



---

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS  
FITOQUÍMICOS DE HOJAS DE LIMA MEXICANA  
(*Citrus aurantifolia* Swingle)

**TESIS**

Que para obtener el grado de licenciatura en  
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

**MAURICIO HERNÁNDEZ RIVAS**

ASESORA:

DRA. GÉNESIS KARENDASH GONZÁLEZ QUIJANO

COASESORA:

DRA. LIDIA DORANTES ALVAREZ



CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2018



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**TITULACIÓN NIVEL LICENCIATURA**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 19 del mes de Octubre del año 2018, el que suscribe Mauricio Hernández Rivas alumno(a) de la carrera de Ingeniería bioquímica con número de boleta 2014500314 egresado de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es coautor intelectual del presente trabajo de Titulación bajo la Asesoría del(la) Dra. Génesis Karendash González Quijano y como coasesor el(la) Dra Lidia Dorantes Alvarez, quienes ceden **únicamente los derechos del título y del resumen** del trabajo intitulado Extracción y Caracterización de compuestos fitoquímicos de hojas de lima mexicana (Citrus aurantifolia Swingle)

al Instituto Politécnico Nacional para su difusión con fines académicos.

El contenido textual, fotográfico, gráficas y resultados del trabajo se someterán para su publicación y/o patente, por lo que se reserva la información completa de este trabajo exclusivamente para la evaluación y consulta de los miembros del jurado académico del examen de Licenciatura de Ingeniería bioquímica.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de los autores. Este puede ser solicitado por escrito al asesor y coasesor del trabajo dirigiéndose a la ENCB. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente,

Mauricio Hernández Rivas

**ALUMNO**

Nombre y firma

Génesis Karendash González Quijano

**ASESOR**

Nombre y Firma

Lidia Dorantes Alvarez

**COASESOR**

Nombre y Firma



---

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS  
FITOQUÍMICOS DE HOJAS DE LIMA MEXICANA  
(*Citrus aurantifolia* Swingle)

**TESIS**

Que para obtener el grado de licenciatura en  
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

**MAURICIO HERNÁNDEZ RIVAS**

ASESORA:

DRA. GÉNESIS KARENDASH GONZÁLEZ QUIJANO

COASESORA:

DRA. LIDIA DORANTES ALVAREZ



CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2018



El presente trabajo se realizó en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Doctora Génesis Karendash González Quijano y en el Laboratorio de Bioquímica de los Alimentos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas con la codirección de la Doctora Lidia Dorantes Álvarez.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional por darme la oportunidad de estudiar la carrera de Ingeniería bioquímica en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, que me ayudó a comprender la importante función y relación de los seres vivos; gracias a la escuela por brindarme el conocimiento por medio de todos los maestros que me dieron clase.

A mis compañeros con los que logré forjar una amistad y que nos permitimos compartir un sinfín de aventuras, emociones, dolores y frustraciones; Ingrid, Nancy, Bety, Hilda, Ari, a Nati por su calma, comprensión y sugerencias, por habernos conocido y tener aquellas conversaciones sobre cualquier tema, a Amairani por ser amigos desde el primer semestre con todo lo que ello implica: risas, enojos, conocerla como persona, saber casi todo de ella, por realizar esta tesis prácticamente juntos y la ayuda que me ha proporcionado su familia.

A mis asesoras de tesis; la Dra. Génesis Karendash por el tiempo, la exigencia, dedicación y paciencia, a la Dra. Lidia Dorantes por colaborar con su laboratorio, conocimiento y la lectura de este trabajo, al igual que a sus alumnos del Laboratorio de Bioquímica de los Alimentos por auxiliarme con información importante.

A los profesores; la Dra. María Elena Sánchez Pardo, la Dra. Liliana Alamilla Beltrán y el Dr. Daniel Arrieta Báez por su lectura y comentarios para la mejora de este trabajo.

A mi madre Celia Rivas por el trabajo duro que siempre ha realizado, a mi padre Benjamín Hernández por el apoyo e impulso moral, a mi tío Fructuoso Hernández ya que gran parte de lo que soy es gracias a él, a mi hermana Marisol que por ser la mayor siempre fue un ejemplo a seguir y a mi hermana Claudia por la comprensión, paciencia y apoyo material.

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
I. ÍNDICE DE CUADROS.....	I
II. ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
III. ABREVIATURAS.....	IV
IV. RESUMEN.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Descripción botánica de lima mexicana ( <i>Citrus aurantifolia</i> Swingle).....	1
1.2. Métodos de secado.....	3
1.2.1. Secado a temperatura ambiente.....	3
1.2.2. Liofilización.....	4
1.3. Compuestos bioactivos.....	6
1.3.1. Alcaloides.....	7
1.3.2. Terpenos.....	8
1.3.3. Compuestos fenólicos.....	9
1.3.3.1. Ácidos fenólicos.....	9
1.3.3.2. Flavonoides.....	10
1.4. Actividad antioxidante de compuestos bioactivos.....	11
1.4.1. Método ABTS.....	12
1.4.2. Método DPPH.....	13
1.5. Técnicas analíticas.....	14
1.5.1. Espectrofotometría UV-VIS.....	14
2. ANTECEDENTES.....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivo general.....	19
4.2. Objetivos específicos.....	19
5. MATERIALES.....	20
5.1. Materia prima.....	20
5.2. Reactivos.....	20
5.3. Material y equipo.....	20



6.	METODOLOGÍA .....	21
6.1.	Acondicionamiento de la materia prima .....	21
6.2.	Determinación del contenido de humedad por el método de termobalanza .....	22
6.3.	Extractos acuosos y etanólicos de hoja de lima .....	22
6.4.	Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu .....	24
6.5.	Evaluación de la capacidad antioxidante por el método ABTS .....	24
6.6.	Evaluación de la capacidad antioxidante por el método DPPH .....	25
6.7.	Cuantificación de flavonoides .....	26
6.8.	Cuantificación de clorofilas .....	27
6.9.	Determinación de cafeína .....	27
6.10.	Análisis estadístico .....	28
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
7.1.	Determinación del contenido de humedad en hojas de lima mexicana .....	29
7.2.	Determinación de pH .....	30
7.3.	Barridos en espectro visible .....	31
7.4.	Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu .....	34
7.5.	Determinación de actividad antioxidante por el método ABTS .....	39
7.6.	Determinación de actividad antioxidante por el método DPPH.....	42
7.7.	Selección de los sistemas de mayor actividad antioxidante y compuestos fenólicos .....	48
7.7.1.	Determinación de flavonoides.....	49
7.7.2.	Determinación de clorofilas.....	53
7.7.3.	Cuantificación de cafeína.....	56
8.	CONCLUSIONES .....	60
9.	REFERENCIAS .....	61
10.	ANEXO 1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	72

# I. ÍNDICE DE CUADROS

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<i>Cuadro 1. Principales compuestos bioactivos en especies de lima. ....</i>	<i>15</i>
<i>Cuadro 2. Fórmulas para cuantificación de clorofilas. ....</i>	<i>27</i>
<i>Cuadro 3. Determinación del contenido de humedad en hojas de lima. ....</i>	<i>30</i>
<i>Cuadro 4. Picos de máxima absorción registrados en los extractos de lima mexicana. ....</i>	<i>31</i>
<i>Cuadro 5. Selección del sistema de óptima extracción. ....</i>	<i>49</i>
<i>Cuadro 6. Contenido de cafeína en extractos de hoja de lima. ....</i>	<i>58</i>

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
<i>Figura 1. Árbol de lima mexicana</i> .....	1
<i>Figura 2. Metabolismo de compuestos fitoquímicos</i> .....	6
<i>Figura 3. Estructura química de la cafeína</i> .....	7
<i>Figura 4. Estructura química de clorofila a y b</i> .....	8
<i>Figura 5. Estructura química de limoneno</i> .....	9
<i>Figura 6. a) Estructura química de ácido cafeico, b) ácido ferúlico</i> .....	10
<i>Figura 7. a) Estructura química de apigenina, b) kaempferol</i> .....	10
<i>Figura 8. Reacción de reducción de ABTS</i> .....	13
<i>Figura 9. Reacción de reducción de DPPH</i> .....	13
<i>Figura 10. Diagrama general de trabajo</i> .....	21
<i>Figura 11. Metodología para la extracción de agentes bioactivos de hojas de lima mexicana.</i> .....	23
<i>Figura 12. Hoja de lima mexicana de Tepexpan, Estado de México.</i> .....	29
<i>Figura 13. Determinación del contenido de humedad por el método de la termobalanza.</i> .....	29
<i>Figura 14. pH de los extractos de hojas de lima</i> .....	30
<i>Figura 15. Espectros de absorción de los extractos de hojas de lima mexicana</i> .....	33
<i>Figura 16. Curva tipo de ácido gálico.</i> .....	34
<i>Figura 17. Compuestos fenólicos en extractos acuosos.</i> .....	35
<i>Figura 18. Compuestos fenólicos en extractos etanólicos.</i> .....	37
<i>Figura 19. Contenido de compuestos fenólicos en extractos etanólicos de hojas</i> .....	38
<i>Figura 20. Curva tipo de Trolox para ABTS.</i> .....	39
<i>Figura 21. Actividad antioxidante de extractos acuosos de hoja de lima por ABTS.</i> .....	40
<i>Figura 22. Actividad antioxidante por ABTS en extractos.</i> .....	41
<i>Figura 23. Actividad antioxidante de extractos etanólicos de hoja de lima por ABTS.</i> .....	42
<i>Figura 24. Curva tipo de Trolox para DPPH</i> .....	42
<i>Figura 25. Actividad antioxidante por DPPH de extractos acuosos de hoja de lima.</i> .....	43
<i>Figura 26. Actividad antioxidante en hojas secas por el método DPPH.</i> .....	44
<i>Figura 27. Actividad antioxidante en % de inhibición de DPPH en extractos.</i> .....	45
<i>Figura 28. Actividad antioxidante por DPPH de extractos etanólicos de hoja de lima</i> .....	46
<i>Figura 29. Actividad antioxidante por DPPH de extractos etanólicos de hojas secas.</i> .....	47
<i>Figura 30. Actividad antioxidante en % de inhibición de DPPH en extractos etanólicos de diferentes muestras.</i> .....	47
<i>Figura 31, Sistemas de mayor extracción para compuestos fenólicos y actividad antioxidante</i> .....	48

<i>Figura 32. Extractos acuosos y etanólicos de mayor actividad antioxidante.</i>	49
<i>Figura 33. Curva tipo de quercetina.</i>	49
<i>Figura 34. Extractos metanólicos de hojas de lima; a) fresca, b) seca y c) liofilizada.</i>	50
<i>Figura 35. Cuantificación de flavonoides en extractos de hojas de lima.</i>	51
<i>Figura 36. Contenido de flavonoides en extractos.</i>	52
<i>Figura 37. Contenido de clorofila en hojas de lima mexicana.</i>	54
<i>Figura 38. Esquema de degradación de clorofila</i>	54
<i>Figura 39. Contenido de clorofila en extractos acuosos de hojas de lima.</i>	55
<i>Figura 40. Contenido de clorofila en extractos etanólicos de hojas de lima.</i>	56
<i>Figura 41. Extracción de cafeína con diclorometano.</i>	57
<i>Figura 42. Curva tipo de cafeína.</i>	57
<i>Figura 43. Contenido de cafeína en extractos acuosos.</i>	58

### III. ABREVIATURAS

pH: potencial de hidrógeno

rpm: revoluciones por minuto

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico)

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

DMPD: dimethyl-4-phenylenediamine

FRAP: poder antioxidante reductor de hierro

B.S.: base seca

EAG: equivalentes de ácido gálico

EQ: equivalentes de quercetina

μM: micromol

ET: equivalentes de Trolox

T<sub>amb</sub>: temperatura ambiente ( $\cong 25^{\circ}\text{C}$ )

ND: no detectado

ppm: partes por millón

#### IV. RESUMEN

Existen diversos compuestos bioactivos que son benéficos para el ser humano al ser consumidos en la dieta. En este caso, los extractos de hojas de lima mexicana se beben al hacer decocciones de manera tradicional entre la población. Sin embargo, se desconoce cómo afecta el tiempo de exposición durante las decocciones y si el secado de las hojas modifica la concentración de dichos compuestos.

En este trabajo se evaluaron dos métodos de secado de hojas de lima mexicana con respecto a las hojas frescas; un grupo de hojas fue sometido a un secado a temperatura ambiente mientras que otro grupo fue liofilizado. Posteriormente se realizaron extractos acuosos y etanólicos de cada grupo de hojas durante cinco tiempos de extracción a 2, 5, 7, 10 y 15 min. En los extractos obtenidos se determinaron compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu, se determinó la actividad antioxidante por los métodos de ABTS y DPPH; también se determinó la cafeína contenida en los extractos, así como la concentración de flavonoides y clorofilas para las hojas de lima.

Los resultados indicaron que el extracto acuoso de hojas secadas a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ) mostró el mayor contenido de compuestos fenólicos siendo de 165.0 mg EAG/g B.S. con tratamiento térmico de 15 min, mientras que el extracto que presentó mayor capacidad antioxidante fue el acuoso de hojas liofilizadas con 1758.3  $\mu$ M ET/g B.S. a los 10 min en ebullición. El extracto acuoso de hojas liofilizadas presentó el mayor contenido de cafeína con 0.910 mg/g B.S. a los 10 min en ebullición. La determinación de flavonoides y clorofilas indicó una mayor concentración en hojas liofilizadas con 55.8 mg EQ/g B.S. y 2.03 mg clorofila total/g de hoja B.S. respectivamente.

Con base en el contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante se recomienda realizar una extracción acuosa de hojas secadas a temperatura ambiente con un tratamiento térmico a ebullición durante 15 min para obtener los mayores beneficios posibles al consumirlo.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Descripción botánica de lima mexicana (*Citrus aurantifolia* Swingle)

La lima mexicana (*Citrus aurantifolia* Swingle) es una de las plantas de la medicina tradicional mexicana empleada por la población para tratar algunas enfermedades, ya sea preparando remedios con el jugo del fruto, las hojas o la flor (Biblioteca digital, 2009). En la figura 1 se ilustra un ejemplar de lima mexicana, el cual es un pequeño árbol arbustivo de alrededor de 4 m de altura con una ramificación irregular y de tronco torcido, cuyas ramas contienen espinas cortas y rígidas, su hoja es perenne con margen crenulado, sus flores son de color blanco amarillento, el fruto es color verde amarillento de forma ovoide y puede medir de 3 a 6 cm de largo (Sunday *et al.*, 2015).



Figura 1. Árbol de lima mexicana (CCO, 2017).

Es una especie originaria del Sureste Asiático y fue introducida a México durante el periodo colonial. Habita principalmente en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados (Avilán y Rodríguez, 1998; Domínguez, 2015), necesita elevadas temperaturas, así como de una alta humedad relativa, es una especie sensible a

suelos salinos teniendo un mejor desarrollo en suelos pedregosos y poco profundos, con requerimientos de poca materia orgánica (Montoliu, 2010). En México se tienen registrados los siguientes tipos de limón; dentro de este grupo se encuentra la lima mexicana como se muestra a continuación (Escobar, 2010; Mejía y González, 2015):

- a) Limón mexicano o agrio (*C. aurantifolia*); es el limón de uso común, de coloración verde, tamaño mediano y con semillas.
- b) Limón persa (*C. latifolia*); es un limón sin semillas, se utiliza principalmente para decorar platillos.
- c) Limón italiano o limón real (*C. limon*): se caracteriza por su color amarillo, por lo que también es llamado amarillo o verdadero.
- d) Limas (*C. aurantifolia* Swingle): se caracteriza por su tamaño pequeño, color verde-amarillo y un sabor dulce, ácido y ligeramente amargo.

La clasificación taxonómica de lima mexicana es la siguiente (Domínguez, 2015):

Reino: Plantae	Subclase: Rosidae
Subreino: Tracheobionta	Orden: Sapindales
Superdivisión: Spermatophyta	Familia: Rutaceae
División: Magnoliophyta	Género: Citrus
Clase: Magnoliopsida	Especie: <i>Citrus aurantifolia</i> Swingle

Dentro de los países de mayor producción de cítricos se encuentra Brasil, Estados Unidos, China, España, México e Italia, de este grupo los principales países productores de lima son Brasil, México y Estados Unidos (Illesca y Ferrer, 2008). Se considera significativo el estudio de hojas de lima mexicana debido a la identificación de diversos compuestos bioactivos, que tienen un efecto benéfico sobre el organismo, puesto que retardan o inhiben la oxidación de los componentes celulares por la acción de radicales libres (Paulino *et al.*, 2013), lo que se conoce como efecto antioxidante.



## 1.2. Métodos de secado

En este trabajo además de emplear un grupo de hojas de lima frescas, se utilizaron dos métodos de secado con el fin de conocer su efecto en los extractos de *Citrus aurantifolia* Swingle, un grupo de hojas fue sometido a un secado a temperatura ambiente, mientras que otro grupo se liofilizó, a continuación, se definen los métodos de secado empleados en alimentos, así como sus características generales.

### 1.2.1. Secado a temperatura ambiente

El secado a temperatura ambiente es un método antiguo empleado con el fin de disponer de las plantas medicinales u otros productos alimenticios durante todas las épocas del año, consiste en colocar los alimentos en recipientes que tengan una vasta superficie de evaporación permitiendo la circulación del aire a temperatura ambiente para eliminar la mayor cantidad de agua libre, una desventaja de este método es la dependencia de las condiciones climatológicas, ya que se requiere de un espacio libre y se puede ver afectado por factores como el polvo, lluvia y plagas (Vizueté, 2012). El proceso de secado es lento con la finalidad de que el material alcance el equilibrio térmico, higroscópico y con el contenido de humedad en el aire, de esta manera se puede llevar a cabo bajo el sol o en la sombra dependiendo del producto, sin embargo, la exposición directa del alimento a los rayos solares puede provocar la pérdida de color, de vitaminas y de valor nutritivo (Paz, 2005).

El secado conlleva la separación de agua de un alimento, esta agua se elimina en forma de vapor que escapa a la atmósfera en la que se encuentra, dentro de este proceso se involucran dos mecanismos primordiales; uno es la transferencia de calor, el cual contribuye con la energía que se requiere para vaporizar las moléculas de agua y el segundo mecanismo es la transferencia de masa, pues el vapor de agua se transporta por difusión a través del alimento y al llegar a la superficie se evapora al ambiente. Los mecanismos mencionados son controlados por factores como la temperatura, superficie y el contenido de humedad del alimento, además de las condiciones psicrométricas de la región (Bello, 2000).

### 1.2.2. Liofilización

La liofilización es un método que además de la conservación de los alimentos busca la reducción de peso y volumen para facilitar su transporte y almacenamiento. Consiste en la congelación del producto y su eliminación del agua por sublimación del agua libre de la fase sólida acompañada de la evaporación de algunas porciones remanentes de agua no congelable. Primero se lleva a cabo la congelación, en seguida se aplica calor a una presión reducida menor a la del punto triple del agua (0.01 °C y 4.5 mm Hg) provocando la sublimación del hielo, las etapas de la liofilización para un alimento en general son (López, 2008; Parzanese, 2017):

- Acondicionamiento de la materia prima: es necesario preparar las muestras antes de someterlas al proceso, ya que el producto liofilizado no puede ser manipulado con otras operaciones después del proceso, en el caso de alimentos como frutos y guisantes se perfora la piel con la finalidad de aumentar la permeabilidad, por otro lado, si se trata de alimentos líquidos, se debe concentrar previamente para disminuir el contenido de agua y el tiempo del proceso.
- Congelación: el producto debe ser congelado para separar el disolvente del soluto al formarse los cristales de hielo, el tiempo y la temperatura de congelación son muy importantes ya que interfieren en las características del producto y dichas condiciones serán diferentes para cada alimento, por un lado, una congelación lenta provoca la formación de cristales grandes de hielo y posteriormente durante la sublimación haya una formación de estructuras abiertas, sin embargo, este tipo de cristales pueden dañar las membranas celulares de los productos, en contraste, una congelación rápida promueve la formación de cristales pequeños, los cuales dificultan el paso y la evacuación del vapor de agua sublimada durante el proceso de secado. La congelación es la etapa más importante para que el alimento liofilizado presente las mejores condiciones en cuanto a su aspecto, la conservación de sus propiedades originales y una rápida rehidratación.

- Desecación primaria o sublimación: la mayor parte de agua es extraída mediante sublimación, para esto es necesario aumentar progresivamente la temperatura de la muestra en condiciones de bajas presiones, el tiempo de duración del proceso está determinado por la temperatura y la presión, de esta manera, el agua en forma de cristales de hielo pasa directamente a estado gaseoso, conforme la temperatura aumenta, el vapor de agua se acumula en el condensador, el cual se encuentra a temperaturas bajas para que el vapor condensado pase a formar nuevamente cristales de hielo.
- Desecación secundaria o desorción: en esta etapa la temperatura se eleva hasta el punto máximo que el tejido del alimento pueda tolerar, esto se determina en función del contenido de agua que se requiere extraer y las características del tejido, la función de esta etapa es eliminar las trazas de vapor de agua evaporando el agua no congelada ligada al alimento, de esta forma se inactivan las reacciones químicas y el crecimiento microbiológico.

La liofilización no altera la estructura fisicoquímica del alimento y permite su conservación sin cadena de frío, obteniéndose un producto con elevada estabilidad microbiológica debido al bajo porcentaje de humedad, por lo tanto, es una alternativa para la conservación de sustancias volátiles, termosensibles, pigmentos termolábiles y fotooxidables, debido a que se realiza a temperaturas y presiones bajas, dando como resultado un producto que es fácilmente hidratable con las siguientes características (Vizuite, 2012):

- No existe una pérdida excesiva de compuestos volátiles comparada con otros métodos de secado.
- El producto mantiene una estructura con poros abiertos que facilita la rehidratación, debido a que no existe tensión superficial.
- Inhibe el deterioro del color y sabor por reacciones químicas
- Dependiendo del alimento, el tiempo de conservación es mayor al compararse con otros métodos de secado.

### 1.3. Compuestos bioactivos

La formación de los compuestos fitoquímicos inicia con la fotosíntesis en un proceso endotérmico que requiere de luz solar, a partir de ello, se forman los metabolitos secundarios por medio de distintas vías (García y Carril, 2011), dichas rutas biogénéticas se muestran en la figura 2.

