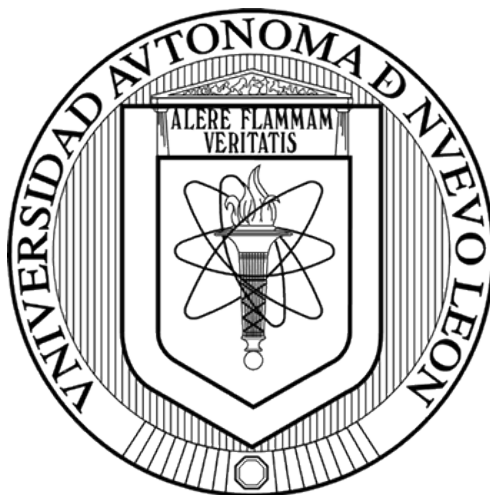


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y CUANTIFICACIÓN DE
COMPUESTOS DE VALOR COMERCIAL EXTRAIDOS DE RESIDUOS DE
CÁSCARA DE NARANJA POR MEDIO DE UNA TÉCNICA VERDE

POR

ALEJANDRO DELGADO CORTEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRÍA EN MANEJO Y
APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE RECURSOS
BIÓTICOS

2025

**DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y CUANTIFICACIÓN DE
COMPUESTOS DE VALOR COMERCIAL EXTRAIDOS DE RESIDUOS DE
CÁSCARA DE NARANJA POR MEDIO DE UNA TÉCNICA VERDE.**

Comité de Tesis



Dr. José Ezequiel Viveros Valdez

Presidente



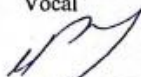
Dra. Catalina Leos Rivas

Secretario



Dr. Isaías Juárez Ramírez

Vocal



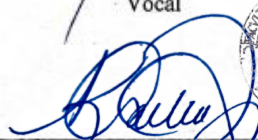
Dra. Catalina Rivas Morales

Vocal



Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

Vocal



Dra. Katiushka Arevalo



**DIRECCIÓN
DE POSGRADO**

Subdirectora de posgrado

**DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y CUANTIFICACIÓN DE
COMPUESTOS DE VALOR COMERCIAL EXTRAIDOS DE RESIDUOS DE
CÁSCARA DE NARANJA POR MEDIO DE UNA TÉCNICA VERDE.**

Dirección de Tesis



Dr. José Ezequiel Viveros Valdez

Director



Dr. Carlos Jesús Castillo Zacarías

Director externo

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el programa de apoyo a la ciencia, tecnología e innovación, PROACTI: 74-CA-2023 y 8-CAAFE-2024.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primordialmente al Dr. José Ezequiel Viveros Valdez, al Dr. Carlos Jesús Castillo Zacarías por darme la oportunidad de ser parte de este trabajo de investigación y por haberme brindado su apoyo, confianza y enseñanza a lo largo de la Maestría.

A mi comité de tesis, Dra. Catalina Leos Rivas, Dr. Isaías Juárez Ramírez, Dra. Catalinas Rivas Morales, al Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez por sus consejos, puntos de vista para mejorar la investigación.

Al consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías, CONAHCYT (1273651) por el apoyo económico brindado, así como a PROACTI, UANL: 74-CA-2023 y 8-CAAFE-2024 por el financiamiento otorgado a este proyecto.

Al laboratorio de Química Analítica y de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas y al Laboratorio de Ingeniería Ambiental y de Eco-materiales y energía, por permitirme utilizar sus instalaciones.

A mis queridos amigos de laboratorio: Fernanda, Daniel, Sebastián, Santiago, Angela, Marcela, Ana, Sara, Diego, Alondra, Víctor, Merry, Nahomí, Blanca, Llaca, Cesar, Erick, Jared, Princesa, Ángel y Cory gracias por haber estado dispuestos a ayudarme, agradezco de corazón el tiempo compartido con ustedes, sus consejos y opiniones, recordare todos los momentos que compartí con ustedes, me llevo buenos momentos, así como al Dr. Luis Felipe Garay Rodríguez y al Dr. David Gilberto García Hernández por sus sugerencias y compartir de sus conocimientos conmigo para mejorar mis procedimientos o resultados.

A mis compañeras de generación Itzel, Andrea y Rubí, gracias por ser unas grandes amigas y acompañarnos en este camino que es la maestría, gracias por su ayuda a lo largo de los semestres vividos.

Gracias a las personas que creyeron en mí a las personas que están presentes en mi vida y a las que ya no lo están, siempre los llevo conmigo con un gran recuerdo en mi corazón.

A mi mamá, mi papá, mi hermano y a Tora, gracias por siempre estar presentes para mí, para aconsejarme y darme los ánimos necesarios siempre para salir adelante, les agradezco infinitamente por su disposición a escucharme en mis momentos difíciles, de frustración y gracias por dejarme compartir mis logros con ustedes, los quiero y amo mucho.

A todos, muchas gracias.

DEDICATORIA

A mi mamá, papá y hermano, por darme de su fuerza y apoyo incondicional. A todos mis amigos que me acompañaron durante mis estudios y familiares.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Naranja	5
2.2 Compuestos en la cáscara de naranja	7
2.2.1 Polisacáridos	7
2.2.1.1 Pectina	7
2.2.1.2 Usos de la pectina (hidrogeles, películas, alimentos y recubrimientos)	8
2.2.2 Fenoles	9
2.2.3 Flavonoides.....	9
2.3 Extracción verde	10
2.3.1 Extracción física.....	11
2.3.2 Extracciones químicas (Solventes eutécticos profundos)	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	13
4. HIPÓTESIS.....	14
5.OBJETIVO GENERAL.....	14
5.1 Objetivos específicos	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1 Obtención del material vegetal	15
6.1.1 Recolección de muestras y almacenamiento	15
6.2 Pretratamiento de la cáscara de naranja	15
6.3 Preparación de Solventes Eutécticos Profundos (SEP)	16
6.4 Extracción asistida por ultrasonido y solventes eutécticos profundos.....	16
6.5 Determinación de las propiedades fisicoquímicas del solvente eutéctico profundo (SEP).....	17
6.5.1 Densidad	17
6.5.2 pH.....	18

6.5.3 Viscosidad.....	18
6.6 Actividad antirradical por el reactivo DPPH	18
6.7 Actividad antimicrobiana.....	18
6.8 Determinación de compuestos fenólicos, fenólicos totales y pectina	19
6.8.1 Cuantificación de fenoles	19
6.8.2 Cuantificación de la pectina por gravimetría	19
6.8.3 FTIR para la pectina	20
6.8.4 Cuantificación de compuestos de interés.....	20
6.9 Análisis estadístico	20
7. RESULTADOS	22
7.1 Rendimiento de extracción de extracto crudo	22
7.2 Propiedades fisicoquímicas de los solventes eutécticos profundos (SEPs)	22
7.3 Contenido total de fenoles	23
7.4 Capacidad antioxidante por medio de DPPH	24
7.5 Actividad antimicrobiana por difusión en pozo	25
7.6 Cuantificación de compuestos.....	27
7.7 Gravimetría pectina y FTIR	29
8. DISCUSIÓN.....	31
9. CONCLUSIÓN	41
10. PERSPECTIVAS.....	42
11. BIBLIOGRAFIA	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Composición química de la cáscara de naranja	5
2	Principios de las extracciones verdes	11
3	Condiciones de extracción aplicadas en la investigación	17
4	Rendimiento de extracción de los extractos crudos en la cáscara de naranja seca.	22
5	Propiedades fisicoquímicas de las formulaciones de los solventes eutécticos profundos (SEPs).	23
6	Contenido de fenoles totales en los extractos de la cáscara de naranja.	24
7	Capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con diferentes solventes	25
8	Actividad antimicrobiana de extractos de cáscara de naranja por difusión en agar.	26
9	Analitos estándar utilizados para la elaboración de las curvas de calibración con el rango utilizado, ecuación de la curva y R^2 de cada compuesto.	27
10	Perfil de compuestos fenólicos en extractos secos de naranja obtenidos mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución con detector de fotodiodos	28
11	Rendimiento de extracción de la pectina en la cáscara de naranja seca.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Principales estados productores de naranja en México	6
2	Estructura de la pectina	8
3	Estructura química de compuestos encontrados en la cáscara de naranja.	10
4	Pretratamiento de la cáscara de naranja	15
5	Actividad bactericida de extractos de cáscara de naranja vs <i>E.coli</i>	26
6	Cromatograma correspondiente al solvente 1:1 con los compuestos detectados.	29
7	Espectros FTIR de las muestras de las extracciones y del estándar de pectina comercial	30

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

EAU	Extracción Asistida por Ultrasonido
EAM	Extracción Asistida por Microondas
ELP	Extracción con Líquidos Presurizados
EAFS	Extracción Asistida con Fluidos Supercríticos
SEP	Solventes Eutécticos Profundos
CO ₂	Dióxido de Carbono
HBA	Aceptores de Puentes de Hidrógeno
HBD	Donadores de Puentes de Hidrógeno
°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
d	Día
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	Gramo
h	Hora
m	Metro
mg	Miligramo
UFC	Unidad Formadora de Colonias
µg	Microgramos
µL	Microlitro
FTIR	Infrarrojo por Transformada de Fourier
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
mm	Milímetros
UHPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia

RESUMEN

La naranja es el cítrico más importante a nivel global y con gran relevancia económica en varios países, incluyendo México y su zona citrícola, de la cual Nuevo León es un exponente sobresaliente. Este fruto es ampliamente consumido tanto en su forma fresca como en jugos, mermeladas y conservas, sin embargo, la gran cantidad de residuos agroindustriales generados, especialmente las cáscaras, representa un desafío medioambiental si no se gestionan adecuadamente. En este contexto, la cáscara de naranja puede convertirse en un valioso subproducto, esto dado a su contenido de compuestos tales como flavonoides, polifenoles y polisacáridos, que tienen aplicaciones significativas en diversas industrias, como es el caso de la pectina. El objetivo de este estudio fue aprovechar de manera integral las cáscaras de naranja mediante la extracción verde de compuestos de alto valor comercial utilizando solventes eutécticos profundos (SEP) asistida con ultrasonido. De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que la relación molar 1:10 de cloruro de colina/ácido láctico (CC/AL) presentó el mejor rendimiento de extracción, con un 43.88%, de las mezclas eutécticas analizadas, el mayor contenido de fenoles totales se obtuvo en la relación 2:1 de CC/AL con 4.12 mg EAG/g, este mismo extracto mostró la mayor actividad antioxidante con un valor de 2.55 mmol Trolox/g, así mismo obtuvo el mejor efecto antimicrobiano al inhibir 5 de las 7 cepas microbianas evaluadas. Esta misma mezcla fue la que presentó la mayor concentración de: naringina (1150.29 µg/g), ácido cafeico (139.41 µg/g) y ácido ferúlico (379.96 µg/g). El rendimiento de extracción de pectina fue superior en la relación CC/AL 1:1, alcanzando un 48.24 %. Estos resultados sugieren que los SEPs de CC/AL pueden adaptarse y optimizarse según las necesidades específicas de extracción mediante el ajuste de la relación molar. Aunque el metanol es eficaz para la extracción de compuestos fenólicos antioxidantes presentes en la cáscara de naranja, su impacto ambiental es considerablemente mayor al del uso de solventes eutécticos profundos por lo que se propone su uso como una alternativa verde para el aprovechamiento integral de subproductos agrícolas, con énfasis a la extracción de polisacáridos y antimicrobianos.

ABSTRACT

Orange is the most important citrus fruit globally and holds significant economic relevance in several countries, including Mexico and its citrus-growing regions, where Nuevo León stands out as a key producer. This fruit is widely consumed both fresh and in products such as juices, marmalades, and preserves. However, the large amount of agroindustrial waste generated, especially orange peels, poses an environmental challenge if not properly managed. In this context, orange peels can be transformed into a valuable byproduct due to their content of compounds such as flavonoids, polyphenols, and polysaccharides, particularly pectin, which have significant applications in various industries. The objective of this study is to fully utilize orange peels through the green extraction of high-value compounds using deep eutectic solvents (DES) assisted by ultrasound. It was observed that the 1:10 molar ratio of choline chloride/lactic acid (CC/LA) achieved the best extraction yield at 43.88 %. Among the eutectic mixtures analyzed, the highest total phenolic content was obtained with the 2:1 CC/LA ratio, reaching 4.12 mg GAE/g. This same extract showed the highest antioxidant activity, with a value of 2.55 mmol Trolox/g, and the best antimicrobial effect by inhibiting 5 out of the 7 evaluated microbial strains. Additionally, this mixture demonstrated the highest concentrations of naringin (1150.29 µg/g), caffeic acid (139.41 µg/g), and ferulic acid (379.96 µg/g). The pectin extraction yield was highest with the CC/LA 1:1 ratio, reaching 48.24 %. These results suggest that CC/LA DES can be tailored and optimized to meet specific extraction needs by adjusting the molar ratio. Although methanol is effective for extracting antioxidant phenolic compounds present in orange peels, its environmental impact is significantly greater compared to DES. Therefore, DES represents an excellent green alternative for the comprehensive utilization of agricultural byproducts, with a focus on the extraction of polysaccharides and antimicrobial compounds.

1. INTRODUCCIÓN

La naranja es un cítrico de gran importancia en México, siendo Nuevo León uno de los principales estados productores de este cítrico, con 31,891 hectáreas de cultivo. De esta área total se cultiva: en el 82.7% naranja, 11.6% mandarina y 5.7 % toronja. Esto hace que Nuevo León sea el cuarto lugar en producción de naranja a nivel nacional. Lo cual da lugar a la región citrícola, compuesta por los municipios de Montemorelos, Allende, General Terán, Linares, Hualahuises y Cadereyta Jiménez (Zavala y Servín., 2022). Para aumentar el valor añadido a su producción se ha recurrido a la industrialización del fruto, lo que incluye su comercialización en forma de jugos, mermeladas y conservas. Esto ha ocasionado que se genere grandes cantidades de desechos de cáscara de naranja al año, por lo que si no se tiene un adecuado manejo puede llegar a contaminar suelo, aire y agua. La naranja se compone de varias partes: cáscara, extremidad de pedúnculo, flavedo o exocarpio, albedo o mesocarpio, endocarpio que es la parte más interna de la cáscara y el tabique (Afifi, *et al.*, 2023). De los cuales, la parte que se considera como un residuo agroindustrial es la cáscara (exocarpio y mesocarpio). En la cáscara de naranja podemos encontrar compuestos fenólicos y flavonoides de alto valor utilizados en la industria farmacéutica y de alimentos. Algunos ejemplos son la hesperidina, naringina, polimetoxiflavonas, ácido ferúlico y ácido cafeico, entre otros (Tomas y Vallejo., 2022). Así mismo, presenta un contenido importante de polisacáridos, destacando la pectina, la cual constituye un componente importante de la pared celular primaria en las plantas. La pectina, se utiliza normalmente como un aditivo alimentario natural, también como espesante, texturizante, emulsionante, estabilizador, agente gelificante entre otras (Prakash, *et al.*, 2013). Este polisacárido y los flavonoides y fenoles anteriormente mencionados se pueden recuperar con técnicas de extracción verdes, siendo así una alternativa para la revalorización del residuo sólido. La recuperación de estos compuestos utilizando procesos de extracción verde permitirán su aprovechamiento como materia prima en la industria farmacéutica o como ingredientes que puedan ser utilizados para la fabricación de alimentos, bebidas y fármacos.

