipertension/>.

Paladino, S. (2008). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.). Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis. Recuperado el 20 de mayo de 2019 de: http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/2627/tesispaladino.pdf.

Pan D. & Guo Y. (2010). Optimization of sour milk fermentation for the production of ACE-inhibitory peptides and purification of a novel peptide from whey protein hydrolysate. *International Dairy Journal*, 20(7), 472-479. 10.1016/j.idairyj.2010.01.007

- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270–278. doi:10.4161/oxim.2.5.9498.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2812-2819. doi: 10.1093/jn/133.9.2812
- Peñarrieta, J., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. & Bravo, J. (2014). Phenolic Compounds in Food. *Bolivian Journal of Chemistry*, 31(2), 68–81. Recuperado el 20 de mayo de 2019 de <http://www.redalyc.org/pdf/4263/426339682006.pdf>
- Pereira-Caro, G., Borges, G., van der Hooft, J., Clifford, M., Del Rio, D., & Lean, M. et al. (2014). Orange juice (poly)phenols are highly bioavailable in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100(5), 1378-1384. doi: 10.3945/ajcn.114.090282
- Primo Y. (2007). *Química orgánica básica y aplicada* (pp. 917-920). Barcelona, España: Reverté.
- Prior, R., 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. doi: 10.1021/jf0502698
- Proteggente, A., Pannala, A., Paganga, G., Van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., van de Put, F., Dacombe, C. & Rice-Evans, C.A., “The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition”. *Free Radic Res* 36. 217-233. 2002.
- Quan, W., Tao, Y., Lu, M., Yuan, B., Chen, J., & Zeng, M. et al. (2017). Stability of the phenolic compounds and antioxidant capacity of five fruit (apple, orange, grape, pomelo and kiwi) juices during *in vitro* -simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(5), 1131-1139. doi: 10.1111/ijfs.13682
- Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. 27, 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>.
- Quiroz A. & Fernandez-Arias M. 2009. A Screening Method for the Determination of Ascorbic Acid in Fruit Juices and Soft Drinks. *Food Chemistry* 116(2): 509-512. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.013

- Ramli, F., & Azlan, A. (2017). Comparison of vitamin C content in citrus fruits by titration and high-performance liquid chromatography (HPLC) methods. *International Food Research Journal* 24(2):726-733
- Repilado Álvarez, A. (2016). Antioxidantes Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Recuperado en 25 de noviembre de 2018, de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ADRIAN%20REPILADO%20ALVAR EZ.pdf>.
- Rivas-Cantú, R. C., Jones, K. D., & Mills, P. L. (2013). A citrus waste-based biorefinery as a source of renewable energy: technical advances and analysis of engineering challenges. *Waste Management & Research*, 31(4), 413–420. doi:10.1177/0734242x13479432
- Rodrigo, R., Brito, R., & González, J. (2016). Oxidative Stress and Essential Hypertension. *Update on Essential Hypertension*. doi:10.5772/64079
- Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the *in vitro* bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*
- Ruiz Reyes, S. (2018). Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante in vitro del zumo de “pur” *Passiflora tripartita* var. *mollissima* (Passifloraceae). *Arnaldoa*, 25(3). doi: 10.22497/arnaldoa.253.25312
- Ruviaró, A., Barbosa, P., Martins, I., de Ávila, A., Nakajima, V., & Dos Prazeres, A. et al. (2020). Flavanones biotransformation of citrus by-products improves antioxidant and ACE inhibitory activities *in vitro*. *Food Bioscience*, 38, 100787. doi: 10.1016/j.fbio.2020.100787
- Safdar, M., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K. & Saddozai, 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>.
- SAGARPA. (2016). Planeación agrícola nacional 2016-2030. Recuperado en 25 de noviembre de 2018, de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257073/Potencial-C_tricosparte_uno.pdf.
- Saladin, K. (2013). *Anatomía y fisiología* (6th ed.). México: McGraw-Hill Interamericana. 758-802.