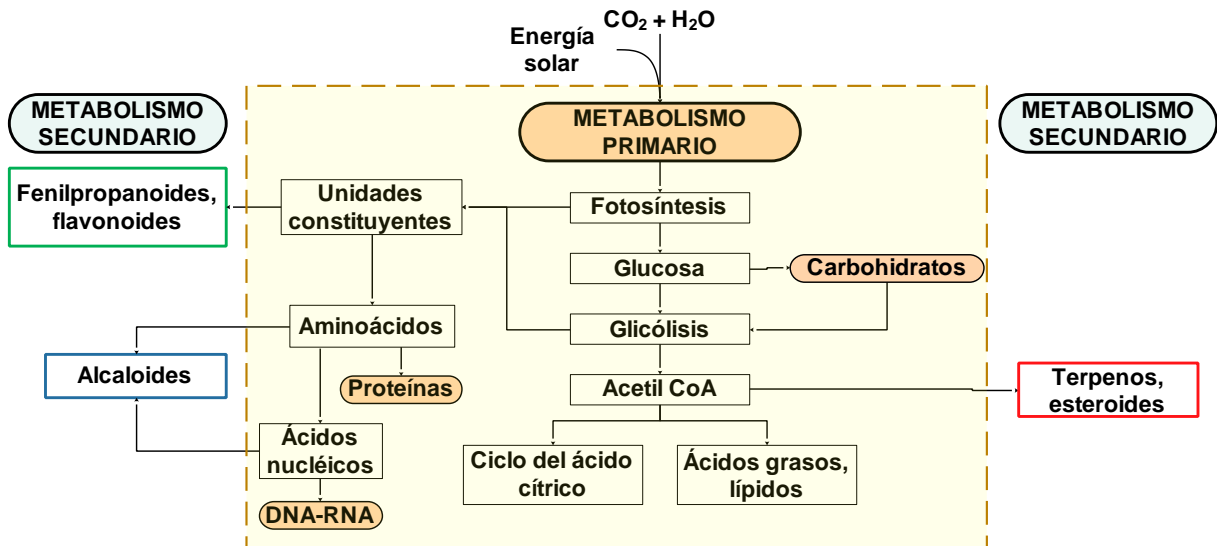


Figura 2. Metabolismo de compuestos fitoquímicos (Marcado y Hasegawa, 2002).

La lima mexicana ha sido estudiada debido a sus compuestos fitoquímicos, éstos son metabolitos secundarios en plantas y vegetales que no tienen algún valor nutricional pero sí intervienen en diversos procesos dentro de la misma planta proporcionando un beneficio como su protección y defensa (Sepúlveda y Rocha, 2003), la hoja de lima sirve para hacer infusiones y decocciones de forma tradicional, por lo que al ser ingerido puede proveer compuestos antioxidantes en la dieta, sin embargo, se desconoce cómo afecta la exposición de temperatura en las decocciones y si el secado de las hojas modifica su concentración.

Se describen a continuación algunos grupos de compuestos bioactivos más representativos, de acuerdo con su clasificación por estructura química.

### 1.3.1. Alcaloides

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que contienen mínimo un átomo de nitrógeno y un comportamiento alcalino, se pueden sintetizar a partir de algunos precursores de aminoácidos como triptófano, tirosina, fenilalanina y lisina (Zuzarte *et al.*, 2006). El efecto tóxico de los alcaloides reside en su capacidad de bloquear neuroreceptores, en el efecto inhibitorio del crecimiento de microorganismos debido a su capacidad de intercalarse con el DNA, así como la inducción de apoptosis (Sepúlveda y Rocha, 2003). Se ha reportado que los alcaloides son capaces de reducir la cefalea y además pueden ser utilizados para el tratamiento de resfriado, fiebre y el catarro crónico (Akinnibosun y Edionwe, 2016).

Dentro de los alcaloides importantes se encuentra la cafeína (Figura 3) ya que es un compuesto presente en casi todas las infusiones vegetales del cual no se tienen reportes en decocciones de hojas de lima mexicana, por lo que en este trabajo se realizó su cuantificación, esta molécula tiene un máximo de absorción a 273 nm (Calle y Rojo, 2011).

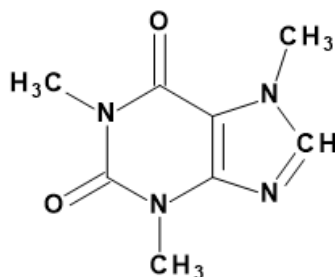


Figura 3. Estructura química de la cafeína (ChemSpider, 2017).

Por otro lado, aunque la clorofila es un metabolito primario, es considerada generalmente como un alcaloide que actúa como un pigmento liposoluble, responsable del color verde de las plantas y de forma general es un antioxidante que contribuye en la disminución del riesgo de enfermedades degenerativas (Martínez-Valverde *et al.*, 2000). Se puede clasificar en clorofila a y b mostradas en la figura 4 (Girón *et al.*, 2017), presentando valores máximos de absorción para clorofila a entre 431 nm y 662 nm y

para clorofila b entre 450 nm y 645 nm (Val y Monge, 1985). Los compuestos alcaloides presentan un espectro de absorción característico con bandas entre 242 nm (Castillo y Javier, 2015) y 270 nm (Cuéllar y Guerrero, 2012).

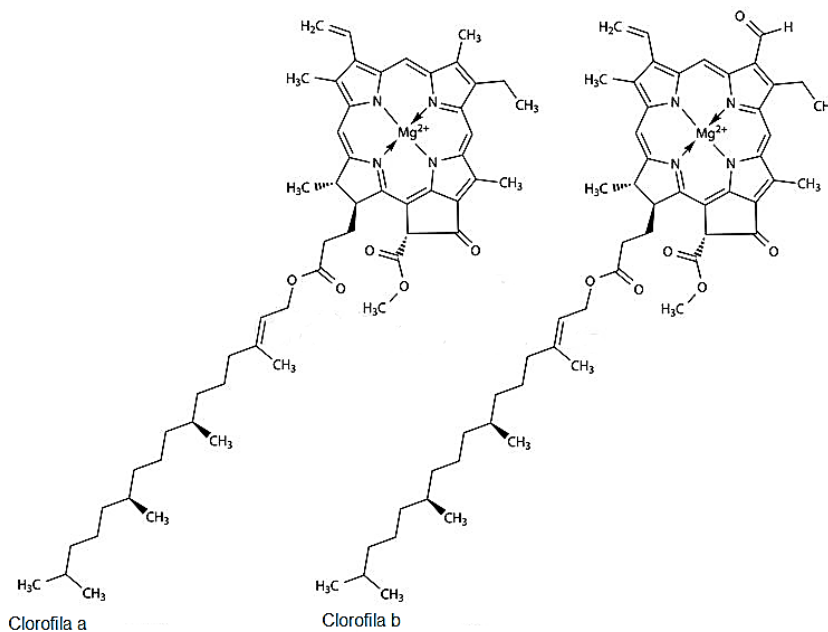


Figura 4. Estructura química de clorofila a y b (Dreamstime, 2018).

### 1.3.2. Terpenos

Los terpenos son moléculas lineales formadas de unidades poliméricas de isopreno, debido a sus propiedades antioxidantes protegen a lípidos y componentes celulares del ataque de agentes oxidantes, algunos de estos compuestos han sido considerados para el tratamiento contra el cáncer (Drago *et al.*, 2006). Presentan un espectro de absorción característico con bandas entre 300 nm y 350 nm. En las hojas de lima se han reportado terpenos como limoneno (Figura 5) el cual presenta un máximo de absorbancia a 262 nm (Martínez, 1996), geranial y neral (Khan *et al.*, 2017).

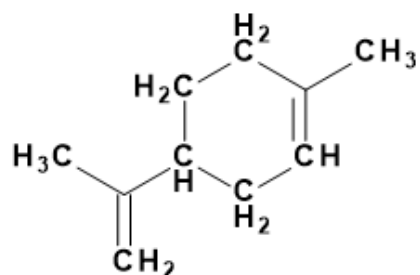


Figura 5. Estructura química de limoneno (ChemSpider, 2017).

### 1.3.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un conjunto heterogéneo de moléculas con actividad antioxidante que se dividen en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, taninos y cumarinas, éstos últimos son compuestos derivados de la benzo- $\alpha$ -pirona y se ha demostrado que tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadoras (Guevara *et al.*, 2016), además son potentes inhibidores de la coagulación (Jaramillo, 2016). Las cumarinas presentan un espectro de absorción característico con bandas entre 240 nm y 400 nm (Silva *et al.*, 2008)

#### 1.3.3.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se clasifican en ácidos hidroxibenzoícos como el ácido gálico y siríngico; y ácidos hidroxicinámicos como el ácido cafeíco (Figura 6a) y ferúlico (Figura 6b), en general se caracterizan por tener un anillo aromático central, de los cuales se ha comprobado que inhiben la actividad de agentes mutagénicos, estimulan la actividad de la enzima fenolsulfotransferasa implicada en la detoxificación de compuestos metabólicos potencialmente tóxicos y poseen actividad bactericida (Drago *et al.*, 2006).

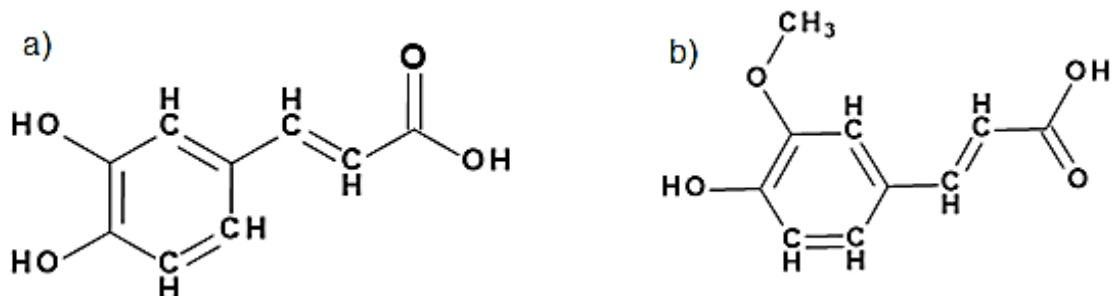


Figura 6. a) Estructura química de ácido cafeico, b) ácido ferúlico (ChemSpider, 2017).

### 1.3.3.2. Flavonoides

En la lima mexicana se han reportado diversos flavonoides, los cuales se pueden subclasificar en: flavonoles como quercetina y kaempferol (Figura 7b); flavonas como apigenina cuya estructura se muestra en la figura 7a (Khan *et al.*, 2017); flavanoles; flavononas como la naringenina (Haiat y Bucay, 2009); antocianidinas e isoflavonoides como la genisteína encontrada en la cáscara de lima (Adina *et al.*, 2014). Estos compuestos se caracterizan por tener una estructura de tres anillos, dos de ellos con centros aromáticos y un heterociclo central oxigenado. Los flavonoides son conocidos también por su actividad antioxidante y otras propiedades bioactivas (Akinnibosun y Edionwe, 2016).

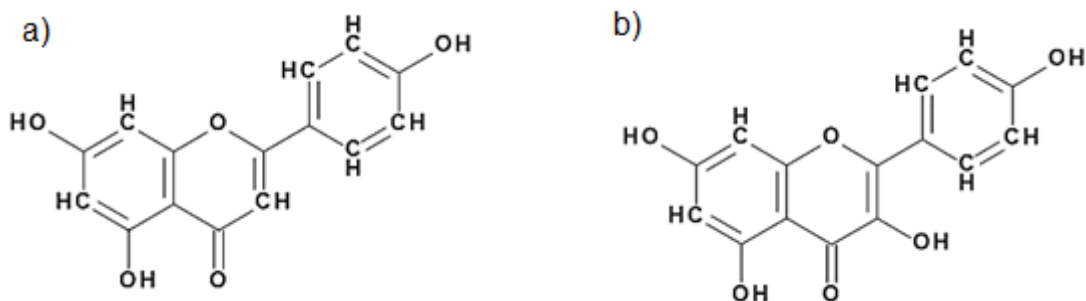


Figura 7. a) Estructura química de apigenina, b) kaempferol (ChemSpider, 2017).



Se ha demostrado que los flavonoides previenen la agregación plaquetaria e inducen la relajación muscular, y junto con los proteoglicanos ejercen un efecto inhibitorio de los síntomas alérgicos (Drago *et al.*, 2006). Por otro lado, los taninos exhiben actividades antivirales, antibacterianas y antitumorales (Akinnibosun y Edionwe, 2016). Los flavonoides presentan un espectro de absorción característico con dos bandas de absorción, una con un máximo entre 240 nm - 285 nm, y otra con un máximo entre 300 nm - 550 nm. Las flavanonas y sus glicósidos se detectan generalmente en 280 nm (Escobar, 2010).

#### 1.4. Actividad antioxidante de compuestos bioactivos

El efecto antioxidante de los compuestos bioactivos se debe a su capacidad de ceder electrones, al ser compuestos reductores controlan o neutralizan la actividad oxidante de los radicales libres, éstos últimos tienen un electrón libre, por lo tanto son muy reactivos captando un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, la molécula estable que cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que puede destruir células sanas (Avello y Suwalsky, 2006). Los radicales libres pueden ser agentes exógenos a el organismo humano producidos por la contaminación de aire, agua o alimentos, así como la sobreexposición a la luz solar (Choi *et al.*, 2000). También pueden ser agentes endógenos formados en las células del organismo, como los radicales libres derivados del oxígeno molecular debido al metabolismo celular normal (Patiño, 2000). Para evitar la reactividad de los radicales libres se desarrollan sistemas protectores biológicos generalmente enzimáticos, como el glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa, entre otros, sin embargo, cuando estos sistemas defensivos del organismo son superados por la actividad oxidante de los radicales libres, aparece un estrés oxidativo (Gutiérrez, 2012), induciéndose daño a biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, esta situación se relaciona con enfermedades degenerativas, entre ellas cardiomiopatías y cáncer (Avello y Suwalsky, 2006). Es aquí donde se da el interés a la investigación de compuestos fitoquímicos que pueden ser utilizados por su actividad

antioxidante, el cual se puede medir *in vitro* por diversos métodos como ABTS, DPPH, DMPD y FRAP (Otero *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2017).

La actividad antioxidante no se mide de forma directa, pero si se puede medir por los métodos mencionados anteriormente ya que son procesos de oxidación controlada. Los ensayos para determinar la capacidad antioxidante se pueden clasificar en dos clases:

- Basados en la transferencia de átomos de hidrógeno, estos ensayos requieren de un generador sintético de radicales libres, una prueba molecular oxidable y un agente antioxidante, como el método TRAP. El mecanismo de manera general es el siguiente:

1. Radical libre [ROO] + Antioxidante reducido [AH] = [ROOH] + Antioxidante oxidado[A].
2. Antioxidante oxidado [A] + Radical libre [ROO] = [ROOA].

- Basados en la reacción por transferencia de electrones donde implica una reacción de oxidación-reducción “redox”, donde el oxidante es un indicador del punto final de reacción (Huang y Prior, 2005), como los métodos ABTS y DPPH. El mecanismo de forma general es el siguiente:

Oxidante + Electrón de antioxidante [e<sup>-</sup>] = Oxidante reducido + Antioxidante oxidado.

#### 1.4.1. Método ABTS

Es un método que mide la capacidad de los compuestos antioxidantes para captar el radical catiónico ABTS<sup>+</sup> en un medio acuoso, formado a partir de su precursor el ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS), incorporando persulfato de potasio. El radical es estable a temperatura baja, siendo de color verde-azul, se decolora al ser reducido debido al poder reductor de la muestra. La capacidad antioxidante es evaluada por la decoloración medida a una longitud de onda 734 nm en el espectrofotómetro. Finalmente, la actividad antioxidante de la muestra se expresa como TEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox (Martos, 2016). La

reacción de reducción del radical ABTS con un agente antioxidante se muestra en la Figura 8.

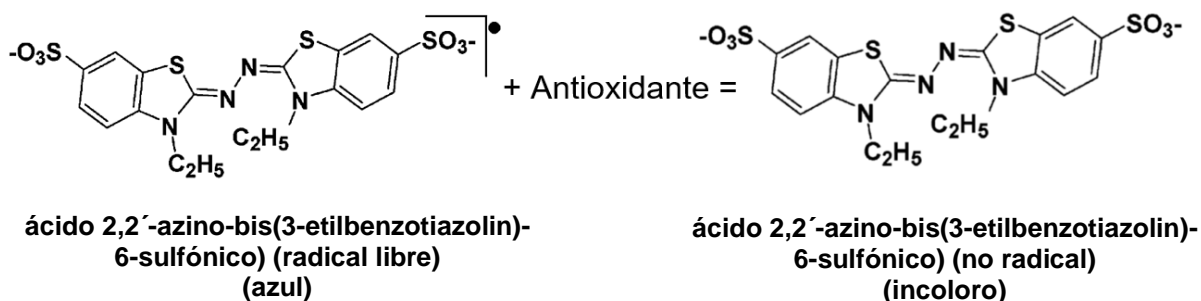


Figura 8. Reacción de reducción de ABTS (Martos, 2016).

#### 1.4.2. Método DPPH

El método se fundamenta en que el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, de color azul-violeta estable, tiene un electrón desapareado, debido a la reacción con una sustancia antioxidante se va decolorando hacia amarillo por la captura del radical libre como se observa en la figura 9. Finalmente, se mide la absorbancia espectrofotométricamente a una longitud de onda de 515 nm. Se obtiene el porcentaje de captación de radicales libres por medio de una diferencia de absorbancias entre el tiempo final e inicial (Reyes *et al.*, 2014).

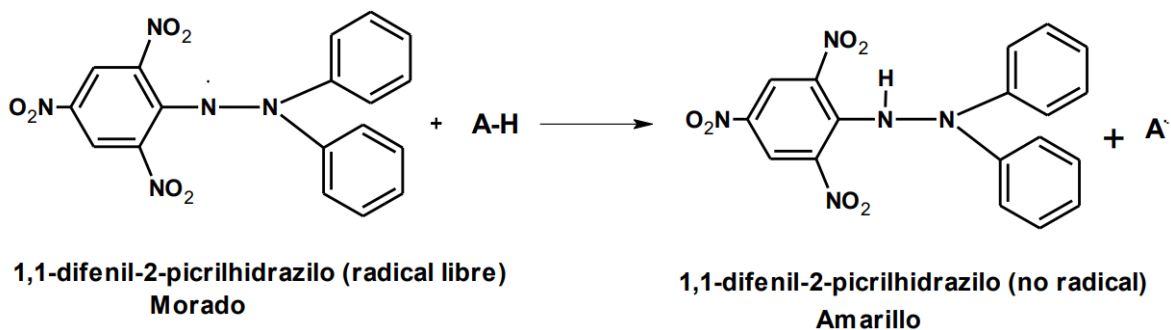


Figura 9. Reacción de reducción de DPPH (Huang y Prior, 2005).

## 1.5. Técnicas analíticas

### 1.5.1. *Espectrofotometría UV-VIS*

La espectrofotometría de absorción molecular es un método de análisis ampliamente utilizado debido a que permite la identificación de compuestos fitoquímicos, se basa en la absorción de la radiación electromagnética por parte de los analitos en la zona ultravioleta visible del espectro. Al incidir la radiación sobre un compuesto, si tiene la energía adecuada será absorbida por dicho compuesto y la molécula pasará a un estado excitado de mayor energía. La absorción selectiva de radiación de determinadas longitudes de onda de los compuestos o análisis permite obtener el espectro de absorción característico del mismo, de tal forma que proporciona información sobre su composición y estructura. En los equipos de haz simple, la radiación precedente de una fuente continua pasa a través de un monocromador que actúa como filtro óptico transmitiendo un haz de luz hacia la longitud de onda fija. Posteriormente, la radiación atraviesa una determinada distancia a través de la disolución en el interior de una cubeta o celda, esta puede ser de plástico, vidrio o cuarzo. Finalmente, la intensidad de radiación emergente no absorbida se mide mediante el detector que ofrece la medida en unidades de absorbancia (Faraldos y Goberna, 2011).

## 2. ANTECEDENTES

Los extractos de *Citrus aurantifolia* Swingle han demostrado que tienen un amplio espectro de actividades biológicas ya que presentan actividad antibacteriana, antiviral, antioxidante, analgésica, antiinflamatoria, antifúngica (Loizzo *et al.*, 2012) y contra aflatoxinas (Iglesias, 2012). Los extractos de frutos, cáscara y hojas presentan diferentes compuestos bioactivos dependiendo del tipo de extracción, condiciones de la muestra, lugar de origen y procesamiento; entre ellos destacan los flavonoides, terpenos, taninos y saponinas (Cuadro 1).

*Cuadro 1. Principales compuestos bioactivos en especies de lima.*

Autor y año	Título del trabajo	Compuestos reportados
Abdallah, 2016	Cribado fitoquímico preliminar y antibacterial del extracto metanólico de hoja de <i>Citrus aurantifolia</i> .	Saponinas, compuestos fenólicos y antraquinonas.
Akinnibosun y Edionwe, 2016	Evaluación del potencial fitoquímico y antimicrobiano de los extractos de hojas de <i>Bryophyllum pinnatum</i> L. y <i>Citrus aurantifolia</i> SW. y su efecto sinérgico.	Saponinas, flavonoides, esteroides, alcaloides, taninos, azúcares reductores y glicósidos.
Lawal <i>et al.</i> , 2014	Análisis comparativo de aceites esenciales de <i>Citrus aurantifolia</i> Swingle y <i>Citrus reticulata</i> Blanco, de dos localidades diferentes del estado de Lagos, Nigeria.	Limoneno, geranial, óxido de cariofileno, cariofilina, 3, 7(14)-dien-6-ol, $\alpha$ -pineno y 2,6-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol.
Loizzo <i>et al.</i> , 2012	Evaluación de los extractos de cáscara y hojas de <i>Citrus aurantifolia</i> por su composición química y actividades antioxidante y anti-colinesterasa.	Flavonoides: apigenina, rutina, quercetina, kaempferol, hesperidina y nobiletina.

Jantan <i>et al.</i> , 1996	Composición química de algunos aceites cítricos de Malasia.	Geranial, limoneno y neral.
Ekundayo <i>et al.</i> , 1991	Componentes volátiles del aceite de la hoja de la lima nigeriana ( <i>Citrus aurantifolia</i> ).	Epineno, terpinen-4-ol, <i>p</i> -pineno, eterpineol, 6-3-careno, geraniol, mirceno, acetato de geranilo, limoneno, citronelol, <i>p</i> -felandreno, nerol, linalool, geraniol, óxido de cariofileno.

Algunos de los trabajos más relevantes se describen a continuación, dada la importancia de sus contribuciones.