Los procesos de extracciones verdes son aquellos en los que el gasto energético y de reactivos es considerablemente menor. En el caso de los reactivos utilizados, estos son de origen

diferente a los derivados del petróleo y que mantienen un perfil de extracción adecuado. (Barotto, 2021). En la actualidad existen diferentes tipos de métodos de extracciones verdes que podrían ser usadas como soluciones alternas a las metodologías clásicas de maceración, soxhlet y calentamiento-reflujo, las cuales son eficientes, pero presentan el riesgo de degradación de compuestos de interés debido al uso de altas temperaturas y tiempos prolongados; aunado al hecho de que su uso implica extracciones con solventes como el hexano o tolueno que son tóxicos (Khan, *et al.*, 2010). Los métodos más usados para extracción verde son los químicos y físicos, dentro de los primeros se encuentran las extracciones asistidas, por ejemplo: extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción asistida por microondas (EAM), extracción con líquidos presurizados (ELP) y fluidos supercríticos (EAFS). Siendo los más utilizados la EAU y la EAM (Wong, *et al.*, 2020). La EAU ayuda a la penetración del solvente en el material a extraer, por medio del proceso de cavitación, en donde las burbujas colapsan en los límites de las paredes celulares, provocando el rompimiento de estas y permitiendo la entrada de los solventes que, finalmente, extraen los compuestos de interés (Corona, *et al.*, 2016). Esta técnica es eficiente en rendimiento de extracción ya que usa menos cantidad de solventes, menos tiempo de extracción, no usa temperaturas altas y es amigable con el medio ambiente. En cuanto a la parte química de los solventes se trabajará con Solventes Eutécticos Profundos (SEPs), los cuales son compuestos líquidos, formados a partir de una mezcla de dos o más compuestos, cuyo punto de fusión es inferior al de los compuestos puros que lo forman. La utilidad de estos compuestos radica en su habilidad para aceptar y donar puentes de hidrogeno por su interacción tipo Van der Waals o de puentes de hidrógenos (Guadarrama, 2024). Las ventajas de estos solventes son por la temperatura con la que se puede extraer, ya que presentan alta estabilidad térmica, baja presión de vapor, buena capacidad de disolución, son menos tóxicos y más seguros, por lo que son más baratos, no son tóxicos y son más amigables que los solventes tradicionales con el usuario y con el medio ambiente (Sánchez, *et al.*, 2019). Debido a lo antes mencionado y buscando potencializar el uso de la cáscara de naranja bajo un esquema de economía circular, se propone su uso como materia prima para la extracción de compuestos de alto valor, lo cual puede contribuir a su aprovechamiento integral y por ende a una disminución considerable de desechos agroindustriales, impactando de forma positiva a los objetivos del desarrollo sostenible.

2. ANTECEDENTES

2.1 Naranja

El consumo de la naranja destaca sobre otras frutas debido al fácil consumo, precio y contenido nutrimental. Por ejemplo, los principales aportes que nos brinda la naranja es la energía, proteínas, lípidos totales, hidratos de carbono, fibra, agua, calcio, hierro, yodo, magnesio, zinc, sodio, potasio, fosforo, selenio, tiamina, riboflavina, equivalentes niacina, vitamina B, folatos, vitamina C, vitamina A, vitamina D, Vitamina E, entre otros (Tuni, *et al.*, 2011). La Tabla 1 muestra la composición química de la cáscara de naranja, destacando sus principales componentes, como humedad, proteínas, pectina, cenizas, materia orgánica, entre otros. Estos datos reflejan la variabilidad en el contenido de cada componente, indicando que la cáscara de naranja es rica en agua, compuestos orgánicos y nutrientes, lo que sugiere su potencial aprovechamiento en diversas aplicaciones industriales y alimentarias.

Tabla 1. Composición química de la cáscara de naranja

Componentes	Mínimo y máximo valores	Contenido promedio	Literatura
Humedad	70 – 90%	79.83± 0.08	Revisión de alternativas sostenibles para el aprovechamiento del orujo de naranja. Dávila y Sierra., 2018.
Proteína	ND	6.16 ± 0.23 %	
H	ND	5.90 ± 0.06 %	
Pectina	ND	17 ± 5 %	
C	ND	44.33 ± 0.27 %	
ceniza	3 – 4.90 %	3.29±0.19	
pH	3 – 4	3.42 ±0.02	
Materia orgánica	ND	> 95 %	
N	ND	0.76 ± 0.06 %	

ND: no se detectó en el trabajo.

Este cítrico en toda su estructura, incluyendo su cáscara, contiene vitamina C, flavonoides, fibras, pectina, entre otros compuestos. Bioquímicamente, los diferentes nutrientes que contiene este fruto están implicados en la formación de colágeno, huesos y dientes. Además de que ayuda al mantenimiento de una piel sana e hidratada y ayuda al combate del colesterol, y mejora la digestión (SADER., 2018). Mundialmente, México se ubica como uno de los principales productores de naranja, ocupando el quinto lugar, con un volumen promedio de 4.2 millones de toneladas, con una estimación per cápita anual interna de consumo es de 37.1 kilogramos por persona. (SADER., 2017). Carrillo y colaboradores en el 2018 indicaron que,

en el cuarto trimestre del 2017, en México se cosecharon 2.05 millones de toneladas de naranja donde el 73% es considerado parte del fruto comestible y el 27% restante el residuo. Por lo tanto, se estima que 0.5 millones de toneladas es de residuos agroindustrial, representado por la cáscara de naranja retirando los remanentes de pulpa.



Figura 1.- Principales estados productores de naranja en México

Tomando en cuenta la gran cantidad de este residuo agroindustrial y los remanentes de compuestos de alto valor reportados en la literatura, actualmente, es prioritario el desarrollar alternativas para su extracción y evaluar su aplicabilidad en diversas áreas como puede ser la alimentaria y de la salud (Matiacevich, *et al.*, 2023). Como se mencionó previamente, entre los compuestos encontrados en la cáscara de naranja y que han sido reportados se encuentran fenoles, flavonoides, y polisacáridos, entre otros. Entre estos compuestos se encuentran la hesperidina, la naringina, los ácidos- ferúlico y cafeico, así como la pectina, un polisacárido utilizado como aditivo alimentario natural con propiedades espesantes, texturizantes y estabilizadoras (Tomas y Vallejo, 2022; Prakash *et al.*, 2013). Dentro de los fenoles está el ácido cafeico y el ácido ferúlico; el ácido cafeico presenta actividad anti-angiogénica y antioxidante en tumores o fibroblastos humanos (Olivares *et al.*, 2020), mientras que el ácido

ferúlico tiene gran actividad antioxidante captando radicales libres y su uso es principalmente en el área cosmética. También interviene como inhibidor en el metabolismo anaerobio de algunas bacterias, así como en la degradación bacteriana de residuos lignocelulósicos (Almeraya y Navarrete, 2021). Por lo anteriormente escrito, la presente investigación plantea el uso de técnicas verdes para la extracción de compuestos de alto valor, ayudando así al medio ambiente, disminuyendo el uso de solventes tóxicos y de técnicas que degraden los compuestos de interés. Todo esto para aprovechamiento integral del subproducto.

2.2 Compuestos en la cáscara de naranja

2.2.1 Polisacáridos

Dentro de la cáscara de naranja podemos encontrar varios polisacáridos, que tienen la característica de ser más de 10 monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. De acuerdo con la función biológica que desempeñe, los polisacáridos confieren durabilidad y rigidez a los tejidos (Carvajal, *et al.*, 2023). Los polisacáridos de mayor importancia en la cáscara de naranja son la pectina, celulosa, xilano y la hemicelulosa (Raza, *et al.*, 2022).

2.2.1.1 Pectina

En la industria alimentaria la pectina es usada como aditivo, agente gelificante, espesante, texturizante, emulsionante, estabilizador, entre otros (Castañón, *et al.*, 2020). En los últimos años, la pectina se ha utilizado como sustituto de grasas o azúcares en alimentos bajos en calorías. La multifuncionalidad de la pectina radica en la naturaleza de sus moléculas, las cuales se pueden encontrar en diferentes grados de metoxilo. Dependiendo de los grados de metoxilo será la funcionalidad que tenga esta pectina. Además, la pectina está clasificada también con base en el grado de esterificación y el tamaño molecular (Arteta, N., 2023). Como se puede observar en la figura 2, la pectina posee una estructura compuesta por una cadena principal de ácido galacturónico unido por enlaces α (1 $\rightarrow$ 4). Los grupos carboxilos presentes en el ácido galacturónico pueden estar esterificados con grupos metilo (-CH₃), con esto se puede saber si esta metoxilada o no, el grado de metoxilación influye en las propiedades gelificantes de la pectina. Además de tener este azúcar tiene otros azúcares neutros como la ramnosa, arabinosa y galactosa, los cuales introducen complejidad en su estructura y afectan sus características físicas y funcionales.

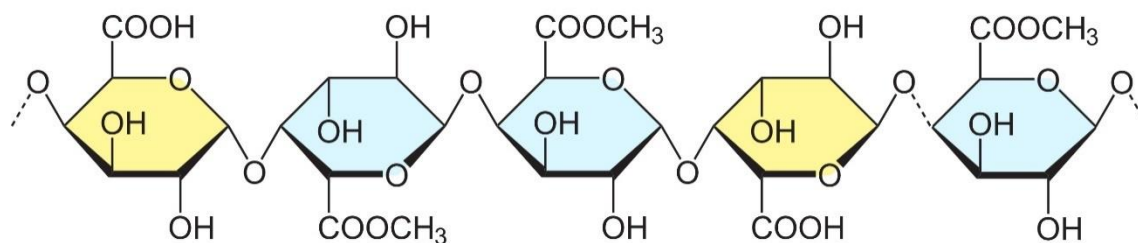


Figura 2.- Estructura de la pectina (Ametefe y Orji., 2024).

2.2.1.2 Usos de la pectina (hidrogeles, películas, alimentos y recubrimientos)

La pectina es el principal componente de la cáscara de naranja, por ello se ha propuesto por diversos investigadores como una opción a su utilización y así poder darle un uso a un desecho agroindustrial (Rubiano, *et al.*, 2022).

Los hidrogeles son materiales de los cuales forman una red tridimensional de cadenas poliméricas entrecruzadas, este efecto de entrecruzamiento le da la capacidad de poder retener agua en grandes cantidades, por lo que se le puede cargar con algún fármaco ya que también pueden diseminarlo, mejorando la respuesta tisular, usualmente se utiliza en cuidados en la piel, utilizando la pectina por sus excelentes características de gelificación, biodegradabilidad y biocompatibilidad (Guzmán, *et al.*, 2023).

Se ha reportado el uso de la cáscara de naranja para la fabricación de películas para empaquetamiento del producto final en el área de alimento. Para esto, se utilizan proteínas y polisacáridos que pueden obtenerse de estos subproductos. Uno de los principales compuestos para la fabricación de estas películas es el quitosano y la pectina, que ofrece la ventaja de ser biodegradable en el medio ambiente y seguro, ya que los productos del quitosano no son cancerígenos, inmunogénicos, ni tóxicos (Leites *et al.*, 2021). En el 2021 Terzioglu y colaboradores reportaron la elaboración de una película a la que se agregó el polvo de cáscara de naranja, esto aumentó los valores de elongación de la película, pero disminuyó la resistencia de tracción; también disminuyó la transparencia, se hizo menos hidrofóbico al contacto con el agua, y características como viscosidad, flexibilidad, estabilidad térmica y permeabilidad al vapor de agua aumentaron en la película, disminuyendo así también la permeabilidad al oxígeno. Además, la adición del polvo de cáscara de naranja aumentó la actividad antioxidante demostrando el potencial para conservar

alimentos sensibles a la oxidación. En 2022 Yaradoddi y colaboradores utilizaron también la cáscara de naranja para la fabricación de películas, donde utilizaron el infrarrojo por transformada de Fourier (espectroscopía infrarroja) para conocer los grupos funcionales en la película. Ellos también confirmaron la ausencia de componentes dañinos en la película, garantizando su seguridad para el medio ambiente. Además, al combinarla con plastificantes, la película se vuelve más manejable. Según el estudio, la pectina es el componente que proporciona la resistencia necesaria y la biodegradabilidad, lo que la hace adecuada para su uso como material de embalaje a corto plazo, tal como menciona el autor previo.

2.2.2 Fenoles

Los fenoles son un gran grupo de compuestos considerados como metabolitos secundarios de gran importancia, provenientes normalmente de las plantas, donde hay más de 8,000 compuestos fenólicos (Camacho, L., 2020). En la actualidad se ha tomado un gran interés por su función ya que tienen gran impacto en las áreas farmacéuticas, cosméticas, alimenticia, etc. (Alarcon, *et al.*, 2022). Dentro de los compuestos de gran valor que podemos encontrar en la cáscara de naranja y que pertenecen al grupo de los fenoles están el ácido cafeico y el ácido ferúlico. Se ha informado que la importancia del ácido cafeico recae en su actividad anti-angiogénica y antioxidante en tumores o fibroblastos humanos (Olivares, *et al.*, 2020). De la misma manera, el ácido ferúlico tiene su importancia en su gran actividad antioxidante captando radicales libres y su uso es más en el área de cosmética.

