

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA CÁSCARA DE LIMA (*Citrus limetta* Risso) Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM LIME PEEL (*Citrus limetta* Risso)
AND ANTIOXIDANT ACTIVITY DETERMINATION

Pérez-Nájera VC^{1,2}, Lugo-Cervantes EC², Gutiérrez-Lomelí M¹ y Del-Toro-Sánchez CL^{1*}

¹Centro Universitario de la Ciénega. Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115, Ocotlán, Jalisco, México. | ²Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Normalistas 800. Guadalajara, Jalisco, México.

RESUMEN

Los desechos que se tienen de la obtención de jugos son principalmente cáscara y bagazo, sin embargo son una buena fuente de compuestos fenólicos, mayoritariamente de flavonoides. El objetivo de este trabajo fue extraer y cuantificar el contenido fenólico de la cáscara de lima, así como su actividad antioxidante. Esto se determinó evaluando el mejor sistema de extracción de compuestos fenólicos y flavonoides, teniendo como variables: tipo de solvente (metanol, acetona y hexano) y tamaño de partícula (tamiz 20 (T1) y 50 (T2)). La determinación de la actividad antioxidante se realizó mediante dos métodos ABTS⁺ y DPPH•, comparando la efectividad entre ellos. El mejor modelo de extracción de los compuestos fenólicos y flavonoides fue utilizando metanol como solvente y un tamaño de partícula pequeño (300 µm). El valor más alto de actividad antioxidante (91,69 %) se obtuvo con el método ABTS⁺, en los extractos con metanol y acetona, sin diferencias entre los tamices utilizados. La cáscara de lima tiene 8,79 mg EAG/g ms y 14,325 mg quercetina/g ms. La utilización de cáscara de lima representa una alternativa para el aprovechamiento de biocompuestos, que son considerados como sustitutos de los antioxidantes sintéticos existentes.

Palabras clave: flavonoides, cáscara de lima, actividad antioxidante.

ABSTRACT

The wastes produced in juices manufacturing are mainly peel and bagasse, however, this by-products are a good source of phenolic compounds, most of flavonoids. The aim of this study was to extract and quantify the phenolic content of lime peel and their antioxidant activity. This is determined evaluating the best system of extraction of phenolic compounds, having as variables: type of solvent (methanol, acetone and hexane) and particle size (sieve 20 (T1) and 50 (T2)). The antioxidant activity determination was performed by two methods ABTS⁺ and DPPH•, comparing the effectiveness. The best model of extraction of flavonoids and phenolic compounds was using methanol as solvent and a small particle size (sieve 20). The highest antioxidant activity (91.69%) was obtained with the ABTS⁺ method, in methanol and acetone extracts, no differences were observed

between the sieves used. The lime peel contains 8.79 mg EAG/g DW and 14.325 mg quercetin/g DW. The use of lime peel represents an alternative to the use of biocomposites, which are considered as replacements for existing synthetic antioxidants.

Keywords: flavonoids, lime peel, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

Una de las ramas de la industria alimenticia que tiene mayor impacto es el procesamiento de frutos cítricos, ya que son las que tienen una mayor producción y consumo a nivel mundial de jugos y néctares (Marín *et al.*, 2007). La mayor parte de la industrialización y aprovechamiento de los cítricos implica la extracción del jugo, que representa más del 60 % de la producción total de éstos (Ramos, 2003). Los desechos que se tienen de la obtención de jugos son principalmente cáscara y bagazo, que representan aproximadamente el 50 % de la masa total del fruto original (Marín *et al.*, 2007). A partir de ellos se pueden obtener harinas, pectina, aceites esenciales, pigmentos y productos cítricos especiales; así como también compuestos bioactivos que tienen efectos benéficos sobre la salud, así como la fibra y los polifenoles, en especial los flavonoides (Girard y Mazza, 1998).

Los flavonoides más representativos en los cítricos son las flavononas en forma glicosada (hesperidina y naringina) y las flavonas (diosmina y rutina) en su forma polimetoxilada (sinensetina, nobiletina y tangerina) (Bocco *et al.*, 1998; Kawaii *et al.*, 2000). La concentración de estos compuestos es más alta en la fruta inmadura de tamaño pequeño que en la madura (Braddock, 1999).

La extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material fresco o incluso seco, siempre y cuando no se altere su composición. Se utilizan inicialmente solventes no polares o ligeramente polares para separar las clorofilas, gomas y agliconas de flavonoides altamente metoxilados. Los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, son considerados polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetona, DMSO o agua. El filtrado final se concentra y todo el disolvente se remueve (Oyvind y Kenneth, 2006). Para la extracción, el disolvente se elige en función del tipo de flavonoide necesario. Flavonoides menos

*Autor para correspondencia: Carmen Lizette Del Toro Sánchez
Correo electrónico: carmen.deltoro@cuci.udg.mx

polares (isoflavonas, flavanonas, flavonas y flavonoles, metilados) se extraen con cloroformo, diclorometano, éter dietílico o acetato de etilo, mientras que los flavonoides glicósidos y agliconas, más polares, se extraen con alcoholes o mezclas de alcohol-agua. Los glicósidos aumentan su solubilidad en agua y soluciones alcohólicas acuosas. Por otra parte, el tamaño de partícula también es importante a considerar; en un estudio preliminar sobre la extracción de hesperidina y naringina a partir de cáscaras de naranja (Khan *et al.*, 1998) se determinó que el tamaño de partícula en el material vegetal generó el mayor rendimiento en la obtención de flavonoides, siendo 2 cm² el tamaño óptimo.

La identificación, cuantificación y extracción de los flavonoides ha despertado un gran interés, debido a que se ha reportado que poseen propiedades benéficas para la salud, tales como actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas, protección contra enfermedades del corazón y propiedades antioxidantes (Carrol *et al.*, 1999; Maeda-Yamamoto *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2006; Huet, 1982; Benavente-García *et al.*, 1997; Shahidi, 1997).

Aunque la cáscara de cítricos representa una buena fuente de estos compuestos, en muchos casos son desperdiciados, por lo que en esta investigación se busca evaluar diferentes tratamientos para la extracción de los compuestos fenólicos contenidos en la cáscara de lima y determinar su actividad como antioxidante natural.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de Harina de la Cáscara de Lima

Para obtener la cáscara, a la lima se le extrajo el jugo con la ayuda de un extractor y posteriormente se removió la pulpa. La cáscara se secó empleando un secador de túnel a una temperatura de 40 °C. Una vez deshidratada, se molió empleando un molino de martillos y se tamizó para separar por tamaño de partícula, utilizando los tamices de 20 (T1) y 50 (T2), con lo que se obtuvieron tamaños entre 300 y 850 µm (Rodríguez *et al.*, 2006).

Extracción de Compuestos Fenólicos Utilizando Tres Solventes Diferentes

Se pesaron 3 g de harina de cáscara de lima y se disolvieron en 20 mL del solvente: metanol (M), acetona (A) y hexano (H), respectivamente. Se homogenizó y se sometió a sonicación durante 30 min. Pasado este tiempo se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y al precipitado se le realizó un segundo lavado siguiendo el mismo procedimiento anterior (Del Toro-Sánchez *et al.*, 2011).

Determinación de Fenoles Totales

Para la determinación de fenoles totales, se utilizó el método de Folin Ciocalteu (Prior *et al.*, 2005; Mullen *et al.*, 2007). Consiste en una mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico (color amarillo) que en presencia de un exceso de este reactivo, los fenoles reducen a los ácidos anteriores a

óxidos de tungsteno y molibdeno a color azul. Brevemente, se tomaron 50 µL de extracto de harina y se agregaron 3 mL de agua destilada, 250 µL de Folin, 750 µL de Na₂CO₃ al 20 % y 950 µL de agua destilada. Se dejó reposar media hora y se determinó la absorbancia a 765 nm. Se realizó una curva de ácido gálico y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca (mg EAG/g ms). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Determinación de Flavonoides Totales

La cuantificación de flavonoides se realizó mediante el método descrito por Maksimovic *et al.* (2005), utilizando quercetina como patrón, reportando como equivalentes de quercetina por gramo de materia seca (mg quercetina/g ms). Se tomaron alícuotas de 0,1 mL de extracto y fueron adicionadas a 1,4 mL de agua desionizada y 0,50 mL del reactivo de flavonoides (133 mg de tricloruro de aluminio, 400 mg acetato de sodio en 100 mL de solvente constituido por 140 mL metanol, 50 mL agua y 10 mL ácido acético). Después de 30 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 415 nm. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Determinación de la Actividad Antioxidante

ABTS• (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio). Se basa en la capacidad para atrapar radicales presentes en el medio. El radical catiónico de color verde azulado ABTS⁺ se genera por la interacción del ABTS con persulfato de potasio. El radical ABTS⁺ es un compuesto estable y soluble en metanol. Por lo tanto, se evalúa la capacidad antioxidante de la muestra en función de la habilidad para disminuir la concentración del radical (Re *et al.*, 1999). Se tomaron 2,97 mL de radical catiónico, se midió la absorbancia a 734 nm y se adicionaron 0,03 mL de muestra. Los resultados se expresaron en % de inhibición. En donde:

$$\% \text{ de inhibición} = (\text{absorbancia inicial} - \text{absorbancia final}) / \text{absorbancia inicial} * 100$$

DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). Se basa en la habilidad para atrapar radicales presentes en el medio. La molécula de DPPH• se caracteriza por ser un radical libre estable, que en disolución metanólica presenta un color violeta intenso con una fuerte absorción a 515 nm. Cuando la solución de DPPH• se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno (antioxidante), reduce al radical DPPH• con la pérdida del color violeta, el cual es estequiométrico con respecto al número de electrones que capture, tornándose de violeta a un amarillo pálido (Molyneux, 2004). Se tomaron 3,9 mL de radical con 0,1 mL de muestra, se dejaron reposar media hora y se tomaron lecturas a la absorbancia especificada. Los resultados fueron reportados en % de inhibición.

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico multifactorial con tres repeticiones, se aplicó un ANOVA y la prueba de LSD para observar diferencias significativas y elegir los mejores

tratamientos utilizando el programa Statgraphics centurió XV versión 15.2.06.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La extracción de los componentes fenólicos (flavonoides) de material vegetal, incluyendo los métodos y el tipo de solvente de extracción, generalmente depende del tipo de compuesto fenólico y del disolvente. Los resultados de estudios anteriores demuestran que el rendimiento de la extracción de fenoles y el contenido de flavonoides es mayor dependiendo de la polaridad del disolvente (Turkmen *et al.*, 2006; Lapornik *et al.*, 2005), es por eso que se utilizaron metanol como disolvente polar, acetona como medianamente polar y hexano como disolvente no polar.

Fenoles Totales

En la figura 1 se observa que el tipo de solvente influye en la cantidad de fenoles extraídos, debido a que los compuestos fenólicos mayoritarios en cáscara de cítricos son flavonoides más polares y estructuras glicosídicas más solubles en solventes polares y menos solubles en compuestos orgánicos no polares, como acetona y hexano (Bocco *et al.*, 1998, Kawaii *et al.*, 2000).

El resultado máximo obtenido para el extracto metanólico fue de 8,79 mg EAG/ g ms con el T1, mientras que con el T2 se obtiene aproximadamente 20 % menos, siendo los demás extractos no significativos. Estos resultados pueden deberse a que, entre más pequeño sea el tamaño de partícula, éste tiene mayor área de transferencia a los solventes y por consiguiente, mayor rendimiento de extracto. Estudios en cáscara de lima llevados a cabo por Kuljarachanan *et al.* (2009) en Tailandia, a través de la extracción con agua-acetona (1:1 v/v) durante 15 horas a 30 °C, reportaron un contenido fenólico de 8,11 mg/ g ms, resultados muy similares a los nuestros. Escobar *et al.* (2010) obtuvieron 6,62 g EAG/ g ms por lo que es 1,3 veces menor a los resultados de nuestra investigación. Esta diferencia cuantitativa varía entre

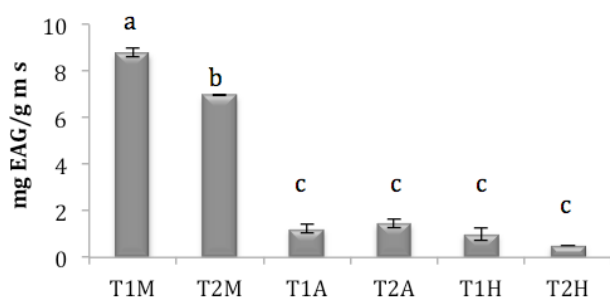


Figura 1. Contenido de fenoles en cáscara de lima utilizando diferentes extracciones. Letras iguales indican que no hay diferencia estadística significativa.

Figure 1. Phenolic content in lime peel using different extractions. Identical letters indicate no statistically significant differences.

diferentes órganos y en diferentes poblaciones de una misma planta, explicado por la regulación de la expresión génica y la interacción con factores ambientales (clima, altitud, nutrición y prácticas agrícolas) (Winkel-Shirley, 2002).

Por otra parte, la cantidad de polifenoles obtenidos en cáscaras de otros cítricos es muy variable. Gorinstein *et al.* (2001) estudiaron las cáscaras del limón (1,9 mg/g), naranja (1,79 mg/g) y pomelo (1,55 mg/g). Sin embargo, en otras investigaciones se obtienen contenidos fenólicos diferentes dependiendo la variedad del fruto. Por