Lawal *et al.* realizaron un análisis de los aceites esenciales hidrodestilados de hojas de *Citrus aurantifolia* Swingle y *Citrus reticulata* Blanco, encontrando que los principales compuestos de *Citrus aurantifolia* de la localidad de Ijanikin fueron óxido de cariofileno, cariofilina 3,7(14)-dien-6-ol,  $\alpha$ -pineno y 2,6-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol, mientras que en la muestra proveniente de Ikotun se encontró limoneno y geranial, concluyendo que la variación de las composiciones químicas de las muestras estudiadas se pueden atribuir a: las condiciones climáticas, el tipo de suelo, estación del año, ubicación geográfica, el método de extracción y factores genéticos (Lawal *et al.*, 2014).

Loizzo *et al.* llevaron a cabo la extracción química con metanol de hojas maceradas y cáscara de lima mexicana durante 48 horas, posteriormente realizaron extractos con diferentes fracciones de hexano y evaluaron su actividad antioxidante e inhibición de la enzima anticolinesterasa. Encontraron que los flavonoides más abundantes fueron apigenina, rutina, quercetina, kaempferol y nobiletina. Los extractos de n-hexano mostraron una buena actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa. Por medio de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) encontraron que los compuestos principales fueron monoterpenos y sesquiterpenos (Loizzo *et al.*, 2012).

Ekundayo *et al.* emplearon hojas secas de lima pulverizadas, para posteriormente obtener un aceite esencial hidrodestilado con un rendimiento de 0.20%. En el análisis HPLC-MS encontraron los siguientes constituyentes y su contenido: epineno (0.61%), terpinen-4-ol (0.81%), *p*-pineno (5.83%), eterpineol (1.25%), 6-3-careno (0.67%), geraniol (21.54%), mirceno (0.56%), acetato de geranilo (0.98%), limoneno (33.76%), citronellol (0.42%), *p*-felandreno (1.81%), nerol (6.15%), linalool (1.93%), geraniol (3.95%), óxido de cariofileno (1.03%) (Ekundayo *et al.*, 1991).

En otros trabajos, se reportan diferentes sistemas de extracción, lo cual contribuye a la identificación de compuestos específicos, como en el caso de los extractos realizados con etil-acetato, acetona, metanol y metanol:acetona, donde se identificaron compuestos como el D-limoneno, D-dihidrocarvona,  $\beta$ -linalol,  $\alpha$ -terpinol, trans- $\alpha$ -bergamoteno, los cuales tienen un efecto contra cáncer de páncreas (Jayaprakash, 2009). En el caso del aceite esencial se reportó un 78% de inhibición de células de cáncer de colon humano SW-480 (Jayaprakash, 2009), los glucósidos de limonoides del aceite esencial de lima (17 $\beta$  D-glucopiranosido, 17-D-glucopiranosido, ácido 17-D-glucopiranosido y ácido desacetilnomilínico 17 $\beta$  D-glucopiranosido) tienen un efecto contra células de neuroblastoma SH-SY5Y y contra cáncer de mama (Poulose *et al.*, 2005; Sunday *et al.*, 2015).

Actualmente existe una gran cantidad de reportes sobre compuestos bioactivos presentes en hojas, cáscara y fruto de la lima, sin embargo, se desconocen aún los ácidos fenólicos que son importantes para la industria alimenticia por sus efectos antimicrobianos y antioxidantes, además, la decocción de la hoja de lima no tiene reportes de los niveles de cafeína que presenta, los cuales son importantes para recomendar un adecuado consumo entre la población, por lo que este trabajo se centró en este tipo de compuestos bioactivos.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Las hojas de lima mexicana contienen compuestos bioactivos de gran utilidad en la industria farmacéutica y alimenticia, cuya concentración puede variar por diferentes factores climáticos, geográficos, métodos de extracción, condiciones de la muestra, entre otros. El consumo de decocciones de hoja de lima se utiliza como un remedio tradicional, por lo que es importante su evaluación y una adecuada recomendación de su consumo. En este trabajo se establecieron las mejores condiciones del procesamiento de las hojas, tiempo de extracción con base en la concentración de los principales grupos de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante que proporcionan con el fin de obtener el mayor beneficio posible al consumir las bebidas de hoja de lima. Así mismo, la concentración de cafeína es importante ya que no se ha reportado en los extractos de hojas de lima mexicana hasta el momento, por lo que el trabajo contribuirá con datos cuantitativos para su preparación y un adecuado consumo. Además, dichos extractos podrían ser utilizados para aplicaciones posteriores como agente inhibitorio y posible efecto contra células cancerosas.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

- Extraer y caracterizar los compuestos fitoquímicos presentes en hojas de lima mexicana (*Citrus aurantifolia* Swingle) probando diferentes sistemas de extracción y acondicionamiento de la materia prima para evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos extraídos.

### 4.2. Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de extracción y acondicionamiento de la materia prima.
- Realizar las extracciones con los parámetros establecidos e identificar y agrupar compuestos mayoritarios por medio de espectrofotometría UV-VIS.
- Cuantificar la concentración de compuestos fenólicos presentes en los extractos por el método de Folin-Ciocalteu.
- Medir y comparar la actividad antioxidante de los diferentes extractos de hojas de *Citrus aurantifolia* Swingle por el método de ABTS y DPPH.
- Determinar el contenido de flavonoides en hojas y en extractos de *Citrus aurantifolia* Swingle que presentaron mayor actividad antioxidante.
- Cuantificar el contenido de clorofilas en hojas y extractos de *Citrus aurantifolia* Swingle de mayor actividad antioxidante.
- Determinar la concentración de cafeína en los extractos de *Citrus aurantifolia* Swingle que presentaron mayor capacidad antioxidante.

## 5. MATERIALES

### 5.1. Materia prima

Hojas de lima *Citrus aurantifolia* Swingle obtenidas del poblado de Tepexpan en el Estado de México, México.

### 5.2. Reactivos

Etanol al 80% (v/v)

Reactivo Folin-Ciocalteu 1N

Solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7%

Ácido gálico

DPPH (diphenil-1-picrylhydrazyl)

Trolox 1 mM

Sal de diamonio (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio)

Peroxidisulfato de potasio

Acetona al 80% (v/v)

Quercetina

Solución de NaNO<sub>2</sub> al 5%

Solución de AlCl<sub>3</sub> al 10%

Solución de NaOH 1M

Ver anexo 1. Para preparación de reactivos.

### 5.3. Material y equipo

Material de laboratorio

Termobalanza (modelo LJ16, Mettler Toledo, EUA)

Liofilizadora (7754040, Labconco, EUA)

Centrífuga (modelo Allegra X-12R, Beckman Coulter, EUA)

Potenciómetro (modelo 920a, Orion Star, EUA)

Espectrofotómetro (modelo Genesys 10-S, Thermo Spectronic, EUA)

## 6. METODOLOGÍA

En la figura 10 se presenta el diagrama general en el cual se indican las determinaciones realizadas en este trabajo, todas se realizaron por triplicado y algunas fueron realizadas tanto a las hojas como a los extractos obtenidos.

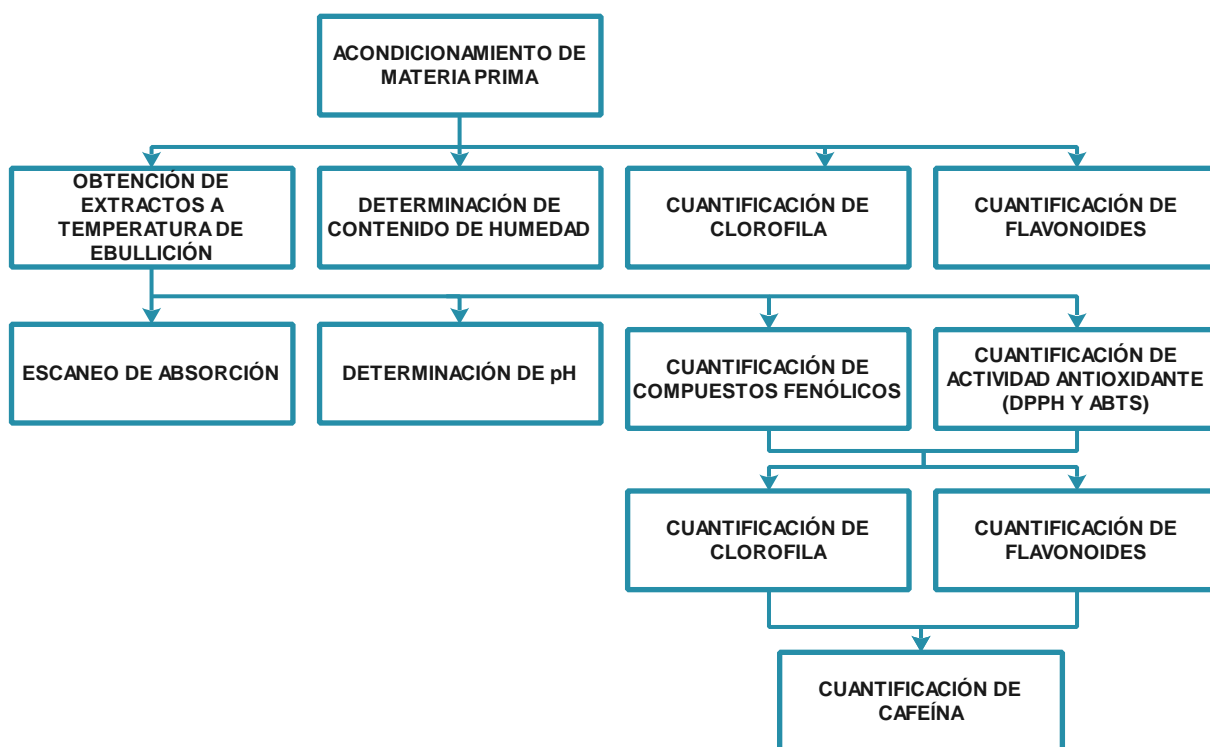


Figura 10. Diagrama general de trabajo.

### 6.1. Acondicionamiento de la materia prima

Las muestras de hojas de *Citrus aurantifolia* Swingle se obtuvieron del poblado de Tepexpan en el Estado de México, México (latitud: 19.615315, longitud: -98.922138). Las hojas frescas de lima se recolectaron y seleccionaron eliminando las que presentaban algún daño, después se lavaron para evitar la presencia de partículas de polvo y materia extraña. El total de hojas se dividió en tres grupos con el fin de conocer el efecto de secado en las determinaciones y extracciones que se realizaron

posteriormente, el primer grupo de hojas se manipuló en estado fresco, el segundo se secó a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ) durante dos semanas y el último se liofilizó.

## 6.2. Determinación del contenido de humedad por el método de termobalanza

La humedad se determinó en hojas de lima frescas, secas y liofilizadas, esta técnica se fundamenta en la pérdida de peso al secado, mediante un instrumento de humedad que emplea una balanza de torsión sensible para pesar la muestra y una lámpara infrarroja para secar. El procedimiento es el siguiente (DGN, 1982):

1. Soltar el sujetador del plato para muestra, asegurarse que el plato corra libremente sobre su soporte, y que esté limpio y seco.
2. Ajustar al 0 y 100%.
3. Pesar 2 g de la muestra y distribuirla uniformemente en el platillo de la termobalanza.
4. Con la fuente de potencia ajustada, bajar la tapa de la balanza. Después de pasado un tiempo de 10 a 20 min, deberá tomarse la lectura, y si permanece estable durante 2 min se registrará como porcentaje total de humedad.

## 6.3. Extractos acuosos y etanólicos de hoja de lima

Es importante mencionar la diferencia entre decocción, maceración e infusión, ya que son métodos de extracción de compuestos fitoquímicos, en este trabajo se realizaron decocciones de las hojas de lima, sin embargo, con fines comparativos en la cuantificación de compuestos fitoquímicos y actividad antioxidante se hace mención de diferentes extractos obtenidos por algunos de estos métodos (Fauron, 1994):

Decocción: Se aplica a algunas plantas con principios activos que no pueden ser extraídos fácilmente, la materia vegetal en pequeños fragmentos se lleva a ebullición durante un tiempo determinado, finalmente la mezcla se filtra.

Maceración: el método consiste en sumergir la materia vegetal en un disolvente a temperatura ambiente durante un tiempo determinado, para finalmente filtrarse, es empleado cuando las plantas tienen compuestos volátiles.

Infusión: se prepara triturando la materia vegetal, se coloca en agua caliente y se tapa para después de un tiempo determinado de reposo filtrarse en caliente, sin requerir más calor.

El proceso de extracción se muestra en la figura 11, para cada uno de los grupos de hojas se realizó un extracto en agua y otro en etanol al 80%, para esto se pesaron 2 g de muestra triturada y se agregaron en un vaso de precipitados con 50 mL del disolvente en ebullición, se manejaron 5 tiempos diferentes de tratamiento térmico para cada uno de los extractos: a 2, 5, 7, 10 y 15 min, obteniendo finalmente 30 extractos diferentes, después de enfriarse se les realizó la medición de pH y almacenaron a 4°C para realizar las siguientes determinaciones.

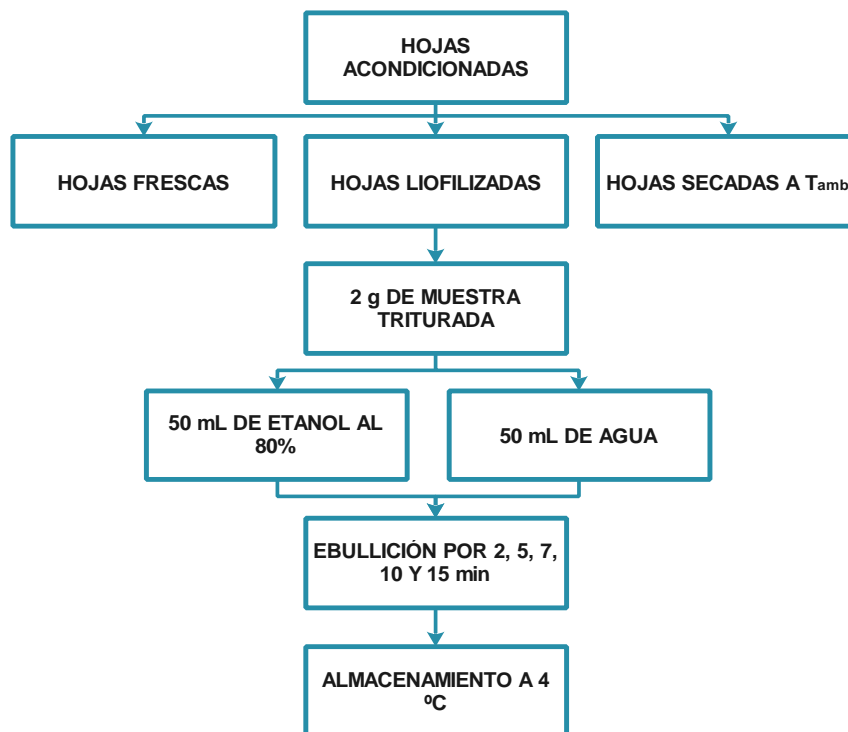
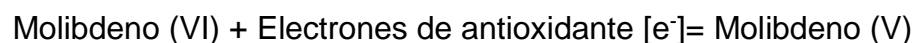


Figura 11. Metodología para la extracción de agentes bioactivos de hojas de lima mexicana.

#### 6.4. Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, utilizado en la determinación de compuestos fenólicos. Este método colorimétrico se fundamenta en la reducción del ácido fosfotungstomolibdico por los compuestos fenólicos en solución alcalina, originando óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), finalmente se mide la cantidad de sustancia que se requiere para inhibir la oxidación del reactivo (Escobar, 2010). La reacción es la siguiente (Huang y Prior, 2005):



El método consiste en adicionar 650  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu 1N a 100  $\mu\text{L}$  de extracto y desarrollar la reacción durante 5 min. Posteriormente, deben añadirse 650  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7%, y agitar vigorosamente. La mezcla de reacción se deja reposar durante 90 min, posteriormente la absorbancia del compuesto desarrollado de color azul se mide a 750 nm (Iglesias, 2012). El contenido de fenoles totales se determina mediante interpolación en una curva tipo empleando ácido gálico como patrón y se expresa en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg EAG/g B.S.).

#### 6.5. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método ABTS

El radical  $\text{ABTS}^+$  se obtiene tras la reacción de ABTS con persulfato de potasio (2.45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 16 h en refrigeración. Una vez formado el radical  $\text{ABTS}^+$  se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de  $0.700 \pm 0.02$  a 734 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80% en comparación con la absorbancia del blanco, después de añadir 20  $\mu\text{L}$  de la muestra a 980  $\mu\text{L}$  de dilución del radical  $\text{ABTS}^+$  se le determina la absorbancia a 734 nm cada 60 s durante 5 min. Se emplea el antioxidante sintético de referencia

Trolox para realizar una curva tipo de 1 a 6  $\mu\text{M}$ . Los resultados se expresan en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ( $\mu\text{M ET/g B.S.}$ ), con la siguiente ecuación se determina la diferencia de absorbancia (Kuskoski *et al.*, 2005):

$$\Delta A = \frac{A0 \text{ muestra} - A5 \text{ muestra}}{A0 \text{ muestra} - \left( \frac{A0 \text{ disolvente} - A5 \text{ disolvente}}{A0 \text{ disolvente}} \right)}$$

Donde:

A0= absorbancia al tiempo 0 min.

A5= absorbancia al tiempo 5 min.

#### 6.6. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

El método emplea al 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) en su forma radical, este compuesto tiene una banda de absorción a 515 nm que desaparece tras la reducción producida mediante un compuesto antirradical (Brand, 1995). La técnica se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH 100  $\mu\text{M}$  (3.9 mL) disuelto en metanol al 80%, a una longitud de onda de 515 nm. Se añaden 0.1 mL de la muestra o patrón, la mezcla se homogeniza por inversión, y se mantiene en oscuridad durante 30 min. Las medidas de absorbancia a 515 nm se realizan antes de añadir la muestra y se realiza una lectura más a los 30 min. La concentración de DPPH en el medio de reacción se calculó a partir de una curva tipo de Trolox ensayada de 10 a 80  $\mu\text{M}$ . El antioxidante sintético de referencia Trolox en disolución de metanol al 80% para la curva tipo se ensayó en las mismas condiciones, se empleó la siguiente ecuación para determinar el porcentaje de inhibición, los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ( $\mu\text{M ET/g B.S.}$ ) (Kim *et al.*, 2002):

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{A0 \text{ muestra} - A30 \text{ muestra}}{A0 \text{ muestra}} \times 100$$

Donde:

A0= absorbancia al tiempo 0 min.

A30= absorbancia al tiempo 30 min.

## 6.7. Cuantificación de flavonoides

Se realizó una extracción de flavonoides para cada grupo de hojas de lima, además de cuantificarse en los extractos acuosos y etanólicos, realizados con la finalidad de comparar la concentración de flavonoides en cada extracción. Para la determinación de flavonoides en hojas se prepararon extractos con 10 mL de metanol acidificado al 1% con HCl 1N y 0.25 g de muestra, se sonicaron por 10 min, se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se agregaron 5 mL de metanol acidificado al 1% con HCl 1N y se sonicaron nuevamente por 10 min seguida de una centrifugación por 10 min a 4000 rpm, finalmente se completó el volumen con metanol acidificado a 20 mL. Para la determinación de flavonoides en los extractos acuosos, etanólicos y metanólicos se realizó una curva tipo de quercetina, se empleó el ensayo colorimétrico del cloruro de aluminio con algunas modificaciones como se indica a continuación, se depositaron 150  $\mu$ L de extracto en tubos de ensayo, se agregaron 40  $\mu$ L de solución de NaNO<sub>2</sub> (5%), se homogeneizó y se dejó reposar 5 min, se adicionaron 40  $\mu$ L de solución de AlCl<sub>3</sub> (10%), se mezcló y se dejó reposar 1 min, se agregaron 250  $\mu$ L de solución de NaOH 1M y por último se adicionaron 750  $\mu$ L de agua destilada, se mezcló y se realizó la lectura de absorbancia a 510 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina/g muestra en base seca (mg EQ/g B.S.) (Martínez *et al.*, 2011).



## 6.8. Cuantificación de clorofilas

Se realizó la cuantificación de clorofila a, b y total en las hojas de lima frescas, secadas a temperatura ambiente y liofilizadas, a 0.1 g de muestra triturada se le añadieron 2 mL de acetona al 80%, se homogenizó en un vórtex a velocidad lenta durante 2 min, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min a 4 °C, el sobrenadante se filtró con ayuda de papel filtro. Se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, finalmente el volumen se completó con acetona al 80% y se realizaron lecturas a 648 y 663 nm. Para la determinación de clorofilas en los extractos acuosos y etanólicos se agregó etanol a cada uno para obtener una solución final al 95% de etanol. El contenido de clorofila para cada disolvente se determina mediante las fórmulas mostradas en el cuadro 2 (Cedeño, 2016):

*Cuadro 2. Fórmulas para cuantificación de clorofilas.*

Clorofila (mg clorofila/g de hoja B.S.)	Fórmula	
	Etanol al 95%	Acetona al 80%
a	$(13.36 * A_{663\text{nm}} - 5.19 * A_{648\text{nm}}) * \frac{V}{W}$	$(12.7 * A_{663\text{nm}} - 2.69 * A_{648\text{nm}}) * \frac{V}{W}$
b	$(27.43 * A_{648\text{nm}} - 8.12 * A_{664\text{nm}}) * \frac{V}{W}$	$(22.9 * A_{648\text{nm}} - 4.68 * A_{663\text{nm}}) * \frac{V}{W}$
Total	$(5.24 * A_{663\text{nm}} + 22.24 * A_{648\text{nm}}) * \frac{V}{W}$	$\frac{(20.2 * A_{648\text{nm}} + 8.02 * A_{663\text{nm}}) * V}{W}$

Donde:

V = volumen del extracto en mililitros

W = peso de la muestra en gramos

A = absorbancia

## 6.9. Determinación de cafeína

Para la cuantificación de cafeína se tomó una alícuota de 50 mL de solución de las muestras. Esta alícuota se colocó en un embudo de separación con 25 mL de diclorometano. La cafeína se extrajo invirtiendo el embudo tres veces, ventilando el

embudo después de cada inversión y evitando la formación de una emulsión. La capa de diclorometano se retiró a un matraz limpio y el procedimiento de extracción se repitió dos veces más y las capas de disolvente de cada inversión fueron mezcladas, se midió la absorbancia a 260 nm y la cuantificación se realizó interpolando en una curva tipo de cafeína a una concentración entre 0 y 200 ppm (Jenway, 2014).

#### 6.10. Análisis estadístico

Los datos se expresaron con una desviación estándar. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de un factor usando un valor de significancia de  $\alpha=0.01$  utilizando las herramientas de análisis de datos de Excel 2016 de Microsoft.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Determinación del contenido de humedad en hojas de lima mexicana

En la figura 12 se muestran las hojas de lima empleadas con los tratamientos de secado aplicados, así como una muestra fresca; se puede observar que la hoja liofilizada conserva su color y estructura en comparación con la hoja secada a temperatura ambiente que presenta degradación del color y pérdida de la estructura.