2.2.3 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos que destacan por su acción venotónica, efecto antioxidante y que pueden inhibir procesos enzimáticos relacionados con el sistema vascular (López, M., 2002). Este grupo está conformado por pigmentos presentes en los vegetales en donde su uso es como protección de agentes oxidantes. En su estructura química contienen grupos hidroxilo fenólicos y tiene excelente actividad quelante para el hierro y otros metales de transición, esto le permite una gran capacidad antioxidante (Martínez, S., *et al.* 2002). Los flavonoides son compuestos que son solubles en agua y comparten estructuras químicas en común, son dos anillos aromáticos unidos entre sí, por tres átomos de carbono que forman un anillo heterocíclico oxigenado. Con este último anillo

mencionado, depende de su oxidación y del segundo anillo mencionado para poder diferenciar de subclase de flavonoides de los cuales existen: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles (Ramírez, C., 2020).

Dentro de los compuestos de gran valor que podemos encontrar en la cáscara de naranja, se encuentran los compuestos que pertenecen al grupo de los flavonoides, como lo son la hesperidina, naringina y algunos polimetoxiflavonas. La hesperidina es una flavonona, la cual se le atribuye la generación de cambios favorables en marcadores de inflamación y sobre factores de riesgo cardiovascular, por lo que se ha utilizado en la rama farmacéutica por sus propiedades venotónicas, vasculoprotectoras, flebotónicas y anti-varicosas (Cardete, R., 2021). Otro flavonoide de gran importancia encontrada en la cáscara de naranja es la naringina, al cual se le atribuye actividades antivirales, antioxidantes, antibacterianas, antitrombóticas y vasodilatadoras. Esto es debido a que disminuye la capacidad de que las plaquetas en coagulación y previene la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Ochoa y Portillo., 2021).

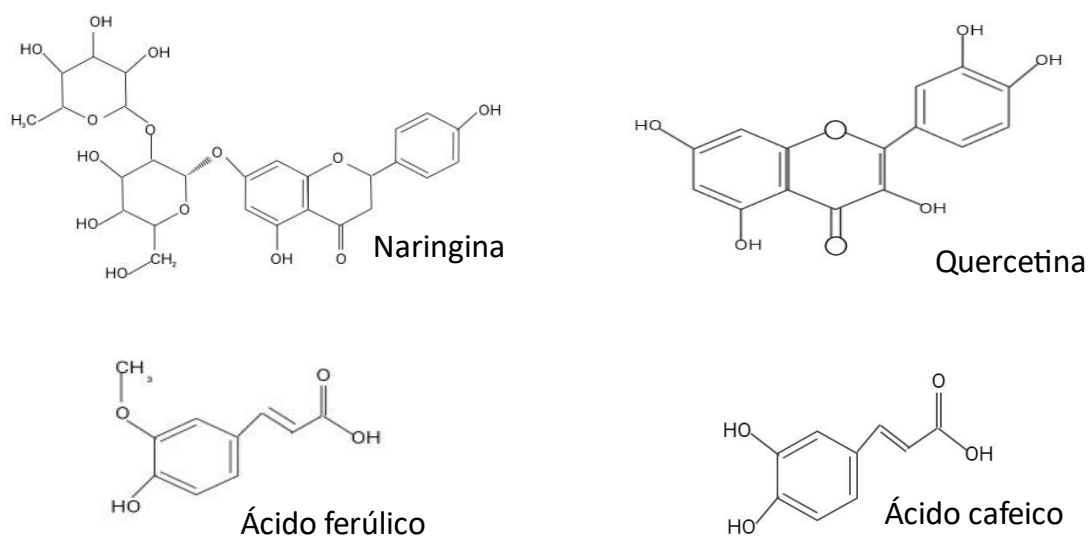


Figura 3.- Estructura química de compuestos encontrados en la cáscara de naranja.

2.3 Extracción verde

La extracción verde es aquella que realiza procesos de extracción con un reducido consumo de energía y utilizando solventes alternativos (no provenientes del petróleo) para la obtención

de productos naturales renovables. Este tipo de técnica trata de garantizar un extracto seguro y de alta calidad por su tiempo de extracción que suele ser corto y que no se usa a altas temperaturas. En la Tabla 2, se enlistan algunos de los principios de las extracciones verdes y sus principales características (Chemat, *et al.*, 2012).

Tabla 2.- Principios de las extracciones verdes (Chemat, *et al.*, 2012).

Principio	Características
Primer	Innovación por selección de variedades y uso de recursos vegetales renovables
Segundo	Uso de solventes alternativos y principalmente agua
Tercero	Reducir el consumo de energía mediante la recuperación de energía y el uso de tecnologías innovadoras
Cuarto	Producción de coproductos en lugar de residuos para incluir la industria
Quinto	Reducir las operaciones unitarias y favoreces procesos seguros, robustos y controlados
Sexto	Apuntar a un extraño no desnaturalizado y biodegradable sin contaminantes

2.3.1 Extracción física

Dentro de las extracciones físicas se utiliza las extracciones asistidas, de las cuales la más usadas es la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), la cual se puede llevar a cabo de forma directa o indirecta. La primera utiliza un sistema de sondas que se sumergen en un sistema líquido-sólido con diferentes intensidades, mientras que en la segunda utiliza un baño de agua con ultrasonido donde se coloca la muestra en contacto con el disolvente y en donde las ondas se transferirán a través del solvente hasta el material vegetal (Soquetta, *et al.*, 2018). Otro ejemplo de extracción física es la Extracción Asistida por Microondas (EAM), la cual se desempeña por medio de la generación de frecuencias electromagnéticas que oscilan entre 300 MHz a 300 GHz (Wong, *et al.*, 2020). La extracción asistida con fluidos supercríticos (EAFS) es una técnica que emplea principalmente dióxido de carbono (CO₂) debido a su naturaleza no explosiva, costo económico y fácil disponibilidad. En este método, el material de interés se coloca en un reactor diseñado para soportar altas presiones. El CO₂, llevado a condiciones supercríticas, se introduce desde la base del reactor, permitiendo que el fluido penetre y disuelva los compuestos deseados. Posteriormente, la mezcla de CO₂ y los

compuestos extraídos se dirige hacia una válvula de despresurización que conduce a un separador. En esta etapa, la reducción de presión provoca la separación del extracto del CO₂ en fase gaseosa, facilitando la recolección de los compuestos aislados. (Carpio, *et al.*, 2022).

2.3.2 Extracciones químicas (Solventes eutécticos profundos)

Los solventes eutécticos profundos (SEPs), son aquellos solventes orgánicos, selectivos y que favorecen la eficacia del proceso, así como la pureza del producto obtenido. Alguno de estos son el ácido cítrico, ácido acético, ácido láctico, cloruro de colina entre otros (Jiménez, y Basilio., 2022). Usualmente, se utilizan sales de amonio cuaternario para la obtención de mezclas eutéctica SEP, donde las sales actúan en el interior de la mezcla como compuestos aceptores de puentes de hidrógeno (HBA), por lo que se usa compuestos con la capacidad de poder donar puentes de hidrógeno (Espriú, S., 2020). Los disolventes eutécticos profundos (SEP) se caracterizan por tener una temperatura en la región cercana al punto eutéctico inferior a la de una mezcla líquida ideal. Se clasifican en cuatro tipos distintos, tipo I que son formados por la combinación de un haluro metálico con un ácido de Lewis o de Brønsted. Los tipo II son compuestos por haluros metálicos hidratados a bajas temperaturas. El tipo III son los más comúnmente utilizados, consisten en una sal de amonio cuaternaria combinada con compuestos que actúan como donantes de enlaces de hidrógeno y los tipo IV son integrados por haluros metálicos anhidros; sin embargo, su uso es menos frecuente debido a su mayor costo (Torres, P., 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

La generación de grandes cantidades de residuos sólidos de cáscara de naranja es un problema en zonas con alta demanda en el consumo de productos cítricos, por lo que la presente investigación se centra en el aprovechamiento de este residuo sólido del cual se busca extraer productos naturales con alto valor comercial mediante el uso de técnicas verdes. Esto permitirá el aprovechamiento integral de un residuo abundante en nuestro estado, aminorando el impacto económico y ecológico que conlleva su manejo y contención.

4. HIPÓTESIS

La extracción asistida por ultrasonido utilizando disolventes eutécticos profundos permiten obtener compuestos bioactivos con actividad biológica considerados como compuestos de valor comercial a partir de la cáscara de naranja siendo eficiente y sostenibles que los métodos convencionales.

5.OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad biológica de extractos orgánicos de cáscaras de naranja obtenidos mediante técnicas de extracción verde y cuantificar los compuestos químicos de importancia comercial presentes en ellos.

5.1 Objetivos específicos

- 1.- Obtener extractos orgánicos de cáscara de naranja utilizando mezclas de solventes eutécticos profundos (ácido láctico y cloruro de colina) en diferentes relaciones molares asistidas por ultrasonido.
- 2.- Evaluar el contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos.
- 3.- Cuantificar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante el secuestro de radicales libres.
- 4.- Determinar la actividad antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Enterobacter cloacae* y *Acinetobacter baumannii* de los extractos crudos obtenidos.
- 5.- Cuantificar el contenido de ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina y naringina presentes en los extractos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia.
- 6.- Determinar y cuantificar la pectina presente en los extractos obtenidos mediante espectroscopía infrarroja y por gravimetría, respectivamente.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención del material vegetal

Área o universo de estudio: Zona metropolitana, Nuevo León, México.

Material biológico: Cáscara de naranja

6.1.1 Recolección de muestras y almacenamiento

Se obtuvieron las muestras o material biológico de diferentes puntos de la zona metropolitana de Nuevo León, ya sea en puntos de ventas de jugos naturales o de hogares particulares. Posteriormente se procedió a guardar en el congelador a una temperatura de -20°C (Khan, *et al.*, 2010).

6.2 Pretratamiento de la cáscara de naranja

Se utilizó la técnica que describe Khan *et al* (2010) con algunas modificaciones. Primeramente, se lavó la cáscara de naranja con agua destilada, después, se eliminó el exceso de agua, se disminuyó el tamaño de la cáscara y se secó en horno aireado a una temperatura de 45°C – 55°C por 48 h. Finalmente, se molió la cáscara seca hasta un tamaño de partícula entre 1 a 2 mm, en la figura 4, se aprecia el proceso por el cual pasó la cáscara de naranja antes de poder realizar la extracción.



Figura 4.- Pretratamiento de la cáscara de naranja

6.3 Preparación de Solventes Eutécticos Profundos (SEP)

Se homogenizó el cloruro de colina (ChCl) en estado sólido (polvo) y ácido láctico (AL) en estado líquido, ambos compuestos de grado analítico. Las mezclas eutécticas se prepararon agitando los dos componentes por separado a $\sim 80^\circ\text{C}$ hasta la formación de un líquido homogéneo e incoloro (Abbott *et al.*, 2011). Las mezclas de extracción de ChCl y AL se ajustaron en las siguientes proporciones de CC/AL: 1:10, 1:2, 1:1 y 2:1.

6.4 Extracción asistida por ultrasonido y solventes eutécticos profundos

El proceso de extracción asistida por ultrasonido se realizó de acuerdo con las condiciones mostradas en la Tabla 3. Brevemente, se utilizó una relación de cáscara seca/disolvente a 1:30 (g/mL). La intensidad del ultrasonido fue de 664 W/cm^2 , frecuencia de 20kHz, amplitud de 50 % por 1 min y ciclos de 0.5 s. El factor modificado fue la relación molar del solvente eutéctico profundo. Una vez terminado el proceso de extracción se centrifugó a 4400 rpm por 15 min. Posteriormente, se añadieron 190 mL de etanol y 10 mL de agua y se mantuvo a 4°C por 12 h. Pasado este tiempo, se centrifugó de nueva cuenta a 4,000 rpm por un tiempo de 10 min. Finalmente, se obtuvo el extracto crudo (sobrenadante) y extracto de naturaleza polisacárida (precipitado). Ambos extractos se separaron y colocaron en un horno a 50°C hasta sequedad total. Para determinar el mejor proceso de extracción, se evaluó la capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana y se determinaron algunos compuestos de interés en el extracto crudo. Así mismo, con las mismas condiciones de ultrasonido se llevó a cabo la extracción metanol (MeOH) como solvente convencional.

Tabla 3.- Condiciones de extracción asistida por ultrasonido y solventes eutécticos profundos

Condiciones de extracción	
Relación cáscara seca (polvo)/disolvente	1:30 (g/mL)
Intensidad del ultrasonido	664 W/cm ²
Frecuencia del ultrasonido	20 kHz
Concentración molar de CC:AL	1:10
	1:2
	1:1
	2:1
Amplitud	50%
Tiempo	1 min
Ciclo	0.5 s

CC:AL – Cloruro de colina y Ácido láctico

Al terminar de extraer se pesó en seco y se procedió a obtener el % de rendimiento de la extracción utilizando la Ecuación 1.

$$\% \text{ rendimiento} = (\text{WAE}/\text{WMV}) * 100 \quad (1)$$

Donde:

WAE es el peso en g obtenido del extracto crudo.

WMV es el peso en g del material vegetal (cáscara de naranja).

6.5 Determinación de las propiedades fisicoquímicas del solvente eutéctico profundo (SEP)

6.5.1 Densidad

La densidad de los solventes se determinó utilizando un matraz volumétrico de 25 mL, Se midió la masa de la muestra y se calculó la densidad (ρ) utilizando la ecuación 2 (Yan *et al*, 2007).

$$\rho = m/V \quad (2)$$

Donde m es la masa medida y V es el volumen del matraz, fijado en 25 mL.

6.5.2 pH

La determinación del pH se llevó a cabo utilizando tiras de prueba de pH Cloud Prime. Estas tiras proporcionan un método rápido y confiable para estimar el valor de pH del solvente. Se aplicó una pequeña cantidad de la muestra a la tira de prueba y el cambio de color resultante se comparó con la tabla de referencia proporcionada para determinar con precisión el rango de pH.

6.5.3 Viscosidad

La determinación de la viscosidad se realizó utilizando un viscosímetro rotacional DVE Brookfield equipado con un spindle #63. Antes del análisis, el equipo fue calibrado de acuerdo con las especificaciones del fabricante para garantizar la precisión de las mediciones. La muestra se colocó en el recipiente correspondiente, asegurándose de que la temperatura permaneciera constante durante el ensayo. Posteriormente, se ajustó el viscosímetro a la velocidad adecuada para la medición y se registraron los valores de viscosidad en centipoises (cP) y después reportadas como Pa.s (pascal-segundo). Este método permitió una evaluación precisa de las propiedades reológicas del solvente, fundamentales para su caracterización y su potencial aplicación en procesos de extracción (Azaga, R. 2018).