- Sanchez-Aldana, A., Aguila, N., Nevarez-Moorillon, G., Esquivel, J. (2013). Comparative extraction of pectin and polyphenols from Mexican lime pomace and bagasse. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 8(4), 309-322. doi: 10.3844/ajabssp.2013.309.322
- Sánchez-Moreno, C., Cano, M., de Ancos, B., Plaza, L., Olmedilla, B., Granado, F., & Martín, A. (2003). Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 454-460. doi: 10.1093/ajcn/78.3.454
- Saura-Calixto, F., & Goñi, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94(3), 442–447. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.11.033
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Recuperado en 25 de noviembre de 2018, de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- (SIAP). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Recuperado en 25 de noviembre de 2018, de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- (SIAP). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (n.d.). Reporte especial naranja. Recuperado en 25 de noviembre de 2018, de <http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100602-reporte-naranja.pdf>.
- Shamah, Cuevas, Gaona, Gómez, Morales, Hernández & Rivera. (2018) Sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes en México, actualización de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Salud Publica Mex* 2018;60: 244-253. <https://doi.org/10.21149/8815>
- Singh, B., Singh, J., Kaur, A., & Singh, N. (2020). Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Research International*, 132, 109114. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109114
- Singleton, V., R. Orthofer & R.M. Lamuela Raventos (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299: 152 178
- Spínola, V., Mendes, B., Câmara, J., & Castilho, P. (2013). Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 489-495. doi: 10.1016/j.lwt.2012.08.020
- Stinco, C., Fernández-Vázquez, R., Escudero-Gilete, M., Heredia, F., Meléndez-Martínez, A. & Vicario, I. (2012). Effect of Orange juice's processing on the color,

- particle size, and bioaccessibility of carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 1447–1455. <https://doi.org/10.1021/jf2043949>.
- Su, D., Liu, H., Zeng, Q., Qi, X., Yao, X., & Zhang, J. (2017). Changes in the phenolic contents and antioxidant activities of citrus peels from different cultivars after *in vitro* digestion. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(11), 2471-2478. doi: 10.1111/ijfs.13532
- Szeto, Y., Tomlinson, B., & Benzie, I. (2002). Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. *British Journal of Nutrition*, 87(1), 55-59. doi: 10.1079/bjn2001483
- Tarko, T. & Duda-Chodak, A. (2020). Influence of Food Matrix on the Bioaccessibility of Fruit Polyphenolic Compounds. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 68(5), 1315-1325. doi: 10.1021/acs.jafc.9b07680
- Taga, M. S., Miller, E. E., y Pratt, D.E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61 (5), 928-931. <https://doi.org/10.1007/BF02542169>
- Testai, L. & Calderone, V. (2017). Nutraceutical Value of Citrus Flavanones and Their Implications in Cardiovascular Disease. *Nutrients*, 9(5), p.502. DOI:10.3390/nu9050502.
- Tortora, G. & Derrickson, B. (2013). *Principios de anatomía y fisiología* (13th ed). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 649.
- USDA. (2018). National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release. Recuperado en 29 de noviembre de 2018, de <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/09216?fgcd=&manu=&format=Abridged&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=Oranges%2C+raw%2C+with+peel&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=>.
- Vanamala, J., Reddivari, L., Yoo, K., Pike, L., & Patil, B. (2006). Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. *Journal Of Food Composition and Analysis*, 19(2-3), 157-166. doi: 10.1016/j.jfca.2005.06.002
- Velderrain- Rodríguez, G., Blancas-Benítez, F., Wall-Medrano, A., Sáyago-Ayerdi, S., & González-Aguilar, G. (2017). Bioaccessibility and Bioavailability of Phenolic Compounds from Tropical Fruits. *Fruit and Vegetable Phytochemicals*, 155-164. doi: 10.1002/9781119158042.ch8

- Venereo, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133. Recuperado en 20 de abril de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009&lng=es&tlng=es.
- Wang, X., Ouyang, Y., Liu, J., & Zhao, G. (2013). Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *British Journal of Nutrition*, 111(1), 1-11. doi: 10.1017/s000711451300278x
- Wein, A., Campbell, M. and Walsh, P., 2008. *Urología*. 9th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, pp.161-164.
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of *In Vitro* Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols—A Non-Systematic Review. *Nutrients*, 12(5), 1401. doi: 10.3390/nu12051401
- Wu, J., Aluko, R. & Muir, A. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A*. 950 (1-2). 125-130. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00052-3).
- Wunpathe, C., Potue, P., Maneesai, P., Bunbupha, S., Prachaney, P., & Kukongviriyapan, U. et al. (2018). Hesperidin Suppresses Renin-Angiotensin System Mediated NOX2 Over-Expression and Sympathoexcitation in 2K-1C Hypertensive Rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, 46(04), 751-767. doi: 10.1142/s0192415x18500398.
- Yamamoto, M., Suzuki, A. & Hase, T. (2008). Short-Term Effects of Glucosyl Hesperidin and Hesperetin on Blood Pressure and Vascular Endothelial Function in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 54(1). 95-98. doi: <https://doi.org/10.3177/jnsv.54.95>
- Zhang, Y., Pechan, T., & Chang, S. (2018). Antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activities of phenolic extracts and fractions derived from three phenolic-rich legume varieties. *Journal of functional foods*, 42, 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.060>
- Zulkifli, K., Abdullah, N., Abdullah, A., Aziman, N., & Kamarudin, S. (2012). Bioactive Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Selected Fruit Peels. *IPCBE*, 49, 66-70. DOI: 10.7763/IPCBE. 2012. V49. 14