*Figura 12. Hoja de lima mexicana de Tepexpan, Estado de México.*

Una vez realizados los tratamientos de secado, se determinó el contenido de humedad de hojas de lima frescas, secas y liofilizadas en una termobalanza Mettler LJ16 como se muestra en la Figura 13.



*Figura 13. Determinación del contenido de humedad por el método de la termobalanza.*

En el Cuadro 3 se observa el porcentaje de humedad que se obtuvo para cada hoja, de igual forma, se determinó el porcentaje de sólidos en cada condición para reportar los resultados en base seca.

Cuadro 3. Determinación del contenido de humedad en hojas de lima.

	Hojas frescas	Hojas secadas T <sub>amb</sub>	Hojas liofilizadas
% Humedad	60.49 ±1.4	13.11 ±0.57	11.58 ±0.68
% Sólidos	39.51 ±1.4	86.90 ±0.57	88.42 ±0.68

## 7.2. Determinación de pH

Se realizaron mediciones de pH en los extractos acuosos y etanólicos de hojas de lima frescas, secas y liofilizadas para los diferentes tiempos de extracción, se realizó un promedio de pH de los extractos para cada sistema de extracción como se observa en la figura 14, donde se muestra que el pH de los extractos acuosos es ligeramente ácido, mientras que los extractos etanólicos mantienen un pH cercano a la neutralidad, esta determinación indica de forma general el perfil de los compuestos que se extrae por medio de los dos disolventes empleados, es muy probable que en los extractos acuosos se encuentre una mayor cantidad de ácidos fenólicos y en los extractos etanólicos mayor presencia de alcaloides y flavonoides, debido a la afinidad por el disolvente. En un trabajo de extractos hidroalcohólicos de *Lippia turbinata* Griseb presentaron datos de pH entre 6.82 y 6.9 (Núñez *et al.*, 2006), en este trabajo se encontraron valores similares, ya que el pH promedio de los extractos etanólicos de hojas de lima se ubica entre 6.7 y 7.4.

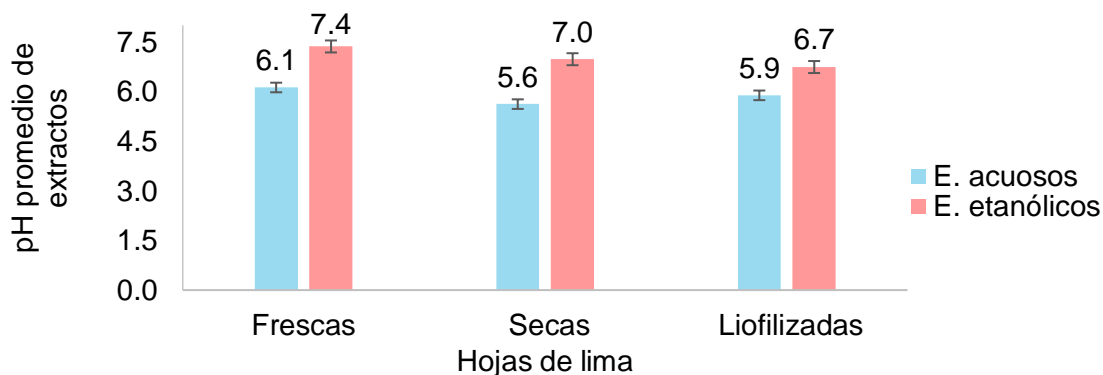


Figura 14. pH de los extractos de hojas de lima.

### 7.3. Barridos en espectro visible

Se efectuaron barridos de longitud de onda con un espectrofotómetro UV-VIS Thermo Spectronic, el escaneo de absorción de cada extracto se realizó en el espectro electromagnético de 200 a 700 nm, se identificaron los picos de máxima absorción indicando a que grupo de compuestos corresponderían para cada sistema como se muestra en el cuadro 4.

*Cuadro 4. Picos de máxima absorción registrados en los extractos de lima mexicana.*

Sistema	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Compuestos
Extractos acuosos de hojas frescas	254	Flavonoides (quercetina-rutina)
	323-329	Ácidos fenólicos (compuestos hidroxicinámicos)
Extractos etanólicos de hojas frescas	263-269	Flavonoides (kaempferol)
	287-293	Taninos y flavonoides
	296	Ácidos fenólicos
	323-329	Ácidos fenólicos (compuestos hidroxicinámicos)
	665	Clorofila a
Extractos acuosos de hojas secas	272-278	Ácidos fenólicos (ácido gálico)
	317-320	Ácidos fenólicos
Extractos etanólicos de hojas secas	263-269	Flavonoides (kaempferol)
	272-278	Ácidos fenólicos (ácido gálico)
	323-329	Ácidos fenólicos (compuestos hidroxicinámicos)
	665	Clorofila a
Extractos acuosos de hojas liofilizadas	254	Flavonoides (quercetina-rutina)
	314	Ácidos fenólicos (Ácido cumaroilquínico)
	317-320	Ácidos fenólicos
Extractos etanólicos de hojas liofilizadas	287-293	Taninos y flavonoides
	323-329	Ácidos fenólicos (compuestos hidroxicinámicos)
	665	Clorofila a

(Gómez, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2010; Santhanakrishnan *et al.*, 2014; Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008)

De acuerdo con las longitudes de onda de máxima absorción reportadas en la literatura del cuadro 4, se puede discernir que en los extractos acuosos se extrajeron con mayor afinidad los compuestos fenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos, mientras que en los extractos etanólicos sobresalen la clorofila a y taninos. Sin embargo, los picos en esta región no están tan definidos por lo que se requiere un análisis más específico como HPLC-MS.

En la figura 15 se muestran los barridos completos de los extractos, se observa que cada sistema mantiene una tendencia semejante con los mismos picos de máxima absorción, de igual forma, conforme se aumentó el tiempo de tratamiento térmico también aumentó la absorbancia, indicando que se extrajo mayor cantidad de compuestos fitoquímicos con un mayor tiempo de exposición a la temperatura de ebullición del disolvente. Al comparar entre extractos acuosos y etanólicos para un mismo tipo de hoja se observa que en los extractos etanólicos hay un mayor número de picos de absorción, indicando mayor diversidad de compuestos en comparación con los extractos acuosos, sin embargo, las unidades de absorbancia de los extractos acuosos son más altas que en los extractos etanólicos debido a que los compuestos fitoquímicos se encuentran en mayor concentración.

Los barridos espectrales muestran la complejidad de los grupos de compuestos fitoquímicos presentes en cada extracto los cuales son responsables de la actividad antioxidante, por las unidades de absorbancia mostrada y los picos de máxima absorción se sugiere la presencia de compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides. Se observa de forma general que en la región UV entre 200 y 280 nm no se tiene un patrón definido o estable ya que en ese intervalo los fenoles simples tienen su absorbancia máxima (Martínez-Valverde *et al.*, 2000), por lo que es necesario emplear otro método para su cuantificación.

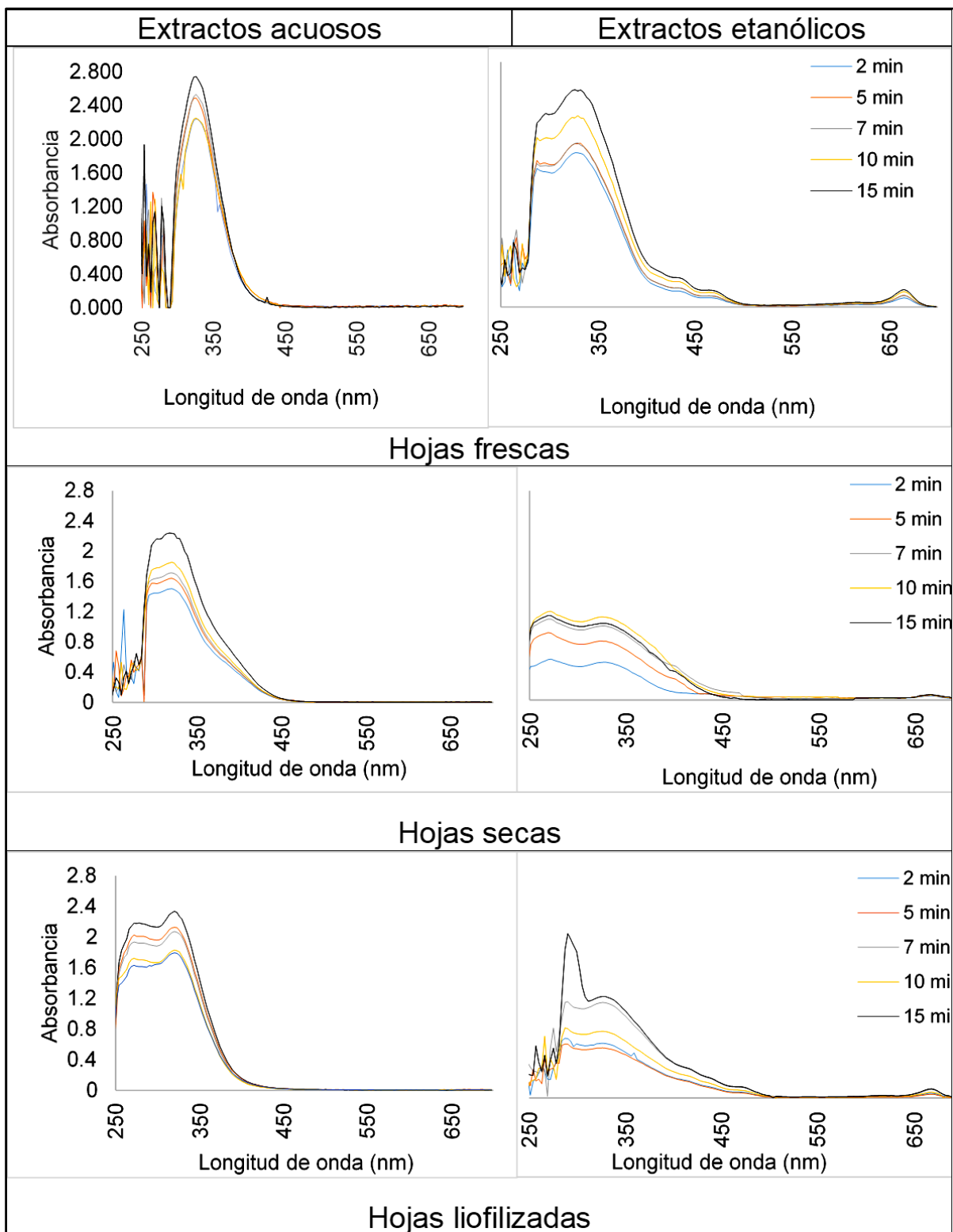
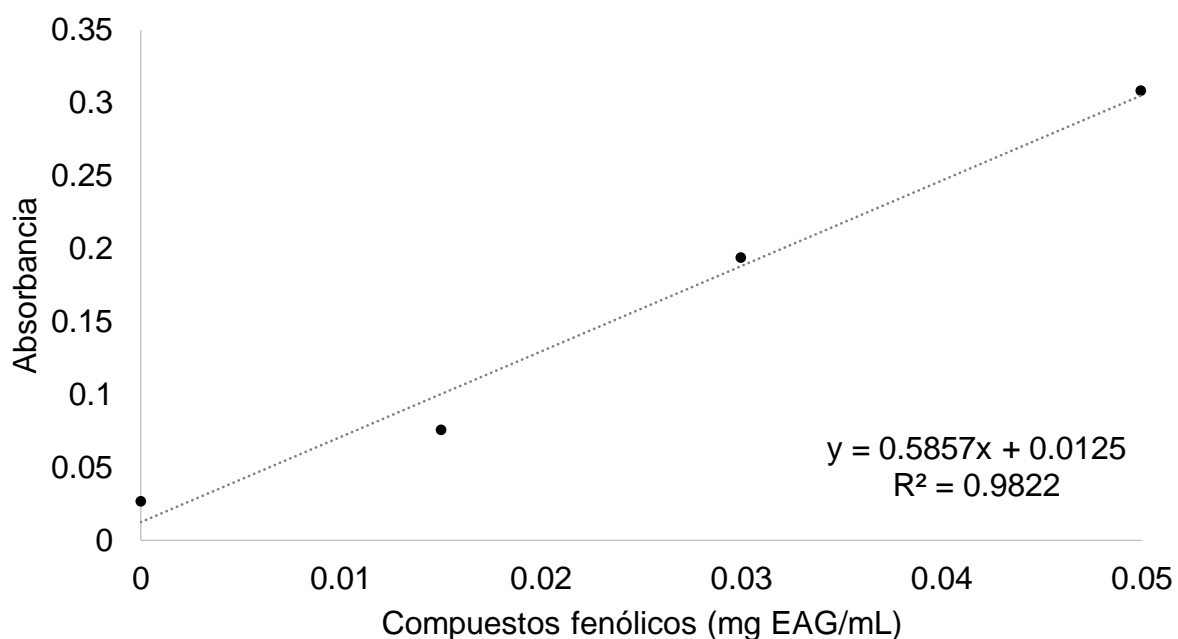


Figura 15. Espectros de absorción de los extractos de hojas de lima mexicana.

#### 7.4. Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu

Después de realizar los barridos, se efectuó la determinación de compuestos fenólicos en los extractos por el método de Folin-Ciocalteu, para esto se realizó una curva tipo de ácido gálico mostrada en la figura 16.



*Figura 16. Curva tipo de ácido gálico.*

#### **Extractos acuosos**

El análisis estadístico para el contenido de compuestos fenólicos entre los extractos de hojas frescas, liofilizadas y secas a  $T_{amb}$  indicó que sí existe diferencia significativa en el contenido de compuestos fenólicos entre los extractos acuosos de las tres muestras de lima mexicana con un nivel de confianza del 99% ( $\alpha=0.01$ ), dados los valores de  $F=69.75$  y  $F_c=5.15$ . Se determinó que para los sistemas acuosos en los extractos de hojas secadas a  $T_{amb}$  se encuentran en mayor concentración los compuestos fenólicos, se muestra en la figura 17 que la concentración óptima es de 165.0 mg EAG/g B.S. en hojas secas a  $T_{amb}$  con un tratamiento térmico de 15 min,



seguido de los extractos de hojas frescas con 163.3 mg EAG/g B.S. a los 10 min y por último en los extractos de hojas liofilizadas se encontró un valor de 56.7 mg EAG/g B.S. a los 10 min.

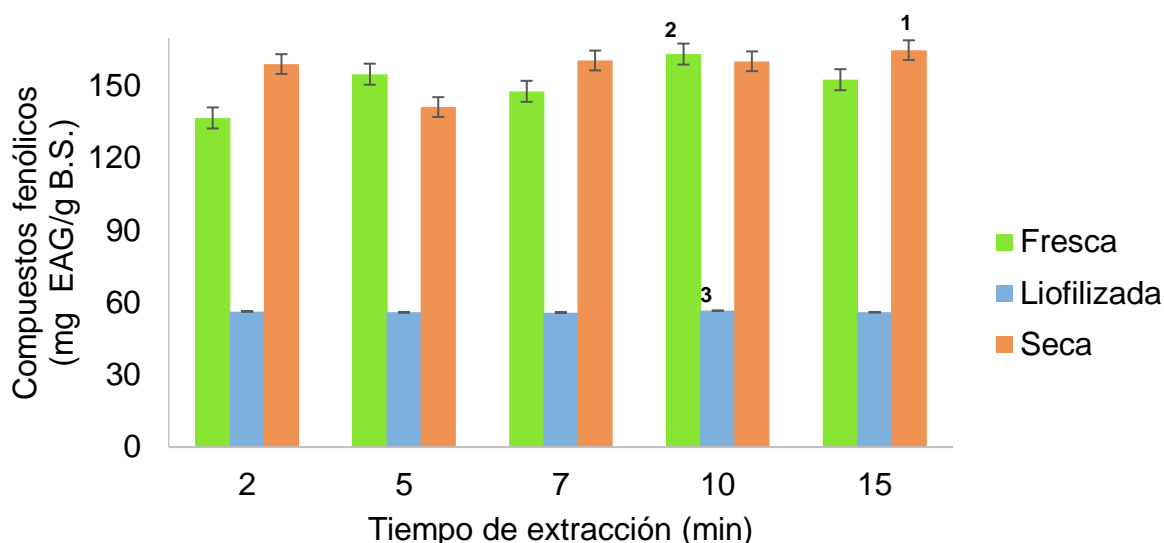


Figura 17. Compuestos fenólicos en extractos acuosos.

Al analizar el efecto del tiempo de extracción se observa que, en el caso de las tres muestras de hojas de lima mexicana, a mayor tiempo de extracción se obtiene un mayor contenido de compuestos fenólicos, es decir, a los 2 min en decocción se obtiene la menor cantidad de dichos compuestos, pero conforme aumenta el tiempo se efectúa una mayor extracción la cual es óptima entre los 10 y 15 min.

Por otro lado, se encontró mayor concentración de compuestos fenólicos en las hojas secadas a  $T_{amb}$ , debido a que estos compuestos se concentran durante la pérdida de agua en el proceso de secado. Por otro lado, en las hojas liofilizadas los compuestos fenólicos se redujeron alrededor de una tercera parte de lo encontrado en las hojas frescas, sin embargo, se esperaba que el contenido de compuestos fenólicos fuera mayor por las características reportadas en la literatura sobre el proceso de liofilización, este efecto de disminución en dichos compuestos ha sido observado de igual forma en estudios sobre alimentos, por ejemplo, se ha reportado que la

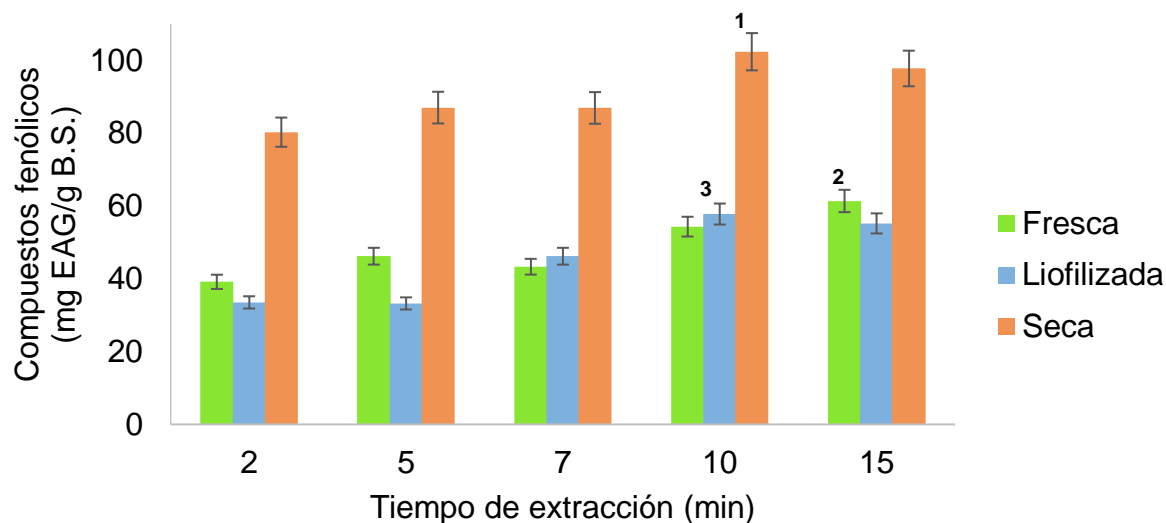
concentración de fenólicos totales en maíz es menor en una muestra liofilizada que en la muestra sin tratar (Asami *et al.*, 2003), también se ha encontrado una reducción de dichos compuestos en jugo de uva liofilizado (Vashisth *et al.*, 2011), asimismo, se ha observado una disminución en el contenido de fenólicos totales en mora liofilizada al compararla con el fruto fresco, este comportamiento se atribuye a que los cristales de hielo formados durante la congelación de las muestras pueden conjuntamente facilitar la extracción de los compuestos fenólicos, además de la liberación de enzimas oxidativas que pueden degradar dichos compuestos durante el proceso (Tarín, 2015).

Finalmente, al comparar los resultados con los compuestos fenólicos encontrados en infusiones de plantas, se ha reportado en té verde un valor de 2.09 y 6.08 g EAG/100g B.S., mientras que para el té negro 2.30 y 4.32 g EAG/100g B.S. (Socaci *et al.*, 2013), por otro lado, en hojas de muicle y tejocote se han reportado 19.76 y 24.47 g EAG/100 g B.S. respectivamente (Ronquillo de Jesús, 2013), en el presente trabajo en hojas de lima secas se encontró un valor de 16.49 g EAG/100 g, siendo un valor alrededor de 3 veces mayor que en té verde y té negro y se encuentra en un valor intermedio en cuanto a los compuestos fenólicos de hojas de muicle y tejocote, por lo tanto, se puede expresar que el contenido de compuestos fenólicos se encuentra dentro de la magnitud esperada y este tipo de bebida aporta una cantidad importante de compuestos bioactivos al consumirse.

### **Extractos etanólicos**

El análisis estadístico para el contenido de compuestos fenólicos entre los extractos de hojas frescas, liofilizadas y secas a  $T_{amb}$ , con un nivel de confianza del 99% ( $\alpha=0.01$ ), indicó que sí existe diferencia significativa en el contenido de compuestos fenólicos entre los extractos etanólicos de las tres muestras de lima mexicana con valores de  $F=24.92$  y  $F_c=5.15$ . En los extractos etanólicos se obtuvo menor cantidad de compuestos fenólicos que en los extractos acuosos, sin embargo, la concentración máxima para cada grupo de hojas se mantiene en el mismo orden; es decir, los compuestos fenólicos en los extractos de hojas secas a  $T_{amb}$  se encuentran en una

concentración de 102.40 mg EAG/g B.S. a los 10 min, seguidos de los extractos de hojas frescas con 61.38 mg EAG/g B.S. a los 15 min y por último los extractos de hojas liofilizadas con 57.80 mg EAG/g B.S. a los 10 min como se muestra en la figura 18.



*Figura 18. Compuestos fenólicos en extractos etanólicos.*

Al comparar los tiempos de decocción se encuentra que, al igual que en el caso de los extractos acuosos, a un mayor tiempo de extracción se obtiene mayor contenido de compuestos fenólicos, observándose un ascenso paulatino en el contenido de dichos compuestos del minuto 2 al 15, por lo que se diserta que se lleva a cabo una óptima extracción entre los 10 y 15 min.