6.6 Actividad antirradical por el reactivo DPPH

Para determinar la actividad antioxidante de los extractos se siguió la metodología sugerida por Monroy-García *et al* (2021); los extractos se re-suspendieron en metanol a 1 mg/mL, posteriormente en una microplaca de 96 pocillos se adicionaron 100 μ L de cada extracto por separado, se realizó una dilución seriada y se agregó a cada pocillo 100 μ L del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH•). Se dejó incubar la reacción por 30 min a temperatura ambiente bajo protección de la luz y finalmente se leyó el ensayo en un espectrofotómetro de microplacas a 517 nm.

6.7 Actividad antimicrobiana

Para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos se siguió la metodología de Murray (2015) con algunas modificaciones. Primeramente, se activaron las

cepas Gram positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*,) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Enterobacter cloacae* y *Acinetobacter baumannii*), para lo cual se tomó con asa bacteriológica un inóculo de cada una de las cepas a analizar en medio de cultivo Mueller Hinton (MH) pH 7.3, y se incubó de 18 a 34 h a 37°C, después del tiempo de incubación se ajustó la suspensión celular en solución salina (0.9 %) hasta llegar a 1.5×10^8 UFC/mL. El ensayo se llevó a cabo en placas Petri con MH, donde se inocularon mediante un hisopado con cada uno de los microorganismo, posteriormente, se colocaron 30 µL de cada extracto a evaluar en los pocillos. En medio de la placa de agar MH se colocó el grupo control, el cual fueron 10 µL de gentamicina. Una vez terminado, se procedió a incubar a 37°C por 24 h. Posteriormente al periodo de incubación se tomaron las medidas en milímetros los resultados de los halos de inhibición. En este ensayo, se utilizó DMSO como vehículo.

6.8 Determinación de compuestos fenólicos, fenólicos totales y pectina

6.8.1 Cuantificación de fenoles

Se analizó el contenido de fenoles totales presentes en los extractos crudos, para este ensayo se utilizó la técnica de reducción del reactivo de Folin. Para esto, en un tubo de ensayo se añadieron 100 µL de cada extracto por separado, después se agregaron 250 µL del reactivo Folin (1N), 1250 µL de Na₂CO₃ (20% p/v) y 400 µL de agua destilada, se incubó a temperatura ambiente por 2 h y finalmente se lee la absorbancia a 760 nm. Como estándar se utilizó ácido gálico (AG). Los resultados se expresaron en mg equivalentes a AG/ g de extracto. (Monroy-García *et al.*, 2021).

6.8.2 Cuantificación de la pectina por gravimetría

Se realizó la técnica de hidrólisis ácida para la cuantificación de pectina por gravimetría propuesta por Alancay y colaboradores en el 2017, esto con algunas modificaciones. Al precipitado de polisacáridos se le agregó agua en una proporción 1:100 (p/p, sólido:agua). Después se agregó la cantidad suficiente de ácido clorhídrico (HCl) 6M suficiente para llegar a un pH de 2. Posteriormente, la mezcla se calentó a 85°C y se agitó suavemente por 1 h, una vez pasado el tiempo se enfrió a temperatura ambiente y se filtró el contenido resultante. La pectina solubilizada se precipitó usando alcohol etílico (EtOH) en una proporción 1:1, la

pectina precipitada se lavó, tres veces utilizando etanol y se centrifugo la muestra a 4,000 rpm por 15 min. Después de los lavados se colocó a secar en un horno a 45°C, una vez seca se tomaron los pesos finales y se utilizó la Ecuación 3.

$$\% \text{ de extracción} = \frac{m_2}{m_1} * 100 \quad (3)$$

Donde m_1 es el peso en gramos de la pectina y el m_2 es el material biológico en peso seco.

6.8.3 FTIR para la pectina

Se hizo un análisis de grupos funcionales el cual se llevó a cabo mediante la técnica de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) para identificar las características estructurales de la pectina extraída del polvo de cáscara de naranja. El equipo utilizado fue un espectrómetro FTIR (PerkinElmer Spectrum Two) y el análisis se corrió en el rango de 4000 a 500 cm^{-1} (Duwee *et al.*, 2022).

6.8.4 Cuantificación de compuestos de interés

Compuestos fenólicos y flavonoides como ácido cafeico, naringina, quercetina y el ácido ferúlico se cuantificaron mediante la extrapolación con curvas de calibración obtenidas con estándares grado analítico utilizando la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC), se inyectaron 10 μL de las muestras (estándar o extracto) en un equipo LC-2030c 3D plus prominence – i acoplado a PDA, eluida con gradientes de acetonitrilo: ácido fosfórico (H_3PO_4 al 0.1%) durante 6 min a flujo de 0.5 mL/min.

6.9 Análisis estadístico

Se comparó el rendimiento de extracción realizada en cada uno de los tratamientos de los compuestos analizados a través de un ANOVA simple. Así mismo se analizaron los distintos tratamientos utilizados mediante Tukey para ver cuál es la mejor técnica de extracción. Para evaluar el desempeño de cada solvente, se realizó un ANOVA de una vía para cada actividad evaluada: contenido total de fenoles, actividad antioxidante (DPPH), rendimiento de extracción de pectina (gravimetría). Este análisis permitió determinar si existían diferencias

significativas en la efectividad de los diferentes solventes. Luego, a través de una prueba post hoc de Tukey, se identificaron las comparaciones específicas donde se observaron diferencias significativas entre los extractos en cada actividad, facilitando la comparación del rendimiento o actividad de los solventes evaluados.

7. RESULTADOS

7.1 Rendimiento de extracción de extracto crudo

En la tabla 4 se muestran los rendimientos de extracción del extracto crudo obtenido mediante diferentes solventes. La extracción con el solvente CC/AL 1:10 (A) presentó el mayor rendimiento con $43.88 \pm 0.90\%$, seguido por los solventes CC/AL 2:1 (D) y CC/AL 1:1 (C), con $25.08 \pm 0.42\%$ y $17.23 \pm 0.11\%$, respectivamente, el solvente CC/AL 1:2 (B) presentó el menor rendimiento con un $10.21 \pm 0.74\%$. Por otro lado, el solvente MeOH presentó rendimientos de $12.26 \pm 0.19\%$ (E).

Al emplear metodologías de extracción asistida por ultrasonido, los solventes emergentes, como los solventes eutécticos profundos (SEP), mostraron mayor efectividad al obtener mayores rendimientos de extracción que los solventes convencionales.

Tabla 4.- Rendimiento de extracción de los extractos crudos con diferentes solventes de la cáscara de naranja seca.

Solventes	% de extracción
CC/AL 1:10 (A)	43.88 ± 0.90^a
CC/AL 1:2 (B)	10.21 ± 0.74^c
CC/AL 1:1 (C)	17.23 ± 0.11^b
CC/AL 2:1 (D)	25.08 ± 0.42^b
MeOH (E)	12.26 ± 0.19^c

* $n=3 \pm DS$

7.2 Propiedades fisicoquímicas de los solventes eutécticos profundos (SEPs)

En la tabla 5 se presentan las propiedades fisicoquímicas de las diferentes formulaciones de solventes eutécticos profundos (DES) en distintas proporciones molares de cloruro de colina y ácido láctico. La densidad, medida en g/cm^3 , disminuye progresivamente conforme aumenta la proporción de cloruro de colina, variando de 1.200 en la mezcla 1:10 (A) a 1.152 en la mezcla 2:1 (D).

El pH se mantuvo constante en 3 para las proporciones 1:10 (A) y 1:2 (B), incrementándose a 4 y 5 en las mezclas 1:1 (C) y 2:1 (D), respectivamente. Este comportamiento refleja la influencia de las proporciones de ácido láctico y cloruro de colina en las características ácido-base del solvente.

Finalmente, la viscosidad, reportada en Pa·s, presentó un aumento notable con el incremento en la proporción de cloruro de colina, pasando de 0.048 Pa·s en la mezcla 1:10 (A) a 0.296 Pa·s en la mezcla 2:1 (D). Este comportamiento puede estar relacionado con los cambios estructurales y de interacción molecular entre los componentes del solvente.

Estos resultados son fundamentales para comprender la influencia de la composición del DES en sus propiedades fisicoquímicas y su potencial aplicación en procesos de extracción.

Tabla 5.- Propiedades fisicoquímicas de las formulaciones de los solventes eutécticos profundos (SEPs).

Muestras/Medición	Densidad (g/cm³)	pH	Viscosidad (Pa.s)
1:10 (A)	1.200	3	0.048
1:2 (B)	1.182	3	0.084
1:1 (C)	1.167	4	0.138
2:1 (D)	1.152	5	0.296

7.3 Contenido total de fenoles

En la Tabla 6 se muestra el contenido total de fenoles extraídos con diferentes solventes. Los mayores contenidos se obtuvieron utilizando los solventes MeOH (13.91 ± 0.19 mg/g), seguido por la mezcla CC/AL 2:1, 4.12 ± 0.20 mg EAG/g de extracto. Estos resultados superan a los obtenidos con otros solventes, como CC/AL 1:2 y CC/AL 1:1, que presentaron contenidos de fenoles totales de 3.77 ± 0.12 mg EAG/g y 3.05 ± 0.24 mg EAG/g, respectivamente.

Por otro lado, el solvente CC/AL 1:10 mostró el menor contenido de fenoles, con un valor de 2.07 ± 0.12 mg EAG/g de extracto. Estos resultados indican que los solventes CC/AL 2:1

y MeOH son más eficaces para la extracción de fenoles en comparación con otros solventes evaluados en este estudio.

Tabla 6.- Contenido de fenoles totales en los extractos de la cáscara de naranja.

Solventes	mg EAG/g de extracto
CC/AL 1:10 (A)	2.07 ± 0.12^d
CC/AL 1:2 (B)	3.77 ± 0.12^b
CC/AL 1:1 (C)	3.05 ± 0.24^c
CC/AL 2:1 (D)	4.12 ± 0.20^b
MeOH (E)	13.91 ± 0.19^a

*n=3 $\pm$ DS; EAG= equivalente de ácido gálico.

7.4 Capacidad antioxidante por medio de DPPH

En la Tabla 7 se muestra la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos utilizando MeOH y CC/AL 2:1, los cuales presentaron la mayor capacidad antioxidante, con valores de 5.31 ± 0.10 mmol Trolox/g y 2.55 ± 0.56 mmol Trolox/g, respectivamente. Mientras que el solvente CC/AL 1:2 también mostró una capacidad similar al del CC/AL 1:1, alcanzando 1.72 ± 0.15 mmol Trolox/g. En comparación, con los extractos obtenidos con los solventes CC/AL 1:10 que presentó capacidades antioxidantes menores a los restantes extractos, con valor de 1.48 ± 0.13 mmol Trolox/g, respectivamente.

Estos resultados indican que los solventes MeOH y CC/AL 2:1 son más efectivos para la extracción de compuestos antioxidantes en comparación con los otros solventes evaluados en este estudio.

Tabla 7.- Capacidad antioxidante de los extractos de cáscara de naranja obtenidos con diferentes solventes.

Solventes	CAET (mmol Trolox/g)
CC/AL 1:10 (A)	1.48 ± 0.13^d
CC/AL 1:2 (B)	1.72 ± 0.15^c
CC/AL 1:1 (C)	1.97 ± 0.27^c
CC/AL 2:1 (D)	2.55 ± 0.56^b
MeOH (E)	5.31 ± 0.10^a

* $n=3 \pm DS$

7.5 Actividad antimicrobiana por difusión en pozo

En la Tabla 8 se presenta el efecto antimicrobiano de los extractos obtenidos a partir de diferentes solventes contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Cada extracto, fue evaluado para su capacidad de inhibir el crecimiento microbiano mediante el método de difusión en pozo, utilizando una cantidad de 1250 µg de extracto depositado en cada pocillo.

Los resultados destacan que el extracto obtenido con el solvente CC/AL 2:1 mostró la mayor actividad antimicrobiana en comparación con los demás extractos, seguido por el solvente CC/AL 1:2. Los extractos obtenidos con los solventes CC/AL 1:10 y CC/AL 1:1 presentaron actividad moderada, mientras que el extracto de MeOH no mostró actividad antimicrobiana significativa o presentaron inhibición sólo en un microorganismo.

En este ensayo, se utilizó como controles, Gentamicina, que mostró una inhibición significativa, y DMSO como vehículo, que no presentó actividad antimicrobiana.

Tabla 8.- Actividad antimicrobiana de extractos de cáscara de naranja por difusión en agar.

Cepa	Inhibición (mm)				
	Tratamientos*				
	CC/AL 1:10 (A)	CC/AL 1:2 (B)	CC/AL 1:1 (C)	CC/AL 2:1 (D)	Control
<i>E. faecalis</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	15.0 ± 0.5
<i>S. aureus</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	16.0 ± 1.0
<i>M. luteus</i>	8.75 ± 1	10.0 ± 1.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 1.4	18.0 ± 1.5
<i>E. coli</i>	2.0 ± 1.4	4.0 ± 0.7	0.0 ± 0.0	4.0 ± 0.2	18.0 ± 1.4
<i>Salmonella sp</i>	8.8 ± 0.4	9.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	9.0 ± 0.3	17.0 ± 0.0
<i>E. cloacea</i>	0.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8.0 ± 1.2	21.5 ± 0.6
<i>A.baumannii</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	15.5 ± 0.7

*n=3 ± DS; Control= Gentamicina

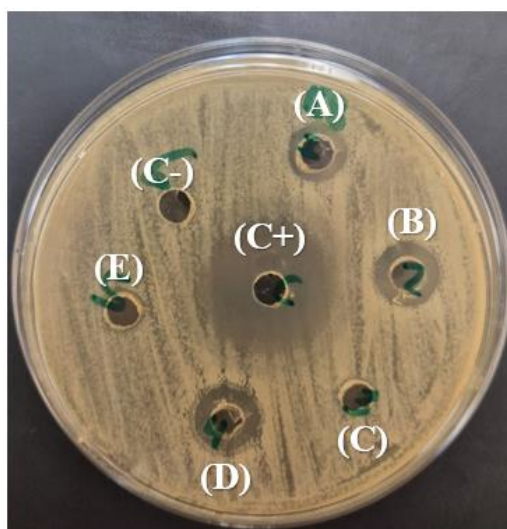


Figura 5.- Actividad bactericida de extractos de cáscara de naranja vs *E.coli*.
(A): CC/AL 1:10, (B): CC/AL 1:2, (C): CC/AL 1:1, (D): CC/AL 2:1 y (C): MeOH, (C-): DMSO y
(C+): Gentamicina

En la figura 5 se muestra la actividad antimicrobiana de los extractos evaluados en este estudio. Los resultados revelan la presencia de actividad antimicrobiana a través de los halos de inhibición observados, destacándose que los extractos obtenidos con los solventes CC/AL en proporciones 2:1 y 1:2 generaron los mayores halos de inhibición, indicando una mayor efectividad antimicrobiana en comparación con otros extractos.