Desde otra perspectiva, se sabe que, la solubilidad en una mezcla agua-etanol de los compuestos fenólicos es generalmente mayor para compuestos difenoles y polifenoles, explicando el hecho que en los barridos en el espectro de los extractos etanólicos se haya observado un mayor número de picos de absorción y además, en este caso a diferencia de los extractos acuosos, el contenido de compuestos fenólicos en las hojas liofilizadas no se ve drásticamente disminuido al compararse con los extractos etanólicos de las hojas frescas, ya que no se encontró diferencia significativa en el contenido de dichos compuestos en los sistemas de óptima extracción, es decir,

para el caso de la extracción en agua de hojas liofilizadas se determinaron  $56.68 \pm 0.27$  mg EAG/g B.S. y para la extracción en etanol al 80% fueron  $57.8 \pm 1.53$  mg EAG/g B.S. Asimismo, se ha comprobado que la cantidad de compuestos fenólicos extraída es proporcional al aumento de la temperatura (Muñoz *et al.*, 2015), es probable que, en los extractos acuosos se encuentra una mayor cantidad de compuestos fenólicos debido a que la extracción de hojas de lima se llevó a cabo al punto de ebullición de cada disolvente y como se sabe el agua tiene un punto de ebullición mayor al de etanol al 80%.

En la figura 19 se comparan los resultados obtenidos con los reportados en las referencias, se encontró que en hojas secas de granada china (*Passiflora ligularis*) se determinó un valor de 14.32 mg EAG/g B.S. (Cabrera *et al.*, 2014), en hojas de hierba del sapo (*Eryngium comosum* Delar f.) 154 mg EAG/g B.S. y en hojas de muicle (*Justicia spicigera* Schult) 157.69 mg EAG/g B.S. (Ronquillo de Jesús, 2013), en los extractos de hojas secas a  $T_{amb}$  en el presente estudio se encontró un valor de 102.40 mg EAG/g B.S., el cual está dentro de las magnitudes que se han reportado.

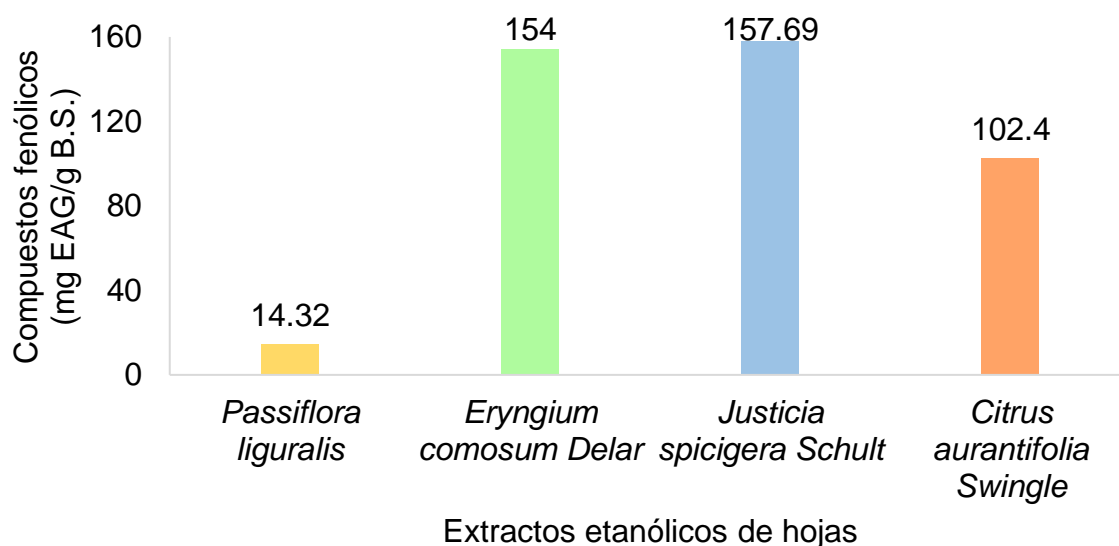


Figura 19. Contenido de compuestos fenólicos en extractos etanólicos de hojas.

Es importante mencionar que la composición de compuestos fenólicos varía por diversos factores como la variedad de la planta, el suelo, la cantidad de materia orgánica, cantidad y tiempo de aplicación de fertilizantes, así como la temperatura donde crece el árbol, este último factor tiene efectos tanto en la calidad interna de la fruta como en la apariencia externa, en la textura y en el desarrollo del color superficial, sin embargo, las características genéticas tienen efectos sobre la variabilidad de los compuestos bioactivos (Escobar, 2010).

#### 7.5. Determinación de actividad antioxidante por el método ABTS

La actividad antioxidante de los extractos permite conocer su poder reductor con el cual se pueden obtener múltiples beneficios, ya que tiene la capacidad de reducir el estrés oxidativo y el daño a biomoléculas (Avello y Suwalsky, 2006). En la figura 20 se muestra la curva tipo de Trolox empleada para cuantificar la actividad antioxidante por el método ABTS.

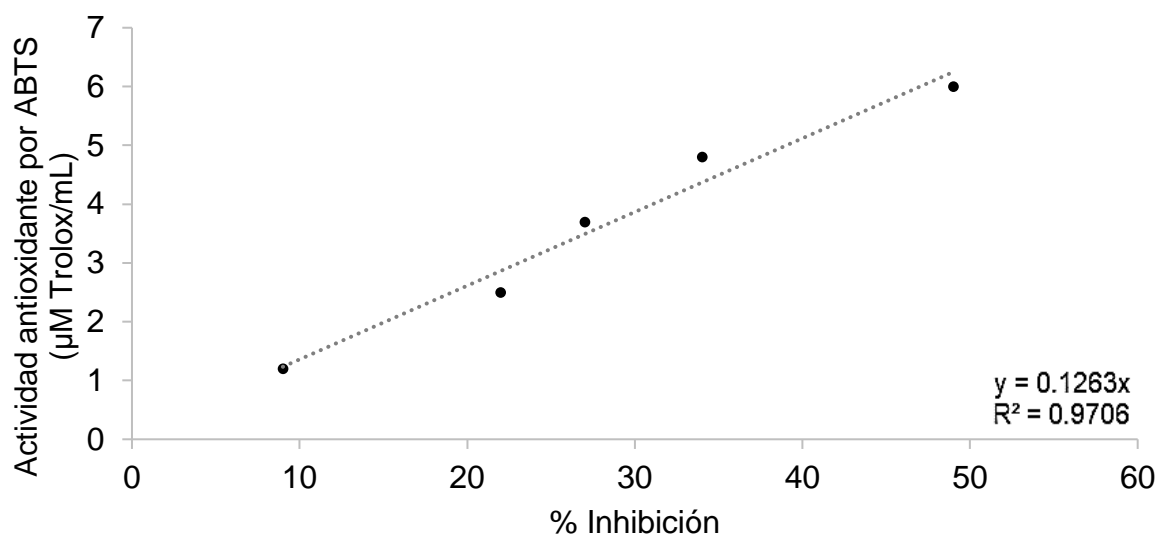


Figura 20. Curva tipo de Trolox para ABTS.

## Extractos acuosos

El análisis estadístico para la capacidad antioxidante entre los extractos de hojas frescas, liofilizadas y secas a  $T_{amb}$  indicó los siguientes valores de  $F=33.93$  y  $F_c=5.15$  con un nivel de confianza del 99% ( $\alpha=0.01$ ), dados los valores se determina que sí existe diferencia significativa en la actividad antioxidante por el método ABTS entre los extractos acuosos de las tres muestras de lima mexicana.

En la figura 21 se puede observar que por el método ABTS la mayor actividad antioxidante se presentó en las hojas liofilizadas con  $2761.7 \mu\text{M ET/g B.S.}$  a los 10 min, recordando que a este tiempo también se encontró el mayor contenido de compuestos fenólicos, seguida de los extractos de hojas secas con  $1826.5 \mu\text{M ET/g B.S.}$  a los 5 min, mientras que las hojas frescas presentaron  $1231.5 \mu\text{M ET/g B.S.}$  a los 10 min. Las hojas frescas presentan menor actividad antioxidante por el método ABTS y ésta aumenta paulatinamente del minuto 2 al 15, en el caso de la actividad que presentan las hojas secas, esta se mantiene de forma constante durante los diferentes tiempos de extracción y las hojas liofilizadas mostraron una alta actividad antioxidante entre 5 y 10 min, viéndose disminuida a los 15 min.

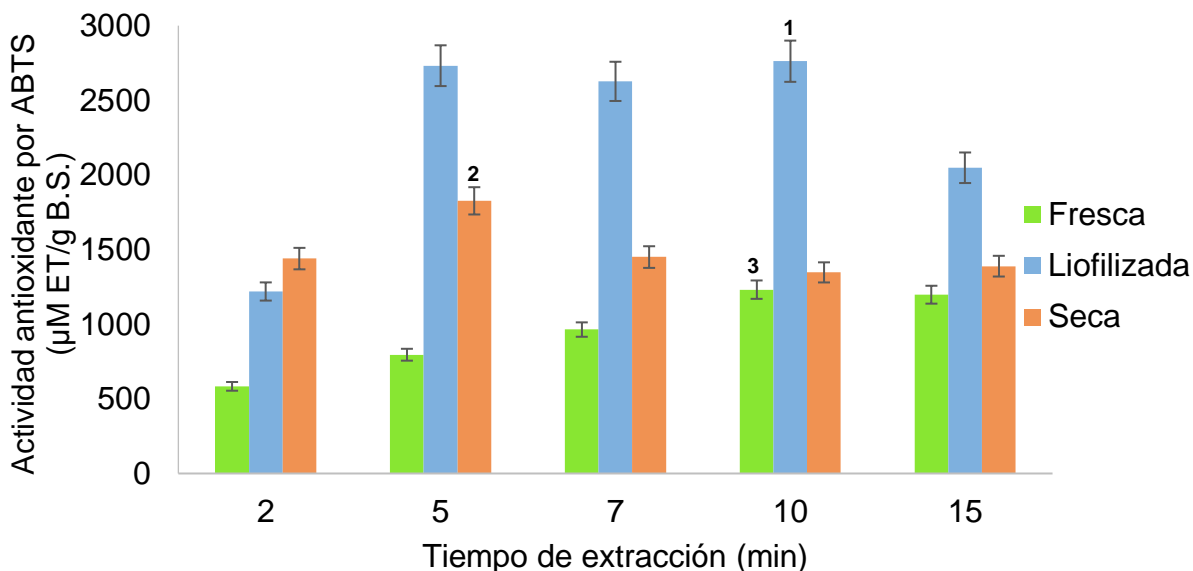


Figura 21. Actividad antioxidante de extractos acuosos de hoja de lima por ABTS.

Al comparar la actividad antioxidante por ABTS en la figura 22 se muestra que en flores de mastuerzo secas (*Tropaeolum majus* L.) la capacidad es entre 587.01 y 622.92  $\mu\text{M ET/g B.S.}$  (Lino *et al.*, 2015), mientras que en hojas de lima seca en el presente trabajo se cuantificaron 1826.5  $\mu\text{M ET/g B.S.}$ , siendo alrededor de 3 veces mayor la actividad antioxidante de hojas de lima seca.

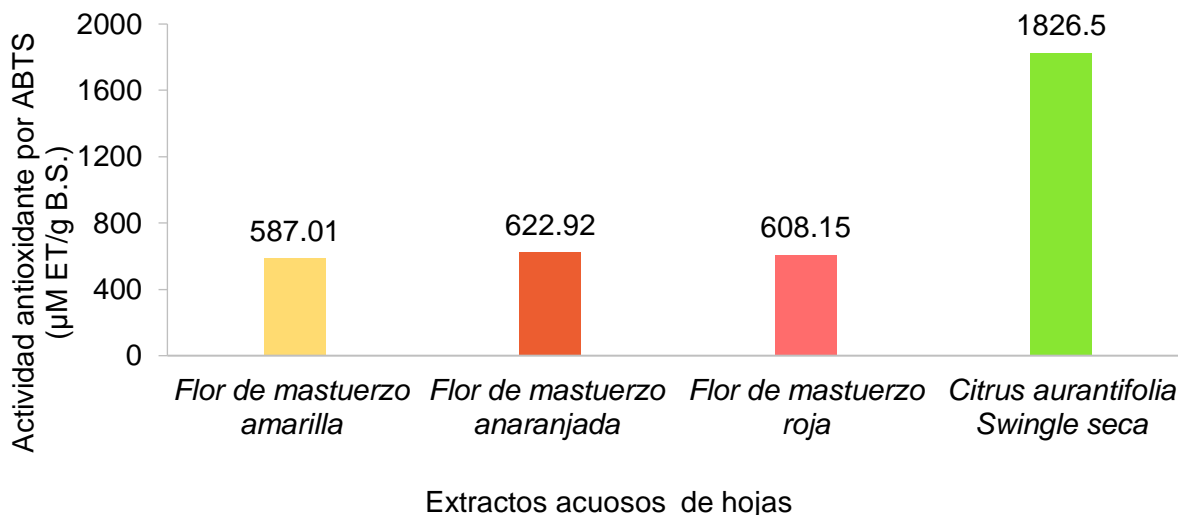


Figura 22. Actividad antioxidante por ABTS en extractos.

### Extractos etanólicos

El análisis estadístico para la actividad antioxidante entre los extractos de hojas frescas, liofilizadas y secas a  $T_{\text{amb}}$  indicó que sí hay diferencia significativa en la actividad antioxidante por el método ABTS entre los extractos etanólicos de las tres muestras de lima mexicana con valores de  $F=223.34$  y  $F_c=5.15$  y un nivel de confianza del 99% ( $\alpha=0.01$ ). Dichos extractos al igual que en la determinación de compuestos fenólicos presentaron menor actividad antioxidante que los extractos acuosos, los resultados para extractos etanólicos se presentan en la figura 23, la mayor actividad antioxidante fue en los extractos de hojas liofilizadas con 1758.3  $\mu\text{M ET/g B.S.}$  a los 10 min, seguido de las hojas secas a  $T_{\text{amb}}$  con 254.3  $\mu\text{M ET/g B.S.}$  a los 15 min, por ultimo las hojas frescas con 151.8  $\mu\text{M ET/g B.S.}$  a los 10 min. Estudiando el efecto del

tiempo de extracción, se muestra que, aunque la capacidad antioxidante no es directamente ascendente conforme aumenta el tiempo, entre los 10 y 15 min se mantiene la mayor actividad a diferencia del tiempo 2 min donde esta actividad es menor.

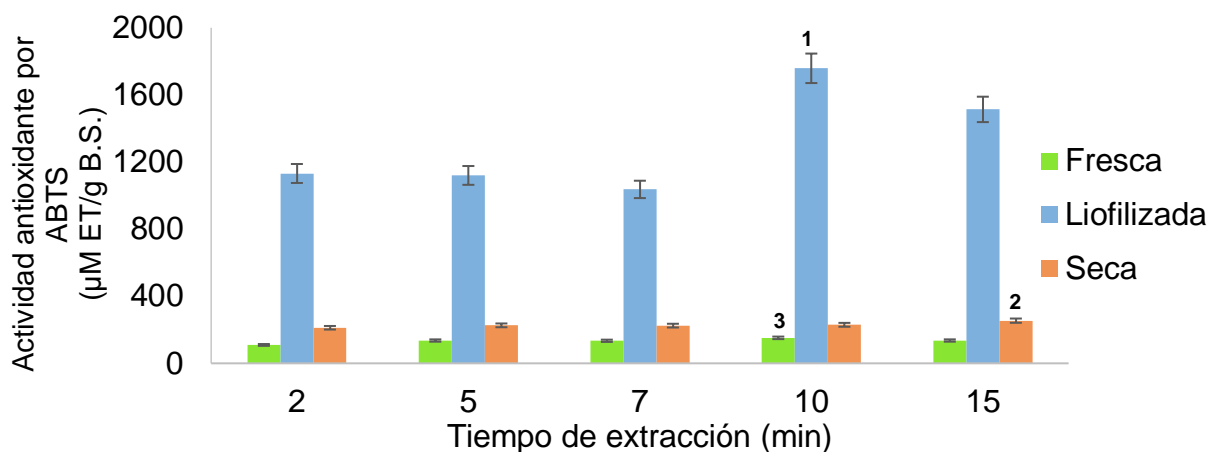


Figura 23. Actividad antioxidante de extractos etanólicos de hoja de lima por ABTS.

#### 7.6. Determinación de actividad antioxidante por el método DPPH

En la figura 24 se muestra la curva tipo de Trolox empleada para cuantificar la actividad antioxidante por el método DPPH.

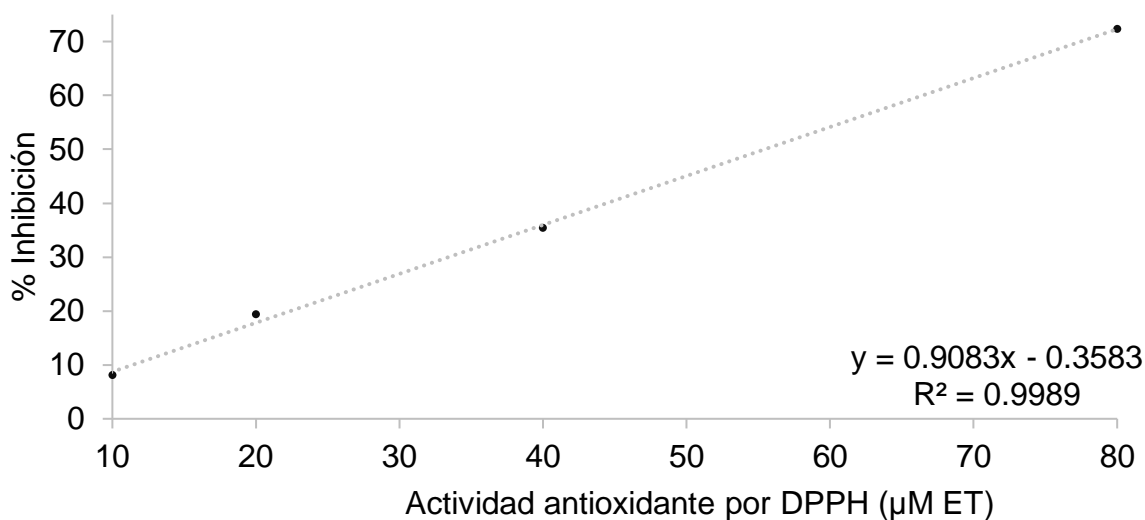


Figura 24. Curva tipo de Trolox para DPPH.



## Extractos acuosos

El análisis estadístico para la capacidad antioxidante por el método DPPH entre los extractos de hojas frescas, liofilizadas y secas a  $T_{amb}$ , dados los valores de  $F=308.39$  y  $F_c=5.15$ , indicaron que sí existe diferencia significativa en la actividad antioxidante entre los extractos acuosos de las tres muestras de lima mexicana.

En la figura 25 se muestra la actividad antioxidante presentada por los extractos acuosos de hoja de lima, es importante mencionar que los extractos de hojas secadas a  $T_{amb}$  son las que presenta mayor actividad antioxidante con  $9634 \mu\text{M ET/g B.S.}$  a los 15 min en ebullición, seguida por las hojas liofilizadas con  $8719 \mu\text{M ET/g B.S.}$  a los 15 min y finalmente los extractos de hojas frescas con  $5941 \mu\text{M ET/g B.S.}$  a los 15 min.

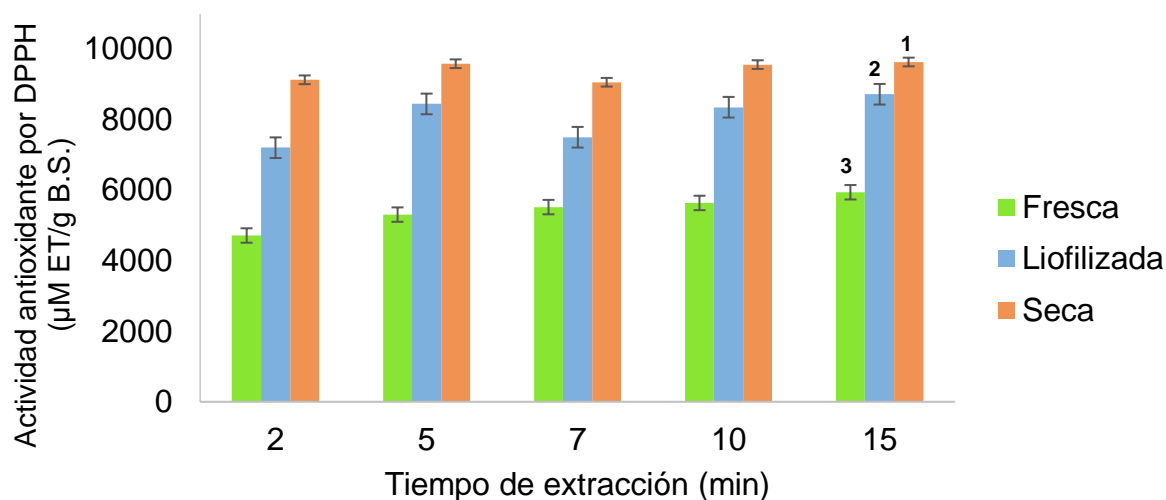


Figura 25. Actividad antioxidante por DPPH de extractos acuosos de hoja de lima.

Al comparar los resultados obtenidos en hojas secadas a  $T_{amb}$  con otros reportes de hojas como se muestra en la figura 26, en hojas de *Echinacea purpurea* se ha encontrado una capacidad antioxidante de  $7500 \mu\text{M ET/g B.S}$  y en hojas de *Juglans regia* de  $11900 \mu\text{M ET/g B.S.}$  (Wojdylo *et al.*, 2007), mientras que en promedio, en este trabajo en el extracto acuoso de las hojas secadas a  $T_{amb}$  se encontró una capacidad

antioxidante de 9394  $\mu\text{M ET/g B.S.}$ , por lo que su actividad antioxidante se encuentra en un valor intermedio. Sin embargo, también se ha reportado la actividad antioxidante en infusiones, que como se observa en la figura 26 tienen una menor actividad que va desde 130  $\mu\text{M ET/g B.S}$  para *Sauropus androgynus* (Andarwulan *et al.*, 2010), 200  $\mu\text{M ET/g B.S.}$  para *Cosmos caudatus* (Wong *et al.*, 2006), hasta 782  $\mu\text{M ET/g B.S.}$  para *Quercus calliprinos* (Al-Mustafa y Al-Thunibat, 2008), es decir, la actividad antioxidante de los extractos de hojas de lima secadas a  $T_{\text{amb}}$  es de aproximadamente 10 a 70 veces mayor que los valores reportados para otras infusiones.

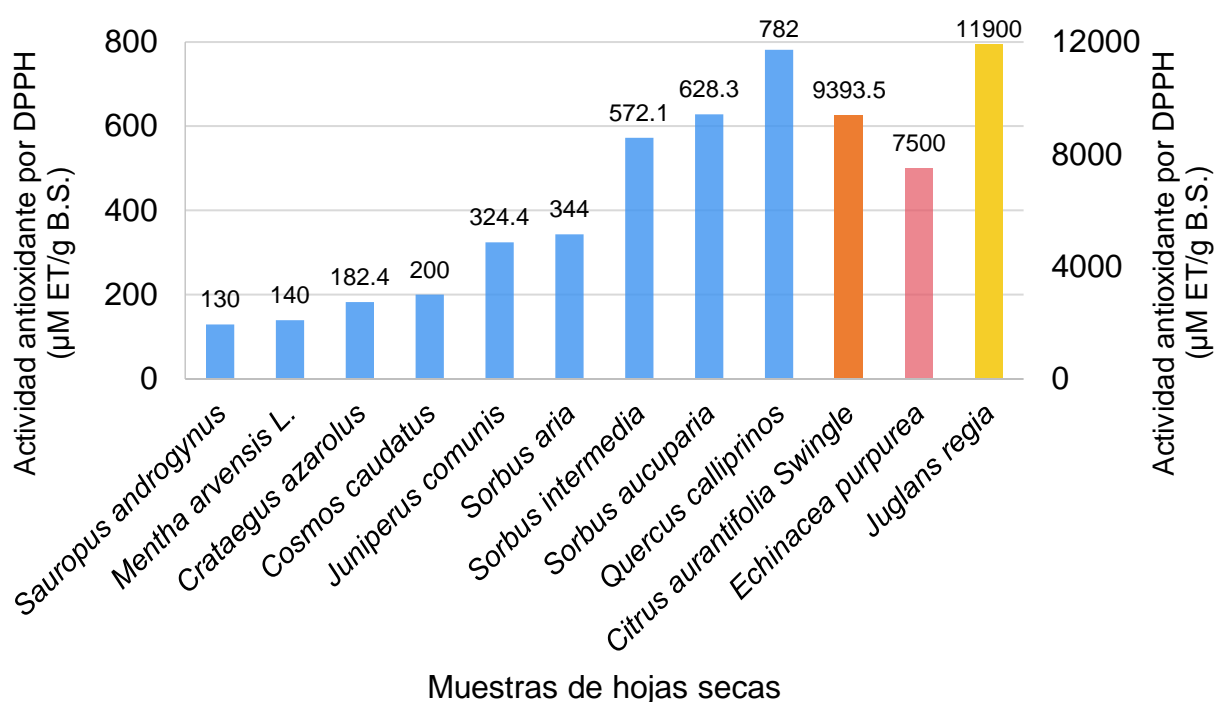


Figura 26. Actividad antioxidante en hojas secas por el método DPPH.

También se calculó el porcentaje de inhibición con fines comparativos, en la figura 27 se muestra la actividad antioxidante de infusiones en porcentaje de inhibición por el método DPPH, se observa que las hojas secas de lima presentan 79.89% de inhibición, muy similar a las infusiones con flores de jamaica (75.4%), y se encuentra hasta 3 veces mayor que otras infusiones como las hojas de menta (27.95%) y Neem (26.43%) (Martínez *et al.*, 2017).

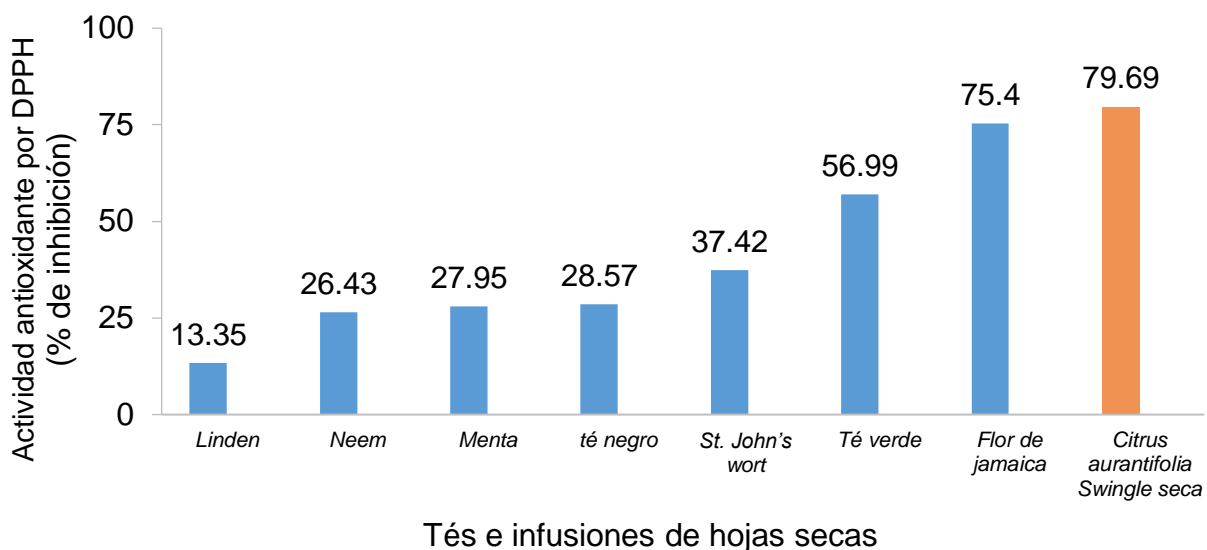


Figura 27. Actividad antioxidante en % de inhibición de DPPH en extractos.

### Extractos etanólicos

El análisis estadístico para la actividad antioxidante entre los extractos de hojas frescas, liofilizadas y secas a  $T_{amb}$ , dados los valores de  $F=96.47$  y  $F_c=5.15$ , indicaron que sí existe diferencia significativa en la actividad antioxidante por el método DPPH entre los extractos etanólicos de las tres muestras de lima mexicana.

En la figura 28 se muestra la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de hojas de lima, se observa que los extractos de hoja liofilizada presentaron mayor actividad antioxidante con  $2709 \mu\text{M ET/g B.S.}$  a los 15 min de tratamiento térmico, seguido de las hojas secas a  $T_{amb}$  con  $1854 \mu\text{M ET/g B.S.}$  a los 10 min y finalmente las hojas frescas presentaron  $1877 \mu\text{M ET/g B.S.}$  a los 15 min. Desde otro punto de vista, se puede observar una relación de la actividad antioxidante con el tiempo de extracción, como se ilustra, a los 2 min se manifiesta la menor actividad antioxidante, pero a un mayor tiempo de decocción, dicha actividad se ve aumentada de forma ascendente hasta llegar a un óptimo de cuantificación logrado entre los 10 y 15 min.

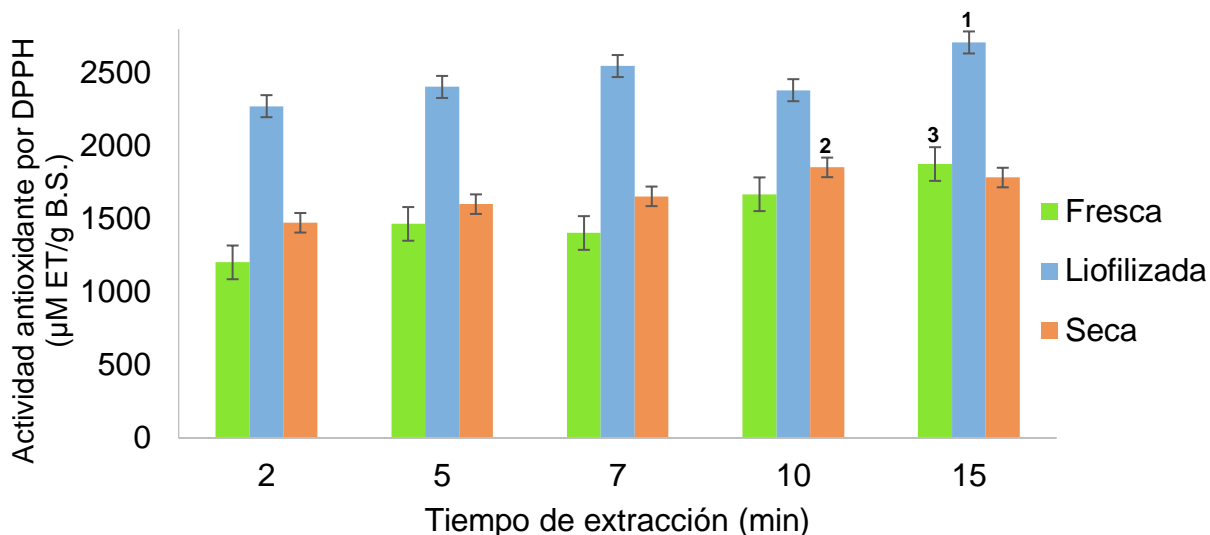


Figura 28. Actividad antioxidante por DPPH de extractos etanólicos de hoja de lima.

En la figura 29 se comparan los resultados obtenidos con los reportados en referencias para extractos etanólicos de hojas secas, se observa que en promedio las hojas de lima secadas a  $T_{amb}$  de este trabajo presentaron 1673.6  $\mu\text{M ET/g B.S.}$ , dicho dato es aproximadamente 7 veces superior al compararlo con los extractos de *Thymus vulgaris* que presenta 222.4  $\mu\text{M ET/g B.S.}$  (Chizzola *et al.*, 2008), por otro lado, en el extracto etanólico de hojas de *Melissa officinalis* L. se han reportado 480  $\mu\text{M ET/g B.S.}$  (Lin *et al.*, 2012), sin embargo, también se han reportado valores de mayor actividad antioxidante como el extracto etanólico de *Anethum graveolens* con 4400  $\mu\text{M ET/g B.S.}$ , es decir, 2.6 veces mayor que la actividad encontrada para el extracto etanólico de hojas de lima secas, de igual forma para *Artemisia dracunculoides* se reportaron 3340  $\mu\text{M ET/g B.S.}$  (Mariutti *et al.*, 2008), por lo tanto, los resultados arrojados en este trabajo se encuentran dentro de la magnitud esperada en cuanto a la capacidad antioxidante para extractos etanólicos con un valor medio para este tipo de extracción.

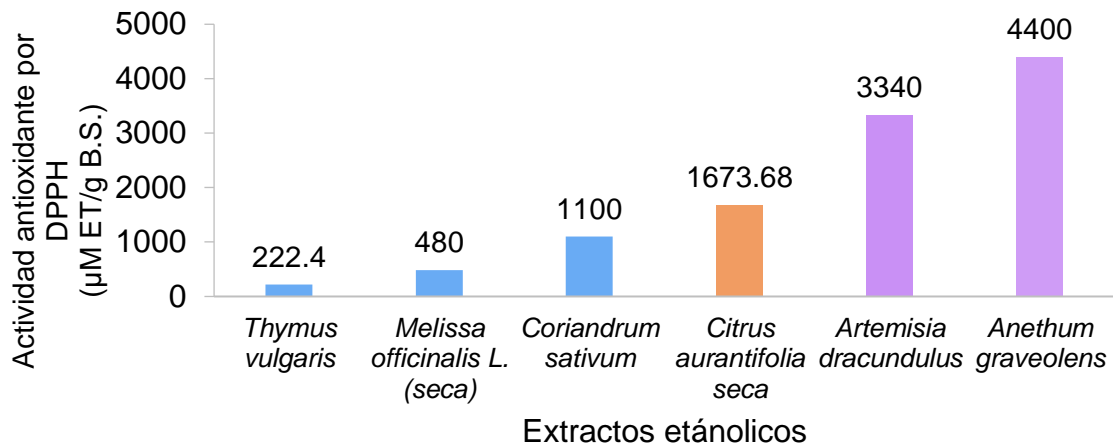


Figura 29. Actividad antioxidante por DPPH de extractos etanólicos de hojas secas.

También se calculó la actividad antioxidante de los extractos etanólicos en porcentaje de inhibición de DPPH, en la figura 30 se muestra dicha capacidad antioxidante comparada con los datos de referencias similares, se encontró que en muestras liofilizadas de cáscaras de cítricos, el porcentaje de inhibición de DPPH es ligeramente menor que el de las hojas de lima, por ejemplo, la actividad antioxidante de cáscara de lima es de 57.71% (Escobar, 2010), mientras que en este trabajo se encontró una inhibición de 89.56%, por otro lado, en muestras de canela liofilizada se ha reportado un 97.59% de inhibición (Castañeda *et al.*, 2008), siendo ligeramente mayor su capacidad antioxidante que el de las hojas de lima liofilizada.

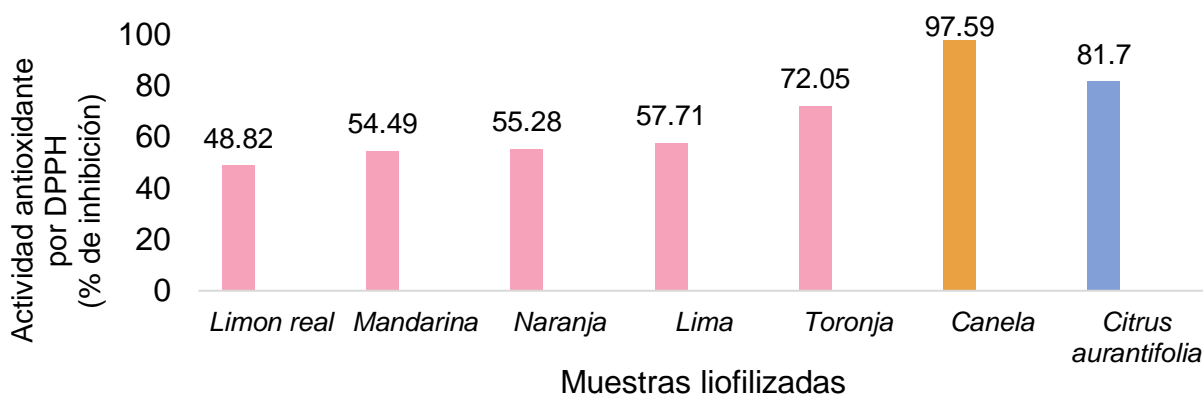
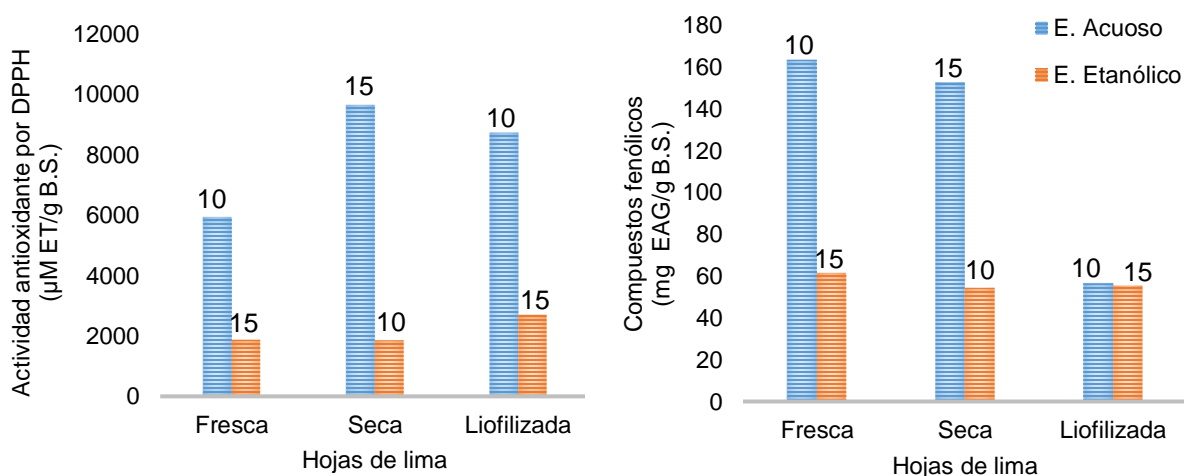


Figura 30. Actividad antioxidante en % de inhibición de DPPH en extractos etanólicos de diferentes muestras.

### 7.7. Selección de los sistemas de mayor actividad antioxidante y compuestos fenólicos

Con la finalidad de comparar los extractos acuosos y etanólicos para los tiempos de mayor extracción, se muestra en la figura 31 que para cada disolvente y para cada tratamiento de hoja de lima los extractos acuosos presentan mayor contenido de compuestos fenólicos y de actividad antioxidante (en la parte superior de la barra se muestra el tiempo al que se obtuvo la mayor extracción), esto debido a la solubilidad y disponibilidad de los compuestos bioactivos en agua, de forma general, en los extractos etanólicos se obtuvo cerca de una tercera parte de lo cuantificado en el extracto acuoso y como se muestra, su contenido está relacionado con la capacidad antioxidante que presentan.



*Figura 31, Sistemas de mayor extracción para compuestos fenólicos y actividad antioxidante.*

Con las determinaciones del contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, fue seleccionado el tiempo de óptima extracción para cada sistema de extracción (figura 32), es decir, de los extractos acuosos y etanólicos de cada grupo de hojas se eligieron los seis extractos mostrados en el cuadro 5; a dichos sistemas de extracción se les determinó la cantidad de flavonoides y clorofilas. Recordando que se mantiene la relación solido-disolvente de 2 g de muestra de hoja triturada en 50 mL de agua o etanol al 80%, es decir, 1:25 (en peso/volumen)

Cuadro 5. Selección del sistema de óptima extracción.

Hojas	Disolvente	
	Agua	Etanol al 80%
Frescas	10 min	15 min
Secas	15 min	10 min
Liofilizadas	10 min	15 min

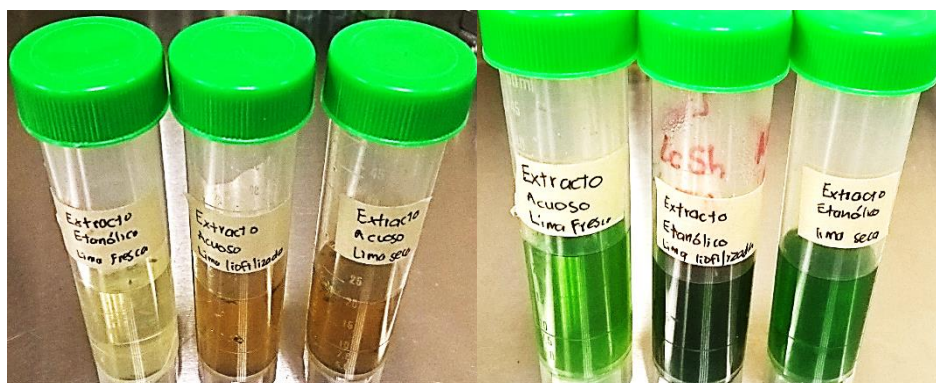


Figura 32. Extractos acuosos y etanólicos de mayor actividad antioxidante.

### 7.7.1. Determinación de flavonoides

A los extractos que presentaron mayor actividad antioxidante y de compuestos fenólicos se determinó la concentración de flavonoides, el resultado se reportó como mg EQ/g B.S., para esto se realizó la curva tipo de quercetina mostrada en la figura 33.

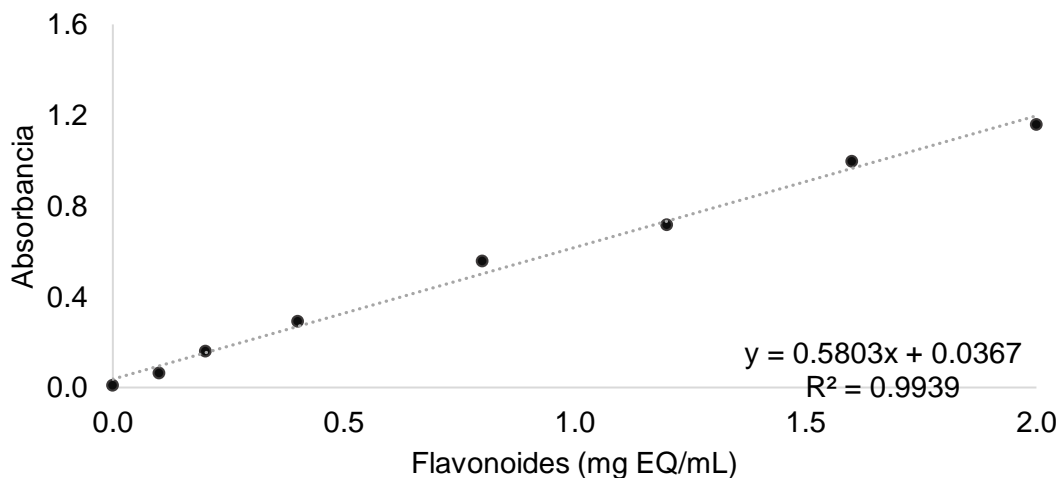
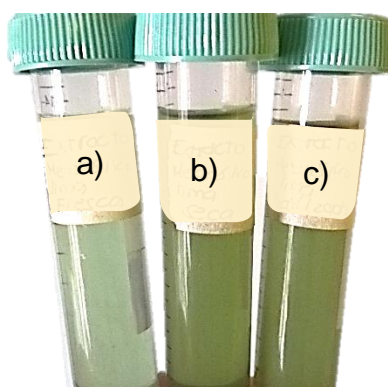


Figura 33. Curva tipo de quercetina.

La determinación de flavonoides en las hojas de lima se realizó con metanol acidificado al 1% con HCl 1N (Figura 34) para hidrolizar los enlaces éster de glicósidos en aglicones y liberar los compuestos polifenólicos unidos o atrapados a la matriz vegetal, debido a que el metanol destruye las membranas celulares permitiendo la extracción de este tipo de compuestos, además de provocar la despolimerización de compuestos de alto peso molecular a compuestos de estructura sencilla (Martínez, 2010; Mattila *et al.*, 2000; Vidal, 1997), siendo este el sistema de óptima extracción para flavonoides.



*Figura 34. Extractos metanólicos de hojas de lima; a) fresca, b) seca y c) liofilizada.*

### **Extractos acuosos y etanólicos**

De acuerdo con el análisis estadístico para el contenido de flavonoides ( $\alpha=0.01$ ), en el caso de las hojas resultaron valores de  $F=17.95$  y  $F_c=10.92$ , para los extractos acuosos  $F=87.77$  y para etanólicos  $F=153.42$ , siendo  $F_c=10.92$ , se observó una diferencia significativa en el contenido de flavonoides entre los extractos y hojas.

Durante la cuantificación de compuestos fenólicos se observó que los extractos acuosos presentaron mayor concentración que los extractos etanólicos, en la presente cuantificación de flavonoides se observa el mismo resultado (Figura 35), debido a que los flavonoides se caracterizan por ser compuestos polifenólicos solubles en agua, indicando que en los extractos acuosos este grupo de compuestos se encuentran en mayor proporción.