7.6 Cuantificación de compuestos

Se realizaron cuatro curvas de calibración para cuantificar los compuestos fenólicos identificados en el subproducto de la naranja. Las curvas fueron de naringina, ácido cafeico, quercetina y ácido ferúlico. En la tabla 9 se incluyen los estándares utilizados, los rangos, curvas de calibración y coeficiente de determinación.

Tabla 9.- Analitos estándar utilizados en las curvas de calibración con el rango utilizado, ecuación de la curva y R^2 de cada compuesto.

Estándares	Rangos de calibración ($\mu\text{g/mL}$)	Ecuación de la curva	* R^2
Naringina	1 – 400	$y = 3\text{E-}05x + 0.9897$	0.9993
Ácido cafeico	1 – 400	$y = 1\text{E-}05x - 1.4842$	0.9831
Quercetina	1 – 400	$y = 2\text{E-}05x + 0.8685$	0.9995
Ácido ferúlico	1 – 400	$y = 9\text{E-}06x + 4.5721$	0.9940

* $n=3 \pm DS$

Las curvas de calibración se elaboraron utilizando las áreas de pico de cada estándar medida por UHPLC acoplada a DAD a diferentes concentraciones.

Los extractos obtenidos se caracterizaron por UHPLC-DAD y se cuantificaron cuatro compuestos fenólicos (Ácido cafeico y Ácido ferúlico, Quercetina y Naringina). Los compuestos cuantificados se presentan en la tabla 10 con el peso por cada extracto evaluado. En la tabla 10 podemos observar que, en la naringina, el solvente CC/AL 2:1 extrajo la mayor cantidad de este compuesto ($1150.29 \pm 121 \mu\text{g/g}$), mientras que el solvente CC/AL 1:1 mostró la cantidad más baja ($324.82 \pm 12.3 \mu\text{g/g}$). Esto sugiere que la proporción de solventes en CC/AL 2:1 es más eficiente para extraer naringina. Para el ácido cafeico, el solvente CC/AL 2:1 extrajo la mayor cantidad ($139.41 \pm 7.6 \mu\text{g/g}$), seguido de CC/AL 1:2 ($21.63 \pm 8 \mu\text{g/g}$). En otros solventes, como CC/AL 1:10, CC/AL 1:1, y MeOH, el contenido de ácido cafeico no se detectó o estaba por debajo del límite de detección (indicado como TR, traza). Para la quercetina la extracción CC/AL 1:10 y CC/AL 1:2 mostró la mayor extracción de este compuesto ($68.49 \pm 0.9 \mu\text{g/g}$ y $67.83 \pm 1.6 \mu\text{g/g}$, respectivamente), seguido del CC/AL 1:1 ($66.14 \pm 1.1 \mu\text{g/g}$) y el MeOH tuvo la menor cantidad ($62.49 \pm 2.2 \mu\text{g/g}$). Para el ácido ferúlico el solvente CC/AL 2:1 fue el más efectivo para extraer el compuesto ($379.96 \pm 24 \mu\text{g/g}$), mientras que CC/AL 1:1 tuvo la menor cantidad ($305.62 \pm 10.6 \mu\text{g/g}$). Otros solventes

como MeOH y CC/AL 1:2 también extrajeron ácido ferúlico, pero en menor cantidad que el CC/AL 2:1.

A manera general, la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos varía significativamente dependiendo del tipo de solvente utilizado y la proporción de los componentes del solvente. CC/AL 2:1 parece ser el solvente más efectivo en general para la extracción de varios compuestos fenólicos (especialmente para naringina), lo que sugiere que esta proporción de solventes es particularmente eficaz para romper las paredes celulares de la cáscara de naranja y liberar estos compuestos. Indicando que la polaridad o las propiedades del solvente afectan selectivamente la eficiencia de extracción. Los resultados de la tabla indican que diferentes combinaciones de solventes tienen distintas eficiencias para extraer los compuestos fenólicos de la cáscara de naranja, lo que puede ser crucial para optimizar las técnicas de extracción dependiendo del compuesto de interés.

Tabla 10.- Perfil de compuestos fenólicos en extractos secos de cáscara de naranja obtenidos mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución con detector de fotodiodos.

Compuestos fenólicos (µg/ g)	Extracciones				
	CC/AL 1:10 (A)	CC/AL 1:2 (B)	CC/AL 1:1 (C)	CC/AL 2:1 (D)	MeOH (E)
Naringina	622.20 ± 25.9 ^c	791.57 ± 81.1 ^b	324.82 ± 12.3 ^d	1150.29 ± 121 ^a	707.06 ± 76.3 ^b
Ácido cafeico	TR	21.63 ± 8 ^b	TR	139.41 ± 7.6 ^a	TR
Quercetina	68.49 ± 0.9 ^a	67.83 ± 1.6 ^a	66.14 ± 1.1 ^b	TR	62.49 ± 2.2 ^c
Ácido ferúlico	312.81 ± 12.4 ^d	344.65 ± 17.5 ^c	305.62 ± 10.6 ^d	379.96 ± 24 ^a	360.91 ± 12.4 ^b

*n=3 ± DS; TR= trazas

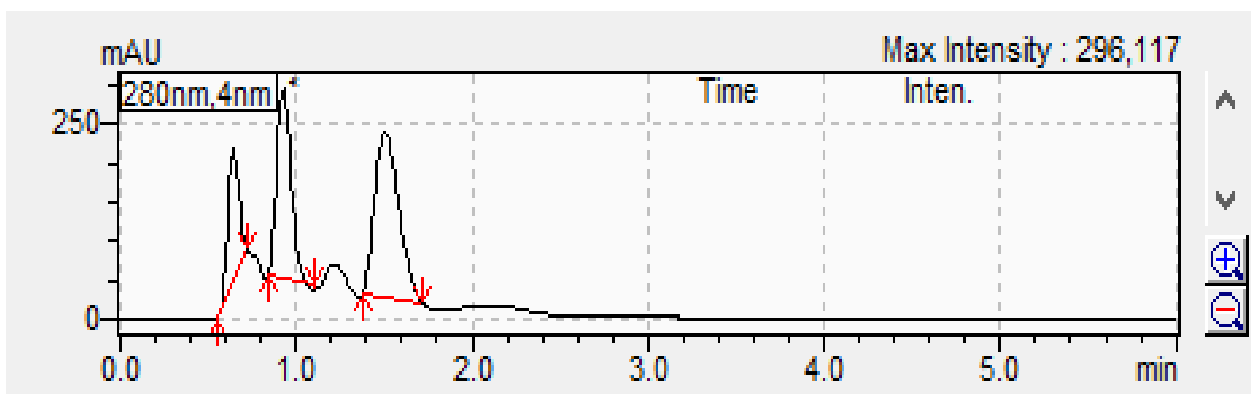


Figura 6.- Cromatograma correspondiente al solvente 1:1 con los compuestos detectados.

Con el fin de corroborar la identidad de los picos en los cromatogramas después del análisis UHPLC (fig. 6)

7.7 Gravimetría pectina y FTIR

En la Tabla 11, se observa que el solvente CC/AL 1:10 extrajo 1.73 mg de pectina, lo que indica que es el método con la menor cantidad de pectina extraída. De manera similar, CC/AL 1:2 extrajo 2.41 mg de pectina, demostrando también una baja eficiencia en la extracción. En contraste, el solvente CC/AL 1:1 logró la mayor extracción con 48.24 mg de pectina, sugiriendo que esta proporción es la más efectiva para extraer pectina de la muestra de naranja. El solvente CC/AL 2:1 extrajo 6.74 mg de pectina, lo cual indica una eficiencia moderada. Por último, el solvente MeOHx extrajo 4.03 mg de pectina, mostrando una cantidad ligeramente inferior en comparación con CC/AL 2:1.

Tabla 11.- Rendimiento de extracción de la pectina en la cáscara de naranja seca.

Cáscara de Naranja	Rendimiento (%)				
	CC/AL 1:10 (A)	CC/AL 1:2 (B)	CC/AL 1:1 (C)	CC/AL 2:1 (D)	MeOH (E)
Pectina	1.73 ± 0.19 ^d	2.41 ± 0.26 ^d	48.24 ± 5.01 ^a	6.74 ± 0.79 ^b	4.03 ± 0.86 ^c

*n=3 ± DS

En la figura 7, se presenta los espectros de infrarrojo (IR) obtenidos para la pectina comercial y las pectinas extraídas con los diferentes solventes a partir de la cáscara de naranja seca. Al comparar las muestras obtenidas con la comercial se puede apreciar las semejanzas, en la región de los grupos carboxilos libres (COO^-) y esterificados (COOR) ubicados entre la banda 1650 y 1750 cm^{-1} respectivamente. La presencia de picos en posiciones similares en los extractos y la pectina comercial sugiere similitud en la composición química de la pectina, la diferencia en la intensidad o la posición de los picos pueden indicar variaciones en la concentración de ciertos compuestos o en la pureza de los extractos.

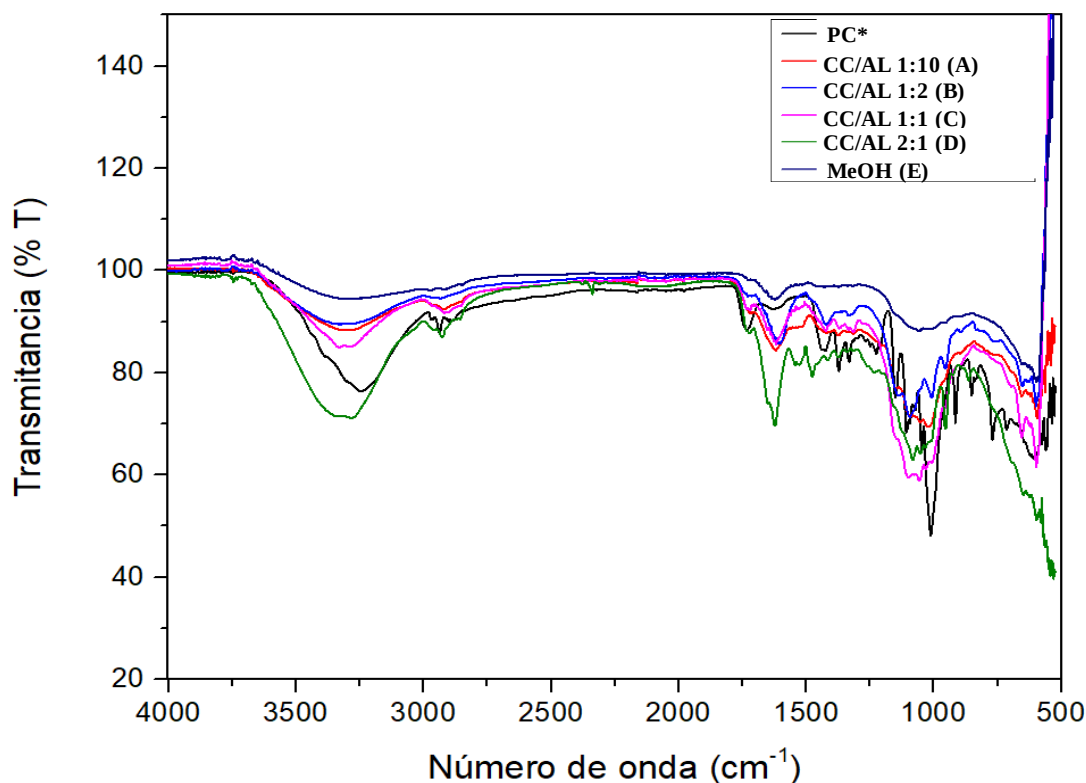


Figura 7.- Espectros FTIR de las muestras de las extracciones y del estándar de pectina comercial.
*PC=pectina comercial

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se cuantificó el contenido de pectina y compuestos fenólicos presentes en extractos de cáscara de naranja obtenidos mediante el uso de solventes eutécticos profundos (SEP) asistida con ultrasonido, así mismo se analizó su actividad antimicrobiana y antioxidante, esto con miras a proponer una alternativa eco-amigable para el aprovechamiento integral de este subproducto agrícola, el cual es abundante en nuestra región.

Con relación al rendimiento de extracción, se observó que la concentración molar 1:10 de cloruro de colina y ácido láctico (CC/AL) presentan el rendimiento de extracción más alto, con un valor de $43.88 \pm 0.90\%$. Esto sugiere que las proporciones más elevadas de ácido láctico en la mezcla aumentan la solubilidad de los compuestos presentes en la cáscara de naranja, resultando en una mayor cantidad de extracto recuperado. Se ha demostrado en otras investigaciones que el uso del ácido láctico ha mostrado ser eficaz para la extracción de compuestos bioactivos como compuestos fenólicos, flavonoides y terpenicos debido a su capacidad para formar puentes de hidrogeno entre el SEP y los analitos (Abdallah *et al.*, 2022).

Al comparar los resultados, se observa que todos los extractos obtenidos con SEP superaron al obtenido con el solvente convencional (MeOH); excepto en el caso de la relación molar 1:2. En cuanto al solvente convencional; la extracción asistida por ultrasonido (EAU) resultó ser más eficiente, debido a que las burbujas de cavitación mejoran la penetración del solvente en la matriz vegetal y facilita la liberación e interacción de los compuestos de interés, tal y como demostraron Airouyuwa, *et al.*, 2022. Una mayor densidad del solvente puede atribuir a un colapso de burbuja más violento, ya que la energía liberada en el colapso es mayor en un medio más denso (Nazari *et al.*, 2019) y por lo tanto aumenta el rendimiento de extracción, esto podría explicar la gran diferencia entre los distintos tratamientos, ya que se observó que, a mayor viscosidad, mayor rendimiento a excepción del SEP CC/AL 1:2. Por lo que hay que tomar en cuenta de no reducir la movilidad del solvente y la transferencia de masa ya que esto reduciría la eficiencia de extracción por medio de la viscosidad (Omar y Sadeghi, 2022).

El ácido carboxílico y los grupos hidroxilo, además de la longitud de la cadena alquímica, afectan la viscosidad, ya que cadenas de hidrocarburos más largas y más grupos hidroxilo dan como resultado viscosidades más altas (Sazali *et al*, 2023).

La elección del ácido láctico fue acertada, ya que, como se ha reportado, este presenta una baja masa molar (90.08 g/mol) y un punto de fusión relativamente bajo (16.8 °C) (Vanegas, 2014). Estas características facilitaron la preparación del SEP y provocaron una reducción en el consumo energético en comparación con otras combinaciones como el ácido cítrico, que posee un mayor punto de fusión y masa molar (192.12 g/mol y 153°C), resultando en una menor eficiencia económica y energética en su preparación (Liew *et al*, 2017). Con lo anteriormente mencionado se ha comprobado que CC/AL tiene una viscosidad reducida debido a su tamaño de enlaces de hidrógeno más débil a diferencia de otros compuestos que se pueden usar donante de puentes de hidrógeno (Alcalde *et al*, 2019). Abbasi *et al* (2022) menciona que ya se han empleado SEP formados por [Ch⁺][Cl⁻] como HBA (compuesto aceptor de puentes de hidrógeno) como el cloruro de colina, y ácidos orgánicos el ácido láctico como HBD (compuesto donante de puentes de hidrógeno) a menudo para extraer compuestos fenólicos en una gran variedad de matrices biológicas. La densidad y viscosidad de los SEP son factores clave que afectan la eficiencia en la extracción (Encalada, 2024), dichos parámetros son incluidos por el tipo y concentración de los DES seleccionados, ya que la extensa red de puentes de hidrógeno junto con otras interacciones como las fuerzas de Van der Waals y electrostáticas hacen que estos solventes sean viscosos a temperatura ambiente (Vidal, 2019). Una alta viscosidad puede limitar la eficiencia de extracción al reducir la movilidad del solvente y la transferencia de masa (Omar y Sadeghi, 2022) pero si se reduce la viscosidad reduce el fenómeno de cavitación que ayuda también al proceso de extracción, junto con la selección adecuada del tipo y relación molar de HBA y HBD, es importante considerar la cantidad de agua, ya que una pobre viscosidad, se ha relacionado con una disminución en los rendimientos de extracción de los compuestos de interés (Dai *et al*, 2015). Otro factor para considerar es la temperatura utilizada para la preparación del SEP, ya que a medida que aumenta la temperatura, la densidad de los SEP disminuye considerablemente, lo que puede facilitar la difusión de los compuestos hacia el solvente durante la extracción (Abbott y Gray, 2006). En este caso, se observó que, al reducir la

proporción de ácido láctico, la viscosidad del solvente aumentó, alcanzando un valor de 0.296 Pa·s en la relación molar 2:1 (D). A pesar de su mayor viscosidad, este solvente presentó un rendimiento de extracción superior al del solvente con relación molar 1:2 (B). Este comportamiento puede explicarse por el hecho de que una mayor viscosidad contribuye a un colapso de burbujas de cavitación más violento, lo que aumenta la eficiencia del proceso de extracción. Por otro lado, el solvente con la relación molar 1:10 (A) fue el menos viscoso y, al mismo tiempo, obtuvo el mayor rendimiento de extracción en esta investigación. Esto refuerza la premisa de que el ácido láctico, en proporciones adecuadas, es altamente efectivo para solubilizar compuestos de interés gracias a su capacidad para formar puentes de hidrógeno y mejorar la interacción con los analitos presentes en la matriz vegetal.

En resumen, al comparar los solventes basados en combinaciones de cloruro de colina y ácido láctico (1:10, 1:2, 1:1 y 2:1) con metanol como solvente convencional, es evidente que los solventes verdes, especialmente en las proporciones 1:10 y 2:1, ofrecen un rendimiento de extracción superior. Esto destaca el potencial de los SEP como una alternativa más sostenible y eficiente a los solventes convencionales. La mayor eficiencia de estas concentraciones molares sugiere que estos solventes pueden ser optimizados aún más para maximizar la extracción de compuestos bioactivos específicos, lo que podría tener un impacto significativo en su aplicación en industrias sostenibles.

Para el contenido total de fenoles totales como podemos observar en la tabla 5 el que mayor destaca en su obtención es el del solvente MeOH y CC/AL 2:1 obteniendo 13.91 ± 0.19 y 4.12 ± 0.20 mg EAG/g de extracto de cáscara de naranja seca respectivamente, seguida por el solvente CC/AL 1:2 y 1:1 obteniendo 3.77 ± 0.12 y 3.05 ± 0.24 mg EAG/g de extracto de cáscara de naranja seca respectivamente mencionadas con anterioridad y por último tenemos la relación 1:1 con 2.07 ± 0.12 mg EAG/g de extracto de cáscara de naranja seca.

Investigaciones recientes demuestran que usar solventes eutécticos profundos (SEP), como el CC/AL, son particularmente efectivos en la extracción de compuestos bioactivos debido a su capacidad para interactuar con moléculas polares al igual que algunos solventes convencionales (Jiménez y Basilio, 2022). Con respecto al contenido fenólico en subproductos agrícolas, Leouifoudi *et al.* (2015) reportaron la presencia 0.950 mg EAG/g en

el extracto etanolico de orujo de oliva, cantidad considerablemente menor a la reportada en este trabajo, en donde tanto el metanol como la mezcla de CC/AL 2:1 presentaron cantidades hasta 10 veces superiores al del orujo.

Los resultados obtenidos en este trabajo podrían verse favorecidos por el uso de la extracción asistida por ultrasonido (EAU), ya que estas destacan por las burbujas de cavitación. Oroian *et al.* (2019) demostraron que la EAU mejora la penetración del solvente en la matriz vegetal mediante la generación de burbujas de cavitación, lo que aumenta el rendimiento de compuestos bioactivos. En el estudio anteriormente mencionado hecho por Oroian *et al.* (2019) compararon la EAU con métodos de extracción convencionales como la maceración y también EAM y observaron que el uso de ultrasonido incrementaba significativamente, donde obtuvieron en maceración 66.1 g de extracto por 100 g de propóleo crudo mientras que por EAU fue de 95.8 g de extracto por 100 g de propóleo crudo en el contenido total de fenoles. Esto pasa ya que la burbuja de cavitación colapsa cerca de las interfases y golpea sobre la superficie sólida, generando el rompimiento de la pared celular y con ello permite la entrada de los solventes y con ello facilitando la extracción de compuestos de interés (Azuola y Vargas. 2007).

Para la actividad antioxidante se pusieron a prueba el disolvente eutéctico profundo en sus cuatro relaciones molares y el solvente convencional (MeOH), donde por diferencia significativa el que mejor actividad mostró fue el MeOH con 5.31 ± 0.10 mmol Trolox/g. Marroquín y Cáceres (2012) realizaron un estudio donde evaluaron la actividad antioxidante en tres especies de la familia *Passifloraceae*, para eso extrajeron por percolación utilizando como solvente MeOH, donde al evaluar el TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox), encontraron para *p. edulis* 3.82 mmol Trolox/g, este valor es similar al obtenido con el SEP CC/AL 2:1 aunque inferior en comparación con los resultados en este presente estudio, con excepción del caso de MeOH, donde el rendimiento fue superior al reportado por Marroquín y Cáceres (2012). Esto se debe al empleo de técnicas de extracción alternativas, lo que demuestra la eficacia de la EAU en comparación con los métodos convencionales, destacando además la importancia de estas técnicas de extracción verde.

De las mezclas utilizadas, el solvente CC/AL 2:1 presentó la mayor actividad antioxidante, lo que se atribuye a su relación molar y a su capacidad para extraer eficientemente ciertos compuestos bioactivos como los fenólicos y terpenos, esto es debido por su interacción polar lo que favorece a la solubilidad entre el solvente y los compuestos de interés, también se le atribuye a su capacidad de formar puentes de hidrógeno y por último a una mayor selectividad (Ruesgas, *et al.* 2023) dependiendo de la relación molar del SEP, se puede ajustar para su capacidad de interacción con diferentes grupos funcionales, lo que influye en el tipo y cantidad de compuestos extraídos (Guadarrama, 2024). Ejemplo de terpenos encontrados en la naranja son los limonoides. Los terpenos son compuestos ampliamente presentes en cítricos y otras plantas, conocidos por su capacidad antioxidante y otras propiedades bioactivas, como actividad antiinflamatoria, anticancerígena y antimicrobiana. En investigaciones anteriores, como las de Kolarević *et al.* (2020), observaron que los SEP basados en cloruro de colina combinados con ácidos orgánicos son especialmente efectivos para solubilizar terpenos y fenoles, lo cual incrementa significativamente la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos. La actividad antioxidante se le atribuye a la presencia de la naringina, ya que esta presenta grupos hidroxilos en su estructura en las posiciones 5 y 4 de los anillos A y B, respectivamente, ya que estos son los encargados de donar los hidrógenos para poder capturar los radicales libres como en el DPPH y así reducir el estrés oxidativo (Limón *et al.*, 2010).

En la actividad antimicrobiana evaluada, de las 15 cepas bacterianas, se observó inhibición en 7 de ellas, siendo el extracto obtenido con CC/AL (2:1) el que mostró la mayor actividad frente a las cepas *S. aureus*, *M. luteus*, *E. coli*, *Salmonella*, *E. cloacea*. De la misma manera, el control positivo gentamicina generó un halo de inhibición mayor a los 15 mm. De acuerdo con Velázquez *et al* (2010), el presentar un halo de inhibición mayor a 12 mm indica que las cepas utilizadas son susceptibles al compuesto probado.

La mayor susceptibilidad fue presentada por bacterias Gram negativas, esto debido a los compuestos fenólicos, entre ellos la naringina la cual está compuesta por un núcleo de flavanona unido a un grupo glucósido. Zhao & Liu (2021) mencionan que este compuesto fenólico flavonoide presenta efectos antibacterianos a través de varios mecanismos, por

ejemplo, en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de la función de la membrana citoplasmática al afectar la formación de biopelículas; afectando la permeabilidad e interacciones con ciertas enzimas clave. Así mismo, puede afectar la integridad de la membrana celular bacteriana, causando alteraciones en su estructura y aumentando la permeabilidad, lo cual conduce a la pérdida de iones y nutrientes. Además, puede inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las bacterias, lo que causa daño adicional a proteínas y ácidos nucleicos, interrumpiendo funciones vitales de la célula bacteriana. Los flavonoides suelen ser más eficaces contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) que contra bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*) como los resultados observados en este estudio (Seukep *et al*, 2020).

En el presente trabajo, con una concentración de 1250 µg/µL, observamos una inhibición de *E. coli* (halo de 4 mm). En comparación, Tirumalasetty *et al.* (2013) que trabajaron con extracto de hoja de *Vitex negundo*, donde reportaron un halo de inhibición de 12 mm para *E. coli* empleando una concentración de 1000 µg/µL y 10 mm para *Staphylococcus aureus* encontrando en este presente trabajo 7 mm un resultado similar a lo reportado por Tirumalasetty *et al.* (2013).

Lo que destaca de este trabajo es el rango utilizado para los pocillos, los cuales fueron de 3000, 2000, 1000 y 100 µg/µL. Gupta *et al* (2015) utilizaron un extracto de *Curcuma longa rhizome* usando cloroformo como solvente. La concentración del extracto probada fue de 1250 µg por pocillo y obtuvieron un halo de inhibición de 9 mm, similar al encontrado en el presente trabajo.

Los compuestos fenólicos, reconocidos por sus propiedades antioxidantes y beneficios potenciales para la salud, se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y derivados. (Avilés, *et al.* 2017). Entre ellos, la naringina, el ácido cafeico, la quercetina y el ácido ferúlico son de particular interés por su actividad biológica y están presentes en la cáscara de naranja, estos compuestos tienen efectos antiinflamatorios, anticancerígenos y antimicrobianos (Arriaga, 2021). En este estudio, se llevó a cabo la cuantificación de estos cuatro compuestos utilizando la técnica de cromatografía líquida de ultra alta resolución

(UHPLC), lo cual permitió identificar y comparar su concentración en el extracto de cáscara de naranja. De los compuestos cuantificados para cada uno de los extractos evaluados, la naringina presentó la mayor concentración, donde se ha documentado como un flavonoide predominante, por lo cual con este dato podría ser relevante dada a la actividad antimicrobiana y antioxidante dada en el presente trabajo y por lo reportado por Álvarez *et al* (2004). En el presente trabajo, el solvente eutéctico profundo (SEP) con una proporción de 2:1 de cloruro de colina y ácido láctico mostró ser el más eficiente en la extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de naranja. En el caso de la naringina, se obtuvo una cuantificación de $1150.29 \pm 121 \mu\text{g/g}$, mientras que el estudio de Stabrauskiene *et al.* (2022), utilizando ultrasonido asistido por etanol al 50% en *Citrus x paradisi* (toronja), reportó un contenido de $4310 \pm 125 \mu\text{g/g}$, aproximadamente el triple de lo obtenido en este presente trabajo mientras que Gupta *et al.* (2023) para la naringina extraída de la cáscara de *Citrus sinensis* (naranja dulce) fue de $880 \mu\text{g/g}$, donde en el presente estudio es similar pero mayor al que fue reportado por Gupta *et al.* (2023). Para el ácido cafeico, se obtuvo $139.41 \pm 7.6 \mu\text{g/g}$, comparado con los $32.5 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ reportados por Moreira & De Souza (2018) en *Physalis angulata* con la planta completa mediante extracción asistida por ultrasonido y un solvente mixto de 57% agua, 35% etanol y 8% metanol, lo cual representa casi el cuádruple obtenido en el presente estudio. Finalmente, para el ácido ferúlico, se obtuvo $379.96 \pm 24 \mu\text{g/g}$, mientras que Inbaraj *et al.* (2009) informaron $132.0 \pm 0.9 \mu\text{g/g}$ en *Lycium barbarum* L donde se probó el fruto conocido como baya de goji aunque no se trate de un cítrico es de importancia por ser un fruto, con una extracción convencional como lo fue con maceración, evidenciando casi el triple de contenido obtenido en este presente estudio. Estos resultados resaltan la alta capacidad de los SEP, especialmente combinados con extracción asistida por ultrasonido (EAU), para extraer compuestos bioactivos como los fenólicos de la cáscara de naranja, subrayando su viabilidad como método eficiente para obtener estos compuestos de interés comercial en comparación con técnicas y solventes convencionales.