En contraste, el bajo contenido de flavonoides en los extractos etanólicos puede deberse a que el etanol al 80% empleado como disolvente no es acidificado, de tal forma que no se lleva a cabo la hidrólisis ácida ni la consecuente liberación y solubilización de flavonoides como en el caso del metanol acidificado, siendo más evidente en los extractos de hoja seca, ya que en el extracto metanólico se cuantificaron 4 veces más que en el etanólico. Por otro lado, el contenido de flavonoides en las hojas fue de aproximadamente 1.3 veces mayor que en los extractos acuosos. Con lo disertado, el extracto en el que se efectuó una óptima cuantificación de flavonoides fue en el acuoso de hojas secas a  $T_{amb}$  con un valor de 46.1 mg EQ/g B.S. el cual se obtuvo con un tiempo óptimo de extracción de 15 min.

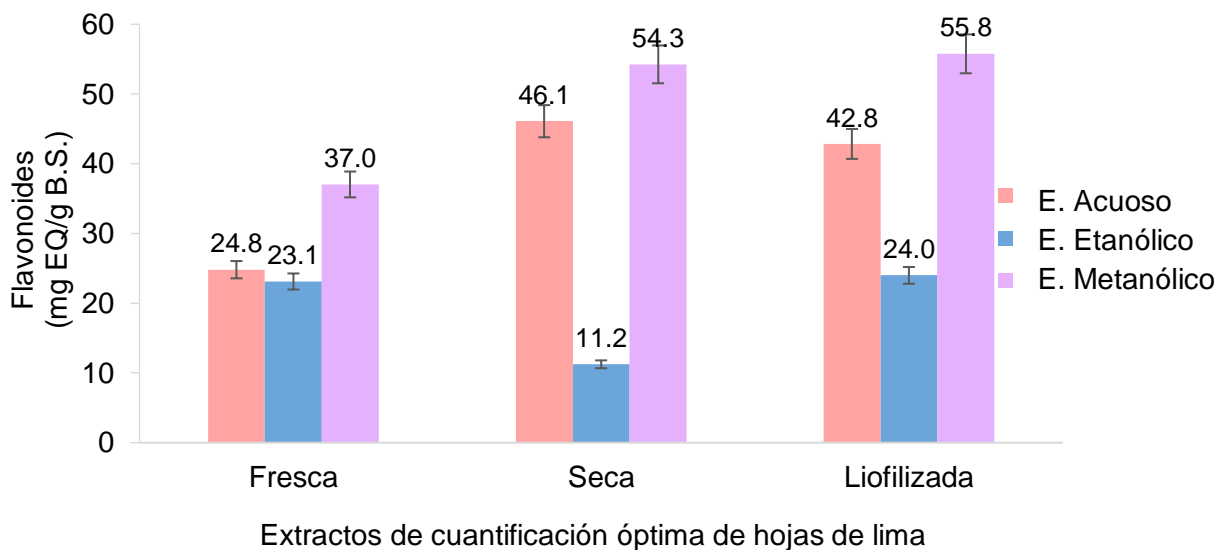


Figura 35. Cuantificación de flavonoides en extractos de hojas de lima.

Al comparar los resultados obtenidos con los reportados en té como se muestra en la figura 36, se puede observar que los extractos acuosos de *Citrus aurantifolia* Swingle de hoja seca y liofilizada tienen una cantidad alrededor de 55 veces mayor que los reportados en extractos similares. En el caso del extracto acuoso de hoja seca se determinaron 46.1 mg EQ/g B.S. y para la hoja liofilizada 42.8 mg EQ/g B.S., mientras que en extractos acuosos de diferentes variedades de naranja se han reportado valores entre 0.51 y 1.46 mg EQ/g B.S. (Lagha-Benamrouche y Madani, 2013).

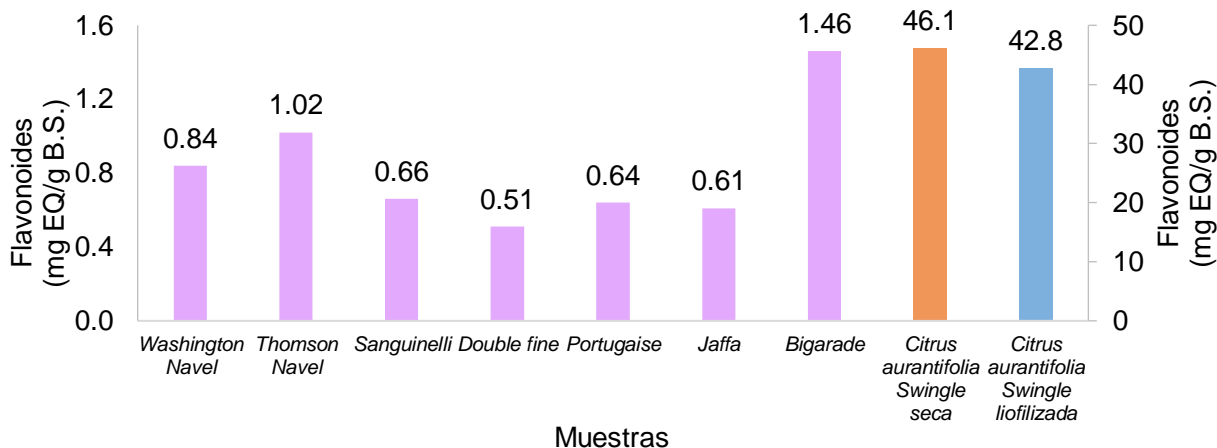


Figura 36. Contenido de flavonoides en extractos.

Por otro lado, en un extracto de hojas frescas de *Passiflora quadrangularis* con etanol al 70% se ha reportado un contenido de flavonoides de 11.76 mg EQ/g B.S. (Muñoz, 2016)., mientras que, en este trabajo, en el extracto de hojas frescas de lima con etanol al 80% se encontró un valor superior de 23.1 mg EQ/g B.S., es decir, alrededor de 2 veces mayor de *P. quadrangularis*. El contenido de flavonoides en hojas de lima se puede comparar con el reportado en un extracto de semillas de calabaza en acetato de etilo, donde se cuantificaron 54.74 mg EQ/g B.S. en *Cucurbita mixta* Pangalo y 52.77 mg EQ/g B.S. en *Cucurbita maxima* Duchesne (Valenzuela *et al.*, 2014), mientras que, en este trabajo en las hojas secas de lima se encontraron 54.3 mg EQ/g B.S. y en hojas liofilizadas 55.8 mg EQ/g B.S., en este caso sí se encuentra dentro de la magnitud esperada para el contenido de flavonoides. Por lo tanto, los resultados dependerán de la especie vegetal y el disolvente empleado para la extracción, entre otros factores.

Generalmente el contenido de flavonoides en el fruto es poco estudiado ya que es menor su concentración y se reduce aún más durante su desarrollo, sin embargo, la determinación de los flavonoides se realiza en las hojas de los vegetales, ya que aquí es en donde se encuentran principalmente debido a que se encuentran expuestas a la radiación UV y la planta produce dichos metabolitos como un mecanismo de protección y defensa ante los depredadores, hongos y bacterias (Vargas *et al.*, 2006), una alta

concentración de flavonoides en las hojas de lima indica que éstas han sido expuestas a una elevada radiación solar, debido a que las hojas son la parte de la planta que más recibe la radiación por su amplia área de transferencia y su alta eficiencia de interceptación, además aquí es en donde se realiza la fotosíntesis y producción de clorofila (Muñoz, 2016).

#### *7.7.2. Determinación de clorofilas*

La clorofila es un compuesto fitoquímico esencial para la mayoría de los organismos fotosintéticos, debido a que es la molécula más eficiente encontrada en la naturaleza para la captación y recolección de la luz que después se libera en forma de energía química, en ello radica la importancia de la cuantificación de clorofila en hojas de lima mexicana, para esto se empleó acetona al 80% debido a que los pigmentos clorofílicos son insolubles en agua, pero sí son solubles en disolventes orgánicos como la acetona que además inhibe a la enzima clorofilasa, responsable de la hidrólisis de las clorofilas a y b y sus correspondientes clorofilidas (Sommer-Marquez, 2013).

Para este análisis, se determinó que si hay diferencia significativa en el contenido de clorofilas entre las tres muestras de hojas con valores de  $F=32.18$  y  $F_c=10.92$ , para los extractos acuosos con valores de  $F=98.32$  y  $F_c=10.92$ , mientras que para los etanólicos  $F=106.07$  y  $F_c=10.92$ .

La cuantificación de clorofila a, b y total en los tres grupos de hojas de lima se muestra en la figura 37, se observa que fue mayor la cantidad extraída de clorofila total en las hojas liofilizadas con un valor de 2.03 mg/g B.S., seguida de las hojas frescas con 1.6 mg/g B.S. y las hojas secas a  $T_{amb}$  en menor cantidad con 1.07 mg/g B.S.

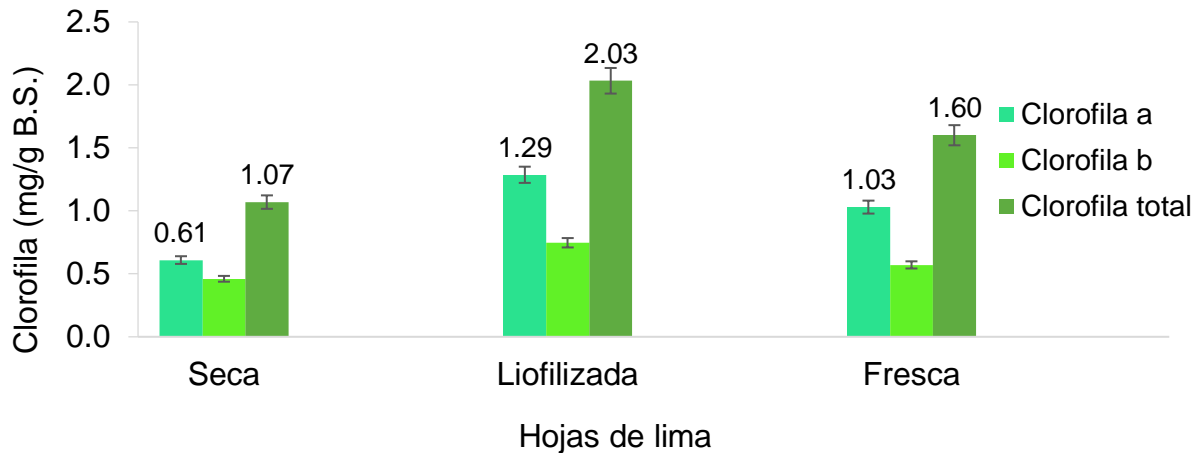


Figura 37. Contenido de clorofila en hojas de lima mexicana.

Durante la liofilización se concentran y conservan algunos compuestos bioactivos que confieren color y aroma a las hojas de lima como la clorofila en este caso, mientras que durante el proceso de secado a  $T_{amb}$  se observó una coloración verde opaca, lo cual se puede adjudicar a la degradación de la clorofila a feofitina, que se puede dar durante el almacenamiento prolongado (Barreiro y Sandoval, 2006). En la figura 38 se muestra el diagrama general de la degradación de clorofila, en donde se muestra como el color verde de las hojas se convierte en un color verde oliva.

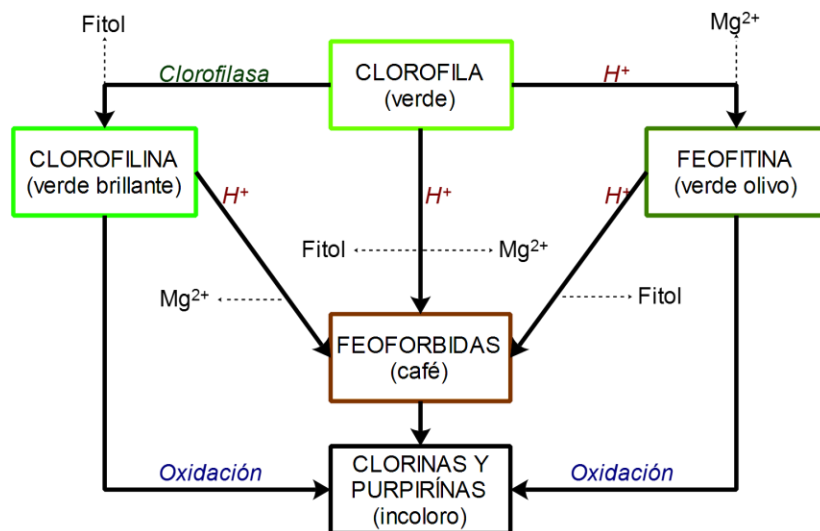


Figura 38. Esquema de degradación de clorofila (Jara C., 2013).

En estudios reportados para hojas frescas de limón se encontraron los siguientes valores, para clorofila a se determinaron valores de alrededor de 0.46 mg/g B.S., en clorofila b 0.43 mg/g B.S. y en clorofila total de 0.89 mg/g B.S. (Pérez, 2013), mientras que en este trabajo se obtuvieron 1.03 mg/g B.S. para clorofila a, 0.571 mg/g B.S. para clorofila b y 1.601 mg/g B.S. para clorofila total, se puede observar que los valores de clorofila a y total en hojas de lima mexicana son hasta 2 veces mayores que los reportados para las hojas de limón.

### Extractos acuosos

En el caso de los extractos acuosos como se muestra en la figura 39, la cantidad de clorofila obtenida fue muy baja comparada con la que se encuentra en las hojas, ya que el extracto de hoja seca contiene el 1.55% y el extracto de hoja liofilizada solo el 0.75% de la clorofila total contenida en las respectivas hojas, esto se debe a su baja solubilidad en agua ya mencionada anteriormente, para el caso de las hojas frescas fue tan baja la concentración de clorofila que no se logró detectar por este método espectrofotométrico, en contraste, de acuerdo a las determinaciones anteriores en cuanto a la concentración de compuestos fenólicos, se observó que los extractos acuosos eran los óptimos para obtener una mayor concentración, pero, se ha demostrado que no lo son para la extracción de clorofilas, en dichos resultados se puede diferenciar la selectividad de cada disolvente por ciertos compuestos en específico.

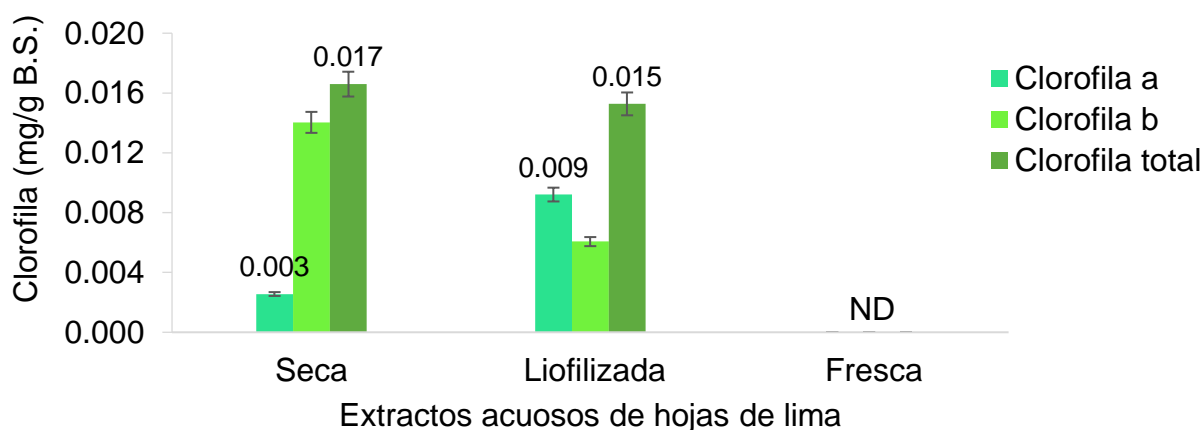


Figura 39. Contenido de clorofila en extractos acuosos de hojas de lima.

## Extractos etanólicos

El extracto etanólico con mayor cantidad de clorofila total es el extracto de hoja liofilizada con 0.230 mg/g B.S., seguido del extracto de hoja fresca con 0.216 mg/g B.S. y por último el de hoja seca con 0.198 mg/g B.S. (Figura 40), es decir, los extractos etanólicos permiten obtener entre un 12 y 19% de la clorofila total que se encuentra en las respectivas hojas, no obstante, esta cantidad es alrededor de 10 veces mayor que la que se determinó en los extractos acuosos, de tal forma que, los extractos etanólicos resultan ser más efectivos en cuanto a la extracción de clorofila total, debido a su solubilidad en el etanol al 80%.

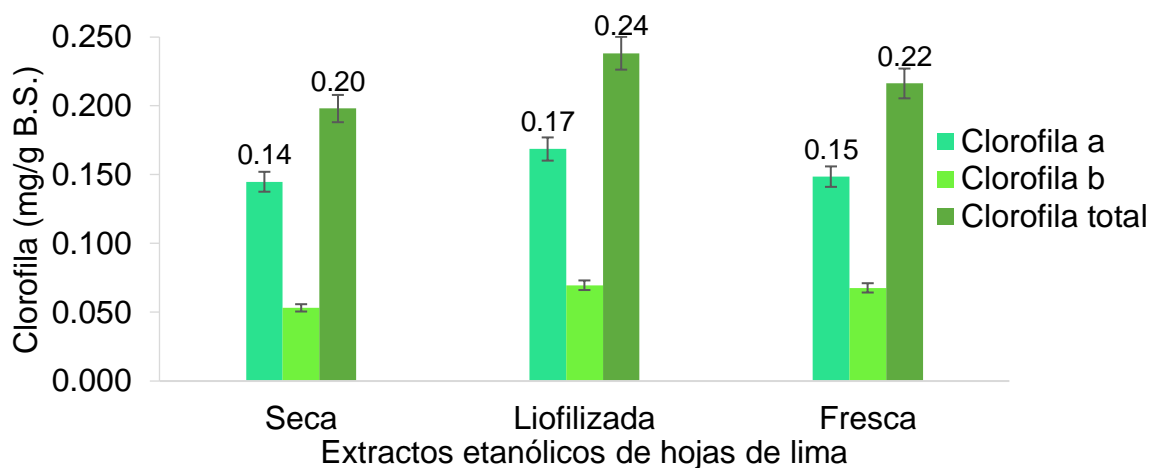


Figura 40. Contenido de clorofila en extractos etanólicos de hojas de lima.

### 7.7.3. Cuantificación de cafeína

La determinación de cafeína se realizó solamente en los dos extractos que presentaron mayor actividad antioxidante y contenido de compuestos fitoquímicos, es decir, a los extractos acuosos de hojas secas y liofilizadas con un tiempo de extracción de 15 y 10 min respectivamente, para esto se realizó una extracción líquido-líquido del extracto con diclorometano como se muestra en la figura 41.



Figura 41. Extracción de cafeína con diclorometano.

La importancia del estudio de la cafeína en los extractos realizados se debe a que este compuesto es el estimulante más empleado, el cual se extrae fácilmente de las semillas tostadas del café y de las hojas de vegetales con agua caliente ya que es soluble en agua, el café contiene entre 1 y 2% de cafeína y el té de 2 a 3%. Por otro lado, el efecto fisiológico a través del cual actúa la cafeína aún no se comprende por completo, sin embargo, se sabe que estimula el sistema nervioso central desarrollando estado de alerta (Durst y Gokel, 2007). Por otra parte, también es importante mencionar algunos riesgos de su consumo, ya que puede producir nerviosismo, desasosiego, insomnio, temblores y es adictiva, pues la interrupción de su consumo de forma repentina puede producir dolores de cabeza, fatiga, irritabilidad y trastornos gastrointestinales (Wilmore y Costil, 2007). Para la cuantificación se realizó la siguiente curva tipo de cafeína.

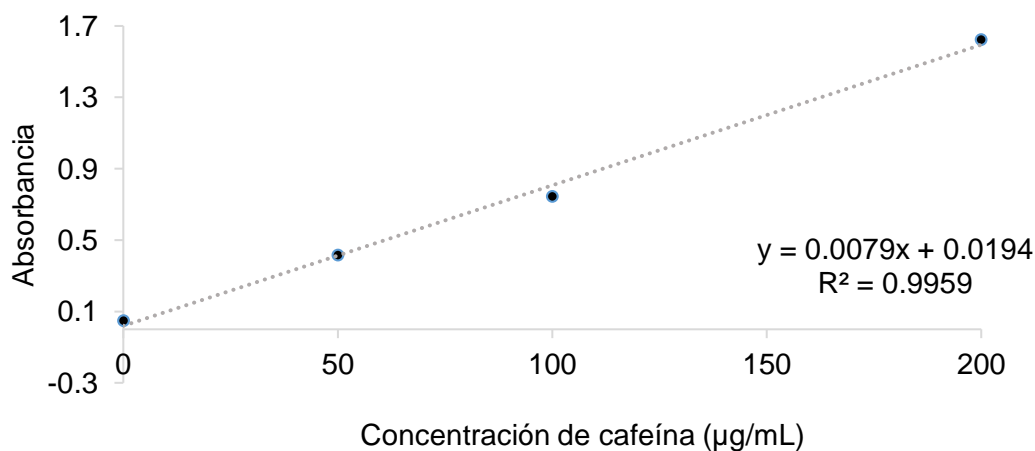


Figura 42. Curva tipo de cafeína.

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 6, siendo el extracto acuoso de hoja de lima liofilizada el que contiene mayor cafeína con 0.910 mg/g muestra B.S. a diferencia del extracto de hoja seca con 0.843 mg/g muestra B.S. La cafeína se encuentra dentro de los compuestos no volátiles que se extraen con agua a ebullición, por lo tanto, el método de liofilización aplicado a las hojas promueve su concentración y conservación, de tal forma que en el extracto de hoja seca a  $T_{amb}$  se obtuvo un 8% menos de cafeína que en el de hoja liofilizada.

Cuadro 6. Contenido de cafeína en extractos de hoja de lima.

Extracto acuoso	Contenido de cafeína (mg/g muestra B.S.)
Hoja seca con 15 min en ebullición	0.843
Hoja liofilizada con 10 min en ebullición	0.910

Comparando los resultados obtenidos con los reportados en diversas infusiones, se observa en la figura 43 que los resultados de este trabajo se encuentran dentro de la magnitud reportada para diversas muestras, por un lado, tiene un menor contenido que las hojas de *Tilia cordata* con 5.25 mg/100 mL, pero es ligeramente superior al contenido de cafeína en hojas de *Mentha piperita* L. siendo de 2.53 mg/100 mL (Farcas *et al.*, 2013).