En este estudio, se pusieron a prueba diferentes relaciones molares de SEP de cloruro de colina y ácido láctico (1:10, 1:2, 1:1 y 2:1) en comparación con el metanol como solvente convencional, para extraer pectina de cáscara de naranja, mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU).

Los resultados obtenidos mostraron que la relación molar de SEP 1:1 alcanzó el mayor rendimiento en la extracción de pectina. Este comportamiento puede atribuirse a la acidez del ácido láctico, que facilita la hidrólisis de los enlaces entre la pectina y los componentes de la pared celular, promoviendo su liberación. Estudios previos, como el de Shafie et al. (2019), indican que el ambiente ácido generado por el SEP contribuye a la disociación de la pectina, aumentando así el rendimiento de extracción. No obstante, la posible alta acidez que pudieran presentar los SEP en este trabajo, podrían ser un factor que podría provocar una degradación de la estructura de la pectina, lo que podría explicar los rendimientos más bajos observados en el presente estudio. Una posible explicación del porque los demás resultados fueron menores al solvente CC/AL 1:1 es la acidez, la cual podría haber degradado la estructura, otra posible explicación es la baja viscosidad que manejan estos compuestos (Liew *et al*, 2017). En cuanto a los valores de pH medidos para cada solvente, se observa que el solvente CC/AL 1:1 tiene un pH de 4, mientras que las otras proporciones presentan pH entre 3 o 5. Aunque los estudios indican que la extracción de pectina suele ser más eficiente en condiciones ácidas, donde generalmente son entre pH 1 y 2.2 (García, *et al*, 2023), en esta investigación, el solvente con pH 4 (CC/AL 1:1) mostró el mayor rendimiento de extracción. Esto sugiere que, además del pH, existen otros factores como la viscosidad del solvente, la interacción específica entre el solvente y la matriz vegetal de interés, que también influyen significativamente en la eficiencia de extracción de pectina.

El uso de EAU facilitó la ruptura de la pared celular, promoviendo la liberación de pectina y mejorando la eficiencia del proceso en comparación con métodos de extracción convencionales (Chen *et al*, 2022). Se observó que los SEP, especialmente en la relación molar 1:1, proporcionan un medio efectivo para la extracción de pectina, superando a solventes convencionales como el metanol en términos de rendimiento de extracción. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la EAU combinada con solventes profundos eutécticos puede aumentar significativamente la eficiencia de extracción de compuestos valiosos como la pectina, siendo además una alternativa más amigable con el medio ambiente.

En cuanto a los rendimientos de extracción obtenido para la pectina Pandharipande & Makode (2012) obtuvieron un 46.46% en cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) utilizando para extraer diferentes pH, mientras que en este presente estudio fue 48.24 ± 5.01 % (CC/AL 1:1), lo cual representa un mayor porcentaje de extracción obtenida por nosotros. Así mismo, Fakayode & Abobi (2018) obtiene en cáscara de naranja fresca (*Citrus sinensis*) 19.12%, casi con las mismas condiciones con las que trabajamos nosotros, donde ellos fue una temperatura de 90°C, tiempo de 90 min y un pH de 2, mientras que nosotros fue temperatura de 85°C, tiempo de 60 min y un pH de 2, la diferencia fue en que ellos emplearon dos métodos de extracción a la vez, ya que obtuvieron primero aceite esencial y luego para la pectina. Para la extracción de pectina De la Hoz Vega *et al* (2018) utilizaron de factor pH 3 y metanol donde ellos obtuvieron un rendimiento de extracción de pectina en base seca 3.90% a los 60 minutos, mientras que nosotros encontramos para el metanol 4.03 ± 0.86 % pero con la diferencia que se utilizó un pH 2 y precipitado con etanol. Con lo anteriormente dicho se puede observar en la tabla 11 de manera esquematizada o resumida la información descrita.

Tabla 11.- Comparación de rendimientos de extracción de pectina en diferentes estudios y condiciones experimentales.

Estudio	Condiciones	Rendimiento de extracción de pectina (%)	Comentarios
Pandharipande & Makode (2012)	Diferentes pH en cáscara de naranja (<i>Citrus sinensis</i>).	46.46%	En este estudio obtuvo un rendimiento mayor de 48.24 ± 5.01 % (CC/AL 1:1).
Fakayode & Abobi (2018)	- Temperatura: 90°C - Tiempo: 90 min - pH: 2 - Dos métodos: extracción de aceite esencial y pectina	19.12%	Condiciones similares a este estudio (85°C, 60 min, pH 2). Rendimiento en este trabajo fue mayor.
De la Hoz Vega et al. (2018)	- Factor: pH 3 - Solvente: metanol - Tiempo: 60 min	3.90% (base seca)	En este estudio con metanol, obtuvimos 4.03 ± 0.86 % (pH 2 y precipitación con etanol).

La Fig. 7, muestra el espectro infrarrojo de la pectina extraída en condiciones óptimas de extracción. En esta imagen se puede observar una banda ancha en la región de 3400 cm^{-1}

donde ocurre la vibración de estiramiento del grupo hidroxilo (-OH), donde Manrique y Lajolo (2002) reportan algo similar en el espectro de FTIR de la pectina obtenida a partir de la cáscara de la papaya. En el espectro presentado, se observa una banda similar que refuerza la identificación de estos grupos funcionales. Asimismo, la banda ubicada en la región de 2926 a 2858 cm^{-1} , que se asocia con las vibraciones de estiramiento y flexión de los grupos C-H (CH, CH₂, CH₃), es reportada de manera similar en otros estudios. Gnanasambandam & Proctor (2000) observó estas vibraciones en muestras de pectinas comerciales (Sigma Chemical Co.), lo que apoya la idea de que estos picos están relacionados con componentes metílicos en la estructura de la pectina.

Otro punto clave es la presencia de los picos en las regiones de 1743 y 1651 cm^{-1} , correspondientes a los grupos carbonilo del éster y al ion carboxilato no esterificado, respectivamente. Estos picos también fueron reportados por Shafie y Gan (2020) en su análisis de la pectina, lo que refuerza la hipótesis de que los extractos obtenidos en este estudio presentan una estructura química comparable a la de pectinas comerciales de alta pureza. De hecho, el grado de esterificación (DE) es un criterio importante en la clasificación de la pectina, y los valores observados en este espectro sugieren que el extracto es de pectina altamente esterificada, con un DE superior al 50%. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Liang *et al.* (2022), quienes reportaron DE similares en pectinas extraídas de cáscaras de granadilla.

La comparativa entre las diferentes relaciones molares de cloruro de colina y ácido láctico (ext. 1-4) y el metanol asistido por ultrasonido (ext. 5) refleja diferencias notables en la intensidad de las bandas, lo que sugiere variaciones en la eficiencia de extracción y pureza del producto final. La que presentó mayor intensidad fue la relación CC/AL 1:1, esto se nota particularmente en las zonas de mayor transmitancia alrededor de los números de onda alto (3000-4000 cm^{-1} y 500-1500 cm^{-1}).

9. CONCLUSIÓN

En este estudio, se utilizaron extracciones asistidas por ultrasonido con solventes eutécticos profundos (SEP) a base de cloruro de colina y ácido láctico (CC/AL) en diferentes relaciones molares, así como metanol (MeOH) un solvente convencional, para evaluar el rendimiento en la extracción de pectina, compuestos bioactivos y actividades antimicrobianas y antioxidantes.

La mezcla de solventes CC/AL 1:10 (A) obtuvo el mayor rendimiento de extracción, destacando su eficiencia en la recuperación general de compuestos solubles.

La mezcla de solventes CC/AL 1:1 (C) presentó la mayor cantidad de pectina, lo cual indica su selectividad y afinidad para la extracción de polisacáridos con ultrasonido asistido.

La mezcla de solventes CC/AL 2:1 (D) fue la más efectiva en actividad antimicrobiana y en la recuperación de compuestos de alto valor comercial, resaltando su potencial para aplicaciones en las industrias farmacéutica y alimentaria.

El solvente convencional MeOH se destacó por su capacidad para extraer la mayor cantidad de fenoles totales y por presentar la actividad antioxidante más alta, subrayando su efectividad en la extracción de compuestos fenólicos bajo ultrasonido.

Estos resultados sugieren que los SEP de CC/AL pueden adaptarse y optimizarse para objetivos específicos mediante el ajuste de la relación molar, mientras que el MeOH es eficaz para la extracción de fenoles totales, actividad antioxidante, pero nocivo para el medio ambiente, a diferencia de los SEP tienen un impacto menor.

10. PERSPECTIVAS

Con base en los estudios y conclusiones presentados en este trabajo, se podría hacer una optimización del proceso de extracción, enfocándose a ajustar las variables del proceso (tiempo de extracción, temperatura, frecuencia del ultrasonido, relación molar, etc.) haciendo un estudio de superficie respuesta. Así mismo, se propone la búsqueda y evaluación de otros metabolitos de importancia comercial, aparte de los evaluados en este trabajo. Por último, se propone el desarrollar un preparado para su aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica.

11. BIBLIOGRAFIA

- Abbasi, N. M., Farooq, M. Q., & Anderson, J. L. (2022). Investigating the effect of systematically modifying the molar ratio of hydrogen bond donor and acceptor on solvation characteristics of deep eutectic solvents formed using choline chloride salt and polyalcohols. *Journal Of Chromatography A*, 1667, 462871. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462871>
- Abbott, A. P., Capper, G., & Gray, S. (2006). Design of Improved Deep Eutectic Solvents Using Hole Theory. *ChemPhysChem*, 7(4), 803-806. <https://doi.org/10.1002/cphc.200500489>
- Abbott, A. P., Harris, R. C., Ryder, K. S., D'Agostino, C., Gladden, L. F., & Mantle, M. D. (2011). Glycerol Eutectics as Sustainable Solvent Systems. *Green Chemistry*, 13(1), 82- 90. <https://doi.org/10.1039/c0gc00395f>
- Abdallah, M. M., Cardeira, M., Matias, A. A., Bronze, M. R., & Fernández, N. (2022). Lactic Acid - Based Natural Deep Eutectic Solvents to Extract Bioactives from Marine By-Products. *Molecules*, 27(14), 4356. <https://doi.org/10.3390/molecules27144356>
- Afifi, S. M., Gök, R., Eikenberg, I., Krygier, D., Rottmann, E., Stübler, A., Aganovic, K., Hillebrand, S., & Esatbeyoglu, T. (2023). Comparative flavonoid profile of orange (*Citrus sinensis*) flavedo and albedo extracted by conventional and emerging techniques using UPLC-IMS-MS, chemometrics and antioxidant effects. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1158473>
- Airouyuwa, J. O., Mostafa, H., Riaz, A., & Maqsood, S. (2022). Utilization of natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction as green extraction technique for the recovery of bioactive compounds from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds: An investigation into optimization of process parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*, 91, 106233. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106233>
- Alancay, M. M., Lobo, M. O., Quinzio, C. M., & Iturriaga, L. B. (2017). Extraction and physicochemical characterization of pectin from tomato processing waste. *Journal Of Food Measurement & Characterization*, 11(4), 2119-2130. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9596-0>

- Alcalde, R., Gutiérrez, A., Atilhan, M., & Aparicio, S. (2019). An experimental and theoretical investigation of the physicochemical properties on choline chloride – Lactic acid based natural deep eutectic solvent (NADES). *Journal Of Molecular Liquids*, 290, 110916. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.110916>
- Almeraya Sánchez, M. T., & Navarrete Lopez, A. M. (2021). Estudio teórico de las propiedades antioxidantes del ácido ferúlico a través del mecanismo de formación de aductos con el radical •OH. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 7(7), 501-506. <http://hdl.handle.net/11191/9338>
- Álvarez, M. J. M., Camacho, D. R. B., Sánchez, M. P., Matos, M. V., & García, D. (2004). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flavonoides de cáscara de naranja en el aceite de soja desodorizado. *Interciencia*, 29(9), 532-538. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33909611>
- Ametefe, G. D., & Orji, F. A. (2024). Pectin classifications, mode of action and factors influencing pectinase production. *Journal Of Agricultural Food Science And Biotechnology*, 2(1), 36-53. <https://doi.org/10.58985/jafsb.2024.v02i01.35>
- Arriaga González, I. (2021). *Evaluación del efecto anticancerígeno y antiinflamatorio de los ácidos fenólicos presentes en nejayote derivado del maíz variedad Bolita* (Tesis de maestría). Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Unidad Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.
- Arteta Medrano, N. G. (2023). ADSORCIÓN DE CADMIO EN EL SUELO APLICANDO PECTINA DE CÁSCARA DE Musa paradisiaca L. (var. Bellaco) A NIVEL DE LABORATORIO [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- Avilés, E. V., Figueroa, I. I., Martínez, E. S., Camacho, M. C. B., Flores, H. E. M., & Pérez, M. E. G. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Instname:Universidad de Cuenca*. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/29781/1/2.%201583-4794-2-PB.pdf>
- Azaga, R. M. M. (2018). Surfactant aggregation in DESs. <https://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?uin=uk.bl.ethos.762674>

- Azuola, R., & Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en marcha*, 20(4), 30-40.
- Barotto, A. J. (2021). Extracción verde de aceites esenciales *Investigación Joven*. <https://revistas.unlp.edu.ar/InvJov/article/view/13231>
- Camacho, L. (2020). DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PLANTAS AROMÁTICAS. *CALENDULA OFFICINALIS* [Trabajo de grado]. Universidad de Jaén. <https://hdl.handle.net/10953.1/12347>
- Cardete, R. M. (2021). Valorización de la biomasa resultante del exprimido de la fruta en la industria de zumos cítricos. Recuperación del flavonoide hesperidina y aplicación de la fibra para alimentación humana. <https://doi.org/10.4995/thesis/10251/159934>
- Carpio-Jiménez, C., Delgado, P. T., & Gutierrez, R. S. M. (2022). CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS, PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ACEITES DE *Chenopodium quinoa* Willd y *Amaranthus caudatus* EXTRAÍDOS POR FLUIDOS SUPERCRTICOS. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 88(1), 39-51. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v88i1.374>
- Carvajal-Millan, E., Arizmendi, V. M., Olivarria, D. F., Baeza, A. M., Chu, A. R., Robinson, K. M., Mendoza, J. L., & Mada, A. C. (2023). MICROALGAS MARINAS: UNA FUENTE DE POLISACÁRIDOS CON PROPIEDADES BIOACTIVAS. *Invurnus*, 18(1). <https://doi.org/10.46588/invurnus.v18i1.91>
- Castañón-Rodríguez, J. F., Soto-Gómez, M. G., & Uresti-Marín, R. M. (2020). Evaluación de la estabilidad de cápsulas de jugo de naranja obtenidas mediante gelificación iónica. *CienciaUAT*, 14(2), 117. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v14i2.1285>
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615-8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chen, S., Xiao, L., Li, S., Meng, T., Wang, L., & Zhang, W. (2022). The effect of sonication-synergistic natural deep eutectic solvents on extraction yield, structural and physicochemical

properties of pectins extracted from mango peels. *Ultrasonics Sonochemistry*, 86, 106045. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106045>

Corona, E., Martínez, N., Ruiz, H., Carranza, J. (2016). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chia (*Salvia hispanica* L.) y su actividad antioxidante. *Agrociencia*, 50(4), 403-412. Recuperado en 03 de julio de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000400403&lng=es&tlng=es.

Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>

Dai, Y., Witkamp, G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2015). Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chemistry*, 187, 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>

De la Hoz Vega, S., Jaraba, B. V., Mendoza, J. P., Arrieta, A. A., & Quinones, L. O. (2018). Effect of precipitating solvents on the extraction of pectin from the pomelo albedo by acid hydrolysis. *Contemporary Engineering Sciences*, 11(78), 3849-3855. <https://doi.org/10.12988/ces.2018.88412>

Duwee, Y. S., Kiew, P. L., & Yeoh, W. (2022). Multi-objective optimization of pectin extraction from orange peel via response surface methodology: yield and degree of esterification. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(2), 1710–1724. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01305-5>

Encalada Quizhpi, L. L. (2024). Evaluación del uso de los solventes eutécticos profundos naturales (nades) en la extracción de compuestos fenólicos en residuos de cacao. https://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/handle/RD_IKIAM/792

Espriú Pérez, S. (2020). EMPLEO DE SOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS EN EL PROCESO DE ELECTROPULIDO DE PIEZAS METÁLICAS [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Fakayode, O. A., & Abobi, K. E. (2018). Optimization of oil and pectin extraction from orange (*Citrus sinensis*) peels: a response surface approach. *Journal Of Analytical Science & Technology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0151-3>
- García-García, P. M., Galindo-Alcántara, A., & Del Carmen Ruiz-Acosta, S. (2023). Métodos de extracción de pectina en frutos: Revisión sistemática. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 10(NEIII). <https://doi.org/10.19136/era.a10nneiii.3728>
- Gnanasambandam, R., & Proctor, A. (2000). Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 68(3), 327-332. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(99\)00191-0](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(99)00191-0)
- Guadarrama Rangel, C. F. (2024). *Síntesis y caracterización de disolventes eutécticos profundos naturales para la extracción de contaminantes desde fases acuosas* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio UNAM. <https://ru.dgb.unam.mx/jspui/handle/20.500.14330/TES01000857772>
- Gupta, A., Mahajan, S., & Sharma, R. (2015). Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology Reports*, 6, 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.02.001>
- Gupta, I., Adin, S. N., Aqil, M., & Mujeeb, M. (2023). QbD Based Extraction of Naringin from *Citrus sinensis* L. Peel and its Antioxidant Activity. *Pharmacognosy Research*, 15(1), 145-154. <https://doi.org/10.5530/097484900241>
- Guzmán-Chávez, M. L., Caldera-Villalobos, M., Cabrera-Munguía, D. A., Cabrera-Munguía, D. A., & Claudio-Rizo, J. A. (2023). Evaluación de la biocompatibilidad de redes semi-interpenetradas de colágeno-poliuretano-pectina. *Afinidad IQS*, 79(597), 517-525. <https://doi.org/10.55815/411479>
- Inbaraj, B. S., Lu, H., Kao, T., & Chen, B. (2009). Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–ESI-MS. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 51(3), 549-556. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.006>

- Jiménez-Ortega, L. A., & Basilio Heredia, J. (2022, 3 febrero). *Disolventes eutécticos profundos: un nuevo enfoque a la química de productos naturales (parte I)*. Gobierno de México. Recuperado 25 de abril de 2023, de <https://www.ciad.mx/disolventes-eutecticos-profundos-un-nuevo-enfoque-a-la-quimica-de-productos-naturales-parte-i/>
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851-858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>
- Kolarević, L., Horozić, E., Ademović, Z., Kundalić, B. Š., & Husejnagić, D. (2020). Influence of Deep Eutectic Solvents (DESs) on Antioxidant and Antimicrobial Activity of Seed Extracts of Selected Citrus Species. *International Research Journal Of Pure And Applied Chemistry*, 120-128. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2020/v21i2330309>
- Leouifoudi, I., Harnafi, H., & Zyad, A. (2015). Olive Mill Waste Extracts: Polyphenols Content, Antioxidant, and Antimicrobial Activities. *Advances In Pharmacological Sciences*, 2015, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2015/714138>
- Liang, Y., Yang, Y., Zheng, L., Zheng, X., Xiao, D., Wang, S., Ai, B., & Sheng, Z. (2022). Extraction of Pectin from Passion Fruit Peel: Composition, Structural Characterization and Emulsion Stability. *Foods*, 11(24), 3995. <https://doi.org/10.3390/foods11243995>
- Liew, S. Q., Ngoh, G. C., Yusoff, R., & Teoh, W. H. (2017b). Acid and Deep Eutectic Solvent (DES) extraction of pectin from pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peels. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 13, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.001>
- Limón, D., Díaz, A., Mendieta, L., Luna, F., Zenteno, E., & Guevara, J. (2010). Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje bioquímico*, 34(1), 143-155.
- Manrique, G. D., & Lajolo, F. M. (2002). FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology And Technology*, 25(1), 99-107. [https://doi.org/10.1016/s0925-5214\(01\)00160-0](https://doi.org/10.1016/s0925-5214(01)00160-0)

- Marroquín, M., Cruz, S., & Cáceres, A. (2012). ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOUNDS IN THREE SPECIES OF PASSIFLORACEAE (PASSIFLORA EDULIS, P. INCARNATA, P. LIGULARIS) FROM GUATEMALA. *Acta Horticulturae*, 964, 93-98. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2012.964.11>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Jm, C., & Tuñón, J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17. http://datateca.unad.edu.co/contenidos/202015/AVA_2015/antioxidantes_bioactivos.pdf
- Matiacevich, S., Soto, D., & Gutiérrez, M. (2023). Economía circular: obtención y encapsulación de compuestos polifenólicos provenientes de residuos agroindustriales. *RIVAR (Santiago)*, 10(28), 77-100. <https://dx.doi.org/10.35588/rivar.v10i28.5343>
- Monroy-García, I. N., Carranza-Torres, I. E., Carranza-Rosales, P., Oyón-Ardoiz, M., García-Estévez, I., Ayala-Zavala, J. F., Morán-Martínez, J., & Viveros-Valdez, E. (2021). Phenolic profiles and biological activities of extracts from edible wild fruits *Ehretia tinifolia* and *Sideroxylon lanuginosum*. *Foods*, 10(11), 2710. <https://doi.org/10.3390/foods10112710>
- Moreira, G. C., & De Souza Dias, F. (2018). Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin and trans-cinnamic acid in *Physalis angulata* L. and determination by HPLC DAD. *Microchemical Journal*, 141, 247-252. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.035>
- Murray, P. R. (2015). The Clinician and the Microbiology Laboratory. En Elsevier eBooks (pp. 191-223). <https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-4801-3.00016-3>
- Nazari-Mahroo, H., Pasandideh, K., Navid, H., & Sadighi-Bonabi, R. (2019). Influence of liquid density variation on the bubble and gas dynamics of a single acoustic cavitation bubble. *Ultrasonics*, 102, 106034. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2019.106034>
- Ochoa, F. A., & Portillo, O. C. (2021). Actividad antimicrobiana in vitro de Naringina frente a patógenos de la cavidad oral. Revisión sistemática [Trabajo de grado]. Universidad Antonio Nariño. <http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/5815>

- Olivares-O, Patricia, Riquelme, María Paz, Leiva-A, Pedro, Salazar, Luis A, Guzmán-Oyarzo, Dina, & Rosas-C, Carlos. (2020). Efecto Antiangiogénico del Ácido Cafeico y Pinocembrina en el Proceso de Angiogénesis Fisiológica de Fetos de Pollo. *International Journal of Morphology*, 38(1), 135-139. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022020000100135>
- Omar, K. A., & Sadeghi, R. (2022). Physicochemical properties of deep eutectic solvents: A review. *Journal Of Molecular Liquids*, 360, 119524. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119524>
- Oroian, M., Dranca, F., & Ursachi, F. (2019). Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. *Journal Of Food Science And Technology*, 57(1), 70-78. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04031-x>
- Pandharipande, S. & Makode, H. (2012). Separation of oil and pectin from orange peel and study of effect of pH of extracting medium on the yield of pectin. *Journal of Engineering Research and Studies*, 3, 6–9.
- Prakash Maran, J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2013). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 703-709. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.052>
- Raza, B., Mero, R., Burgos, G., Cevallos R. (2022). Lignocellulosic waste and activated carbon production method. *Minerva (Quito)*, 1(Special), 122-130. <https://doi.org/10.47460/minerva.v1ispecial.87>
- Ruesgas-Ramon, M., García-Sosa, K., & Peña Rodríguez, L. M. (2023). Solventes eutécticos profundos naturales (NaDES) y su probable función en las plantas. *BioTecnología*, 27(2).
- Sánchez, J., González, E., González M. (2019). Formación y caracterización de disolventes eutécticos profundos: aplicación de la extracción de moléculas de interés. [Tesis de pregrado, Universidad Politécnica de Madrid]. Repositorio de la Universidad Politécnica de Madrid, <https://oa.upm.es/56070/>
- Sazali, A. L., AlMasoud, N., Amran, S. K., Alomar, T. S., Pa'ee, K. F., El-Bahy, Z. M., Yong, T. K., Dailin, D. J., & Chuah, L. F. (2023). Physicochemical and thermal characteristics of

choline chloride-based deep eutectic solvents. *Chemosphere*, 338, 139485. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139485>

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2017, 10 enero). Se consolida México como quinto productor mundial de naranja. Recuperado 04 de julio de 2023, de <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/se-consolida-mexico-como-quinto-productor-mundial-de-naranja>

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2018, 23 diciembre). Naranja, más presente que nunca. Gobierno de México. Recuperado 25 de abril de 2023, de <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/naranja-mas-presente-que-nunca#:~:text=Al%20contener%20vitamina%20C%2C%20flavonoides,malo%20y%20mejorar%20la%20digesti%C3%B3n>).

Seukep, A. J., Zhang, Y., Xu, Y., & Guo, M. (2020). In Vitro Antibacterial and Antiproliferative Potential of *Echinops lanceolatus* Mattf. (Asteraceae) and Identification of Potential Bioactive Compounds. *Pharmaceutics*, 13(4), 59. <https://doi.org/10.3390/ph13040059>

Shafie, M. H., & Gan, C. (2020). Could choline chloride-citric acid monohydrate molar ratio in deep eutectic solvent affect structural, functional and antioxidant properties of pectin? *International Journal Of Biological Macromolecules*, 149, 835-843. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.013>

Shafie, M. H., Yusof, R., & Gan, C. (2019). Deep eutectic solvents (DES) mediated extraction of pectin from *Averrhoa bilimbi*: Optimization and characterization studies. *Carbohydrate Polymers*, 216, 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.007>

Soquetta, M. B., Terra, L. D. M., & Bastos, C. P. (2018). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 400-412. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1411978>

Stabrauskiene, J., Marksa, M., Ivanauskas, L., & Bernatoniene, J. (2022). Optimization of Naringin and Naringenin Extraction from *Citrus × paradisi* L. Using Hydrolysis and Excipients as Adsorbent. *Pharmaceutics*, 14(5), 890. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050890>

- Tirumalasetty, J., Basavaraju, A., Nutalapati, C., & Aalasyam, N. (2013). In Vitro Evaluation of Antimicrobial activity of Vitex Negundo Leaf Extract. *International Journal Of Pharmaceutical And Phytopharmacological Research*, 2(5), 357-359.
- Tomas, F., & Vallejo, F. (2022). Estudio del metabolismo y biodisponibilidad de las flavanonas de zumo de naranja y el efecto de los tratamientos tecnológicos y biotecnológicos para mejorar la absorción [Tesis doctoral]. Universidad de Murcia.
- Torres-Palacio, P.C. (2021b, septiembre 24). Síntesis, propiedades, caracterización y aplicaciones químicas de novedosos disolventes eutécticos profundos: DES (Deep Eutectic Solvents). <http://hdl.handle.net/10803/673075>
- Tuni, O. M., Carbajal, Á., Forneiro, L. C., & Vives, C. C. (2011). Tablas de composición de alimentos (15.^a ed.). Pirámide Ediciones Sa.
- Vanegas Mantilla, C. (2014). Obtención de bacterias ácido-lácticas mediante aislamiento en el kéfir de leche, para la optimización en la síntesis de ácido láctico por fermentación. Uniandes. Disponible en: <http://hdl.handle.net/1992/16476>
- Velázquez-Guadarrama, N., Galindo, J. C. V., Venegas, G. E., Galindo, J. A., Cerezo, S. G., & Frías, M. N. (2010). Resistencia a linezolid en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y enterococos con elevada resistencia a aminoglucósidos en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 67(1), 19-26. <http://scielo.unam.mx/pdf/bmim/v67n1/v67n1a3.pdf>
- Vidal Barrios, K. A. (2019). *Funcionalización de soportes cerámicos mediante recubrimientos nanométricos obtenidos a partir de disolventes eutécticos profundos (DES) para remover CO2* (Tesis de grado). Instituto Politécnico Nacional, México.
- Wong-Paz, J. E., Aguilar-Zárate, P., Veana, F., & Muñoz-Márquez, D. B. (2020). Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.255>

- Yan, Z., Sousa-Gallagher, M. J., & Oliveira, F. A. (2007). Shrinkage and porosity of banana, pineapple and mango slices during air-drying. *Journal Of Food Engineering*, 84(3), 430-440. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.06.004>
- Zavala, G., & Servín, B., (2022). Productores citrícolas del Estado de Nuevo León, características, problemas y alternativas. *Intersticios Sociales*, 24, 365-392. <https://doi.org/10.55555/is.24.429>
- Zhao, Y., & Liu, S. (2021). Bioactivity of naringin and related mechanisms. *PubMed*, 76(8), 359-363. <https://doi.org/10.1691/ph.2021.1504>