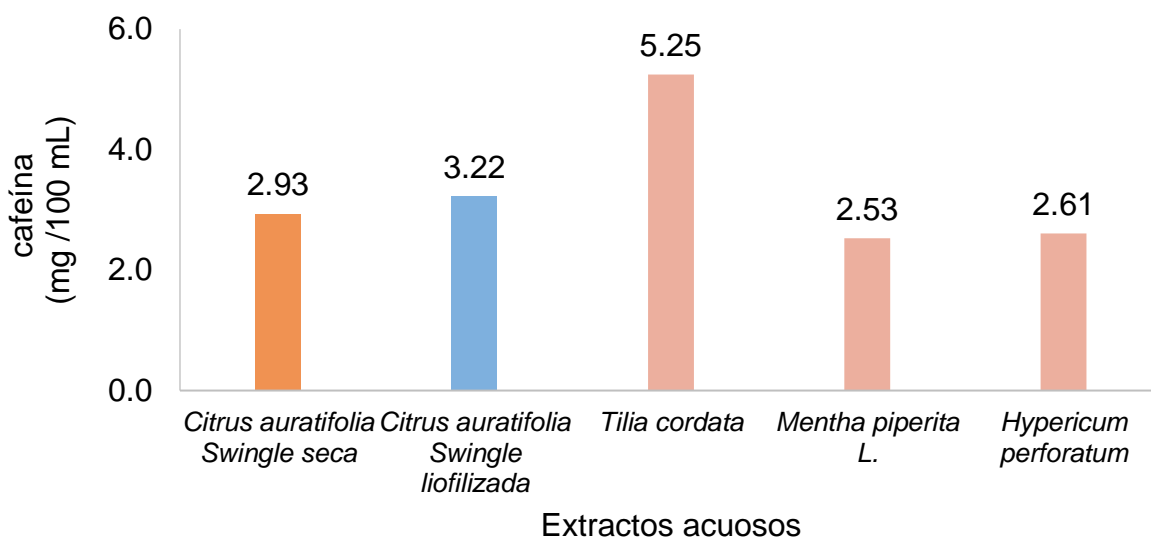


Figura 43. Contenido de cafeína en extractos acuosos.



El Congreso Americano de Obstetras y Ginecólogos recomienda para las embarazadas consumir hasta 200 mg de cafeína al día, la Clínica Mayo recomienda para el público en general de 200 a 300 mg de cafeína al día, pero de 500 a 600 mg al día pueden causar una serie de problemas de salud, siendo que, en las personas con insuficiencia hepática y personas que toman medicamentos que inhiben la enzima CYP1A2 (enzima cuya función es la eliminación de cafeína en el cuerpo humano) pueden tener un umbral de seguridad aún más bajo (Hernandez, 2017). Por lo anterior era importante determinar los niveles de cafeína que se obtienen en las decocciones de hoja de lima para no exceder los límites recomendados.

## 8. CONCLUSIONES

- En el análisis de compuestos por espectrofotometría UV-VIS se destacan los ácidos fenólicos y clorofilas como compuestos mayoritarios según los máximos de absorción identificados.
- La cuantificación de compuestos fenólicos indicó que se realiza una óptima extracción en los extractos acuosos de hojas secadas a temperatura ambiente con un tratamiento térmico de 15 min.
- La actividad antioxidante se determinó en los extractos, siendo el extracto acuoso de hojas secadas a temperatura ambiente el que presentó mayor actividad a un tiempo de 15 min.
- Se realizó la cuantificación de flavonoides en hojas y extractos de lima mexicana, siendo las hojas liofilizadas las que presentaron mayor contenido de dichos compuestos, en el caso de los extractos fue el acuoso de hoja de lima seca con 15 min en ebullición.
- La cuantificación de clorofilas en hojas de *Citrus aurantifolia* Swingle indicó que las hojas liofilizadas son las que presentaron mayor concentración y en los extractos fue el etanólico de hoja liofilizada con un tiempo en ebullición de 15 min.
- La cuantificación de cafeína indicó que el extracto con mayor contenido es el acuoso de hoja liofilizada con un tiempo de ebullición de 10 min.
- De acuerdo con el contenido de compuestos fitoquímicos y capacidad antioxidante se recomienda realizar una extracción acuosa de hojas secadas a temperatura ambiente con un tratamiento térmico a ebullición durante 15 min para obtener los mayores beneficios posibles al consumirlo.

## 9. REFERENCIAS

### Artículos científicos

Abdallah E. (2016). Preliminary phytochemical and antibacterial screening of methanolic leaf extract of *Citrus aurantifolia*. International Journal of Current Research. 1: 01-05.

Adina A. B., Goenadi F. A., Handoko F. F., Nawangsari D. A., Hermawan A., Jenie R. I. and Meiyanto E. (2014). Combination of ethanolic extract of *Citrus aurantifolia* peels with Doxorubicin modulate cell cycle and increase apoptosis induction on MCF-7 cells. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR. 13(3): 919–926.

Akinnibosun F. and Edionwe O. (2016). Evaluation of the Phytochemical and Antimicrobial potential of the Leaf Extracts of *Bryophyllum pinnatum* L. and *Citrus aurantifolia* Sw. and their Synergy. Journal of Applied Sciences and Environmental Management. 19(4): 611-619.

Al-Mustafa A. H. and Al-Thunibat O. Y. (2008). Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. *Pak J Biol Sci.* 11(3): 351-358.

Andarwulan N., Batari R., Sandrasari D. A., Bolling B. and Wijaya H. (2010). Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food chemistry.* 121(4): 1231-1235.

Asami D. K., Hong Y. J., Barrett D. M. and Mitchell A. E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51(5): 1237-1241.

Avello M. y Suwalsky M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción).* (494): 161-172.

Avilán L., Dorantes J. y Rodríguez M. (1998). Descripción de las limas y limones de la colección del centro nacional de investigaciones agropecuarias. *Agronomía Tropical.* 48(1): 41-52.

Brand W., Cuvelier M. and Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 28(1): 25-30.

Cabrera S. A., Sandoval A. P. y Forero F. (2014). Potencial antioxidante y antimicrobiano de extractos acuosos e hidroalcohólicos de granadilla (*Passiflora ligularis*). *Acta Agronómica*. 63(3): 01-11.

Castañeda B. C., Llica E. R. y Vasquez L. I. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horizonte Médico*. 8(1), 56-72.

Chizzola R., Michitsch H. and Franz C. (2008). Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56(16): 6897-6904.

Choi H., Song H., Ukeda H. and Sawamura M. (2000). Radical-Scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(9): 4156–4161.

Cuellar G. and Guerrero A. (2012). Antibacterial activity of the cacao bean husk, *Theobroma cacao* L. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia Córdoba*: 17(3): 3176-3183.

Dirección General de Normas (DGN). (1982). NMX-F-428-1982, Foods: Determination of Moisture (Thermobalance Rapid Method). Normas Mexicanas, México.

Drago M., López M. y Sainz T. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(4): 58-68.

Ekundayo O., Bakare O., Adesomoju A. and Stahl-Biskup E. (1991). Volatile constituents of the leaf oil of Nigerian Lime (*Citrus aurantifolia*). *Journal of Essential Oil Research*. 3(2): 119-120.

Faraldos M. y Goberna C. (2011). Técnicas de análisis y caracterización de materiales. CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas: 51-108.

Farcas A. C., Socaci S. A., Tofana M., Muresan C., Cuceu A., Salanța L. y Pop A. (2015). Comparative Evaluation of Biofunctional Compounds Content from Different Herbal Infusions. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*. 72(2).

Fauron R. (1994). Galénica y fitoterapia: aspectos cualitativos. *Natura Medicatrix: Revista médica para el estudio y difusión de las medicinas alternativas.* (37): 54-60.

García, A. Á. y Carril E. P. U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca(biología).* 2(3): 119-123.

Girón J., Martínez A., Hurtado L., Cuaran J. y Ocampo Y. (2017). Pigmentos vegetales y compuestos naturales aplicados en productos cárnicos como colorantes y/o antioxidantes: revisión. *Revista Inventum.* (21): 51-62.

Guevara L., Armaro M., Fariñas M., Bermudez R. y Regnault H. (2016). Bioactividad de las esponjas marinas *Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali* provenientes de Isla Larga, Bahía de Mochima, Estado Sucre, Venezuela. *Ciencia Unemi.* 9(20): 19-28.

Gutiérrez Y. I., Miranda M., Henriques A. y del Barrio G. (2010). Análisis de flavonoides en una fracción butanólica obtenida de *Phyllanthus orbicularis* HBK. *Revista Cubana de Farmacia.* 44(3): 367-373.

Haiat S. y Bucay J. (2009). Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma. *Anales de Otorrinolaringología.* 54(4): 145-171.

Huang B. and Prior R. L. (2005). The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Agriculture Food Chem.* 53(6): 1841 - 1857.

Illesca J., Bacho O. y Ferrer S. (2008). *Frutas y Hortalizas, guía práctica.* Mercasa: 107-108.

Jantan I., Said A., Ahmad A., Ali N. and Norsiha A. (1996). Chemical composition of some citrus oils from Malaysia. *Journal of Essential Oil Research.* 8(6): 627-632.

Jenway Application note A09-010A. (2014). The quantitative determination of caffeine in beverages and soft drinks using UV wavelength spectroscopy.

Kim D., Lee K., Lee H. and Lee C. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50(13): 3713-3717.

Kuskoski E., Asuero A., Troncoso A., Mancini-Filho J. y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas).* 25(4): 726-732.

Lagha-Benamrouche S. and Madani K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: peels and leaves. *Industrial Crops and Products*. 50: 723-730.

Lawal O. A., Ogunwande I. A., Owolabi M. S., Giwa-Ajeniya A. O., Kasali A. A., Abudu F. A. and Opoku A. R. (2014). Comparative analysis of essential oils of *Citrus aurantifolia* Swingle and *Citrus reticulata* Blanco from two different localities of Lagos State, Nigeria. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. 2(2): 08-12.

Lin J. T., Chen Y. C., Lee Y. C., Hou C. W. R., Chen F. L. and Yang D. J. (2012). Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *LWT-Food Science and Technology*. 49(1): 1-7.

Lino A., Magaly K. and Herrera J. L. (2015). Evaluación de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del extracto de tres variedades de flor de mastuerzo (*Tropaeolum majus*). 81(4): 327-329.

Loizzo M. R., Tundis R., Bonesi M., Menichini F., De Luca D., Colica C., and Menichini F. (2012). Evaluation of *Citrus aurantifolia* peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(15): 2960-2967.

Mariutti L. R. B., Barreto G. P. D. M., Bragagnolo N. y Mercadante A. Z. (2008). Free radical scavenging activity of ethanolic extracts from herbs and spices commercialized in Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51(6): 1225-1232.

Martínez A. (1996). Aceites esenciales. *Journal Nature Prod*. 59(1): 77-79.

Martínez A. R., Munguía A. R. and Inungaray M. L. C. (2017). Evaluation of antioxidant properties of neem extract (*Azadirachta indica*). *National Congress of Biotechnology and bioengineering*: 01.

Martínez N., Arévalo K., Verde M., Rivas C., Oranday A., Núñez A. y Morales Ma. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schldl (zarzamora). *Universidad Autónoma de Nuevo León*. 42(4): 66-71.

Martínez-Valverde I., Periago M. J. and Ros G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 50(1): 05-18.

Mattila P., Astola J. y Kumpulainen J. (2000). Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(12): 5834-5841.

Mejía S., Castillo J. y González J. (2015). El limón en Acapulco, Guerrero: un recurso potencial de riqueza. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas: 307-311.

Muñoz C. W., Chavez R. W., Pabón L., Rendón F. M., Patricia-Chaparro M. and Otálvaro-Álvarez A. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). Revista CENIC. Ciencias Químicas. 46: 38-46.

Núñez M. B., Sosa A. D. C., Aguado M. I. y Raisman J. S. (2006). Caracterización de extractos fluidos de *Lippia turbinata* Griseb. Universidad Nacional del Nordeste: 01-03.

Otero M., Arrieta R., Cabrera G., Illescas H. y Ortega J. (2017). Efectos de la refrigeración sobre el contenido de fenoles y actividad antioxidante presente en especies de nopal: *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-dyck y Nopal *Opuntia ficusindica*. Educación y Salud Boletín Científico de Ciencias de la Salud del ICSa. 5(9).

Paulino C., Kessler A., Ochoa M. y De Michelis A. (2013). Compuestos bioactivos en frutas pequeñas de la Patagonia Argentina: efecto del solvente de extracción en su determinación cuantitativa. Revista Reciteia. 12(2): 08-22.

Pérez V., Lugo E., Gutiérrez M., y Del Toro C. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. Biotecnia. 15(3): 18-22.

Poulose S., Harris E. and Patil B. (2005). Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. The Journal of Nutrition. 135(4): 870-877.

Ramírez M., Rodríguez O., Hernández O., Chel L. y Aguilar M. (2017). Estudio de la actividad hipoglucemiante y antioxidante de tronadora, wereque y raíz de nopal. Omnia Science Monographs: 143-152.

Reyes S. R., Casanova E. V., Romero D. R., Burgos K. C., Villacampa K. V. y Casas V. G. (2014). Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos de diferente grado alcohólico del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. mano de oso. *Pharmacencia*. 2(2): 72-78.

Santhanakrishnan D., Shankar S. and Chandrasekaran B. (2014). Studies on the phytochemistry, spectroscopic characterization and antibacterial efficacy of *Salicornia brachiata*. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 6: 430-432.

Sepúlveda G., Porta H. y Rocha, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3): 355-363.

Silva C., Gomes V., Kulkamp I. and Kanis, L. (2008). Ultraviolet spectroscopy method for coumarin quantification in *Mikania glomerata* Sprengel syrup. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(4): 594-599.

Socaci S. A., Farcas A., Tomele C., Salanta L., Varva L. and Tofana M. (2013). Characterization of Black and Green Tea from Local Market. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca: Food Science and Technology*. 70(2): 149-150.

Sunday O., Oladejo I., Smart M., Sotonye I., Musa M. and Folorunsho S. (2015). Ethnomedical importance of *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle. *The Pharma Innovation Journal*. 4(8): 01-06.

Val J., Heras L. y Monge E. (1985). Nuevas ecuaciones para la determinación de pigmentos fotosintéticos en acetona. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei*. 17: 231-238.

Valenzuela G. M., Soro A. S., Tauguinas A. L., Gruszycki M. R., Cravzov A. L., Giménez M. C. y Wirth A. (2014). Evaluación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante en extractos de Cucurbita spp. *Open Access Library Journal*. 1(03): 1-6.

Vargas D., Soto M., González V., Mark E. y Martínez Á. (2006). Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.). *Agrociencia*. 40 (1): 109-115.



Vashisth T., Singh R. K. and Pegg R. B. (2011). Effects of drying on the phenolics content and antioxidant activity of muscadine pomace. *LWT-Food Science and Technology*. 44(7): 1649-1657.

Wojdylo A., Oszmiański J. y Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*. 105(3): 940-949.

Wong S. P., Leong L. P. y Koh J. H. W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food chemistry*. 99(4): 775-783.

Zuzarte M., Martins A., Goncalves M. and Salgueiro L. (2006.) Mycotoxins contamination in food: alternative plant preservatives, Legislation and detection methods. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*: 01-27.

## Tesis

Calle S. y Rojo A. (2011). Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales (tesis de licenciatura). Universidad Politécnica de Cataluña: 29-104.

Castillo C. y Javier H. (2015). Diseño, elaboración, y caracterización de Micropartículas de SEMDDS (sistemas de liberación de fármacos auto-microemulsionables) cargadas con los alcaloides totales de *Banisteriopsis caapi* (tesis de licenciatura). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo: 23-41.

Cedeño C. (2016). Efecto del almacenamiento y envasado sobre las características de la calidad funcional del brócoli (*Brassica oleracea* L.) (tesis de licenciatura). Universidad Miguel Hernández de Echele: 25-36.

Domínguez V. (2015). Actividad anti-giardia *in vitro* de los compuestos de *Foeniculum vulgare* y *Citrus aurantifolia* (tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León: 27-90.

Escobar M. (2010). Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México (tesis de licenciatura). Instituto Politécnico Nacional: 29-44.

Gómez M. (2015) Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos de la dieta. Estudios de transporte *in vitro* y de biodisponibilidad en humanos (tesis de doctorado). Universidad Complutense de Madrid: 89-103.

Iglesias D. (2012). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de hojas de Citrus spp. frente a hongos fitopatógenos de *Lycopersicon esculentum* Mill (tesis de licenciatura). Universidad Central Marta Abreu de Las Villas: 35-39.

Jara C. (2013). Estabilidad de pigmentos antioxidantes del jugo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) como potencial complemento de alimentos funcionales (tesis de licenciatura). Universidad Austral de Chile. 8-11.

Jaramillo D. (2016). Estudio de la actividad acaricida *in vitro* del extracto acetónico de *Gliricidia sepium* sobre *Rhipicephalus microplus* (tesis de maestría). Universidad La Salle: 23-50.

Jayaprakash R. (2009). Studies on isolation and characterization of bioactive compounds in lime [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle], their antioxidant and anticancer properties (Bachelor thesis). UAS Dharwad: 08-110.

Martínez S. A. (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación (tesis de doctorado). Universidad Complutense de Madrid: 6-15.

Martos M. (2016). Aprovechamiento de subproductos de vinificación. Evaluación del potencial biológico de la semilla de uva (tesis de licenciatura). Universidad de Sevilla: 23-25.

Montoliu A. (2010). Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico, Aspectos comunes y específicos (tesis de doctorado). Universidad Jaume de Castellón: 03-08.

Muñoz D. I. (2016). Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de hojas y flores de *Passiflora quadrangularis* (tesis de licenciatura). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo: 50-51.

Pérez J. (2013). Evaluación de la adición de vermicomposta y hongos micorrízicos en el crecimiento de plántulas de limón (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional: 63-69.

Ronquillo de Jesús E. (2013). Estudio de la actividad antioxidante y toxicológica de diferentes extractos de plantas medicinales (tesis de doctorado). Instituto Politécnico Nacional: 33-51.

Sommer-Marquez A. E. (2013). Retención de clorofila en Hidrotalcitas (tesis de doctorado). Ecole nationale supérieure de Chimie: 21-225

Tarín M. (2015). Evaluación de la calidad funcional de extractos de mora y fresa liofilizada. (Tesis de licenciatura). Universidad Politécnica de Valencia: 08-10.

Vida M. (1977). Estudio de flavonoides en líneas de selección de *Dianthus caryophyllus L* (tesis de doctorado). Universidad de Barcelona: 100-104.

Vizuite D. (2012). Evaluación nutritiva y nutraceútica de la mora de castilla (*Rubus glaucus*) deshidratada por el método de liofilización y comparación con la obtenida por deshidratación en microondas y secador en bandejas (tesis de licenciatura). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo: 51-61.

## Libros

Barreiro J. A. & Sandoval A. J. (2006). Degradación de clorofilas. En: Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Editorial, Equinoccio. Venezuela: 44-45.

Bello J. (2000). Mecanismos implicados en la separación de agua de un alimento. En: Ciencia bromatológica, principios generales de los alimentos. Editorial, Díaz de Santos. Equinoccio: 435-438.

Durst H.D. y Gokel G.W. (2007). Química de los productos naturales. En: Química orgánica experimental. Editorial, Reverté. España: 399-407.

Gutiérrez J. (2012). Compuestos con actividad antioxidante. En: Calidad de vida, Alimentos y Salud Humana: Fundamentos científicos. Editorial, Ediciones Díaz de Santos. España: 304-310.

Khan M., Al-Yahyai R. and Al-Said F. (2017). Systematic classification, distribution and botany. In: The Lime: Botany, Production and Uses. Editor: Khan M. Editorial, CABI. United Kingdom: 12-36.

López M. J. (2008). Etapas del proceso de liofilización. En: Estudio de tres diferentes métodos de preparación y conservación de la membrana amniótica para usos oftalmológicos. Editorial, Universidad de Santiago de Compostela. España: 59-61.

Marcado D. y Hasegawa M. (2002). Productos naturales. Una visión general. En: Fitoquímica orgánica. Venezuela: 33-34.

Parzanese M. (2017). Tecnologías para la industria alimentaria, liofilización de alimentos. Argentina: 1-12.

Patiño J. (2000). Lecciones de cirugía. Ed. Médica Panamericana: 141-154.

Paz M. (2005). Guía de uso de secaderos solares para frutas, legumbres, hortalizas, plantas medicinales y carnes. UNESCO. Paraguay: 8-10.

Waksmundzka-Hajnos M., Kowalska T. and Sherma J. (2008). Application of HPLC in the analysis of phenols, phenolic acids, and tannins. In: High performance liquid chromatography in phytochemical analysis. Editor: Waksmundzka-Hajnos M. and Sherma J. Editorial, Taylor and Francis Group. Unites States of America: 501-508.

Wilmore J.H. y Costil D.L: (2007). Fisiología del esfuerzo y del deporte. Editorial, Paidotribo. España: 517.

## **Páginas web**

Biblioteca digital. (2009). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana//*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle. México: Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. Recuperado de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Citrus%20aurantifolia&id=7410>

CCO. (2017). La foto libre de alta resolución de árbol. *Pxhere*. Recuperado de [/es/photo/963934](https://www.pxhere.com/photo/963934).

ChemSpider. (2017). Search and share chemistry. ChemSpider. Recuperado de <http://www.chemspider.com/>.

Dreamstime. (2018). Structural chemical formulas of plant chlorophylls. Recuperado de <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-structural-chemical->

formulas-plant-chlorophylls-pigments-d-illustration-vector-isolated-white-background-image42490528.

Hernández M. V. (2017). Contenido de cafeína en el té. Escuela española del té. Recuperado de <http://delendaestcarthago.com/escuelaespanolate/blog/contenido-de-cafeina-en-el-te/>.

Hernández R. (2014). Fotosíntesis. Venezuela: Libro Botánica Online. Recuperado de <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/fotosintesis/>.

## 10. ANEXO 1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Etanol al 80%

En un recipiente limpio se vierten 80.4 mL de etanol y se agregan 19.6 mL de agua destilada por cada 100 mL de solución.

- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7%

Pesar 7 g de carbonato de sodio con una pureza de 99.9-100% y agregar 93 mL de agua destilada por cada 100 mL de esta solución que se requieran.

- Metanol al 80%

Se colocan con 80.08 mL una pureza de 99.9% en un contenedor y agregar agua destilada hasta completar un volumen de 100 mL.

- Radical ABTS<sup>+</sup>

En un matraz aforado de 10 mL colocar 0.0154 g de peroxidisulfato de potasio y 0.0264 g del reactivo de ABTS. Aforar y agitar vigorosamente. Se debe permitir que se desarrolle el radical y que se estabilice guardando la solución en refrigeración durante 16 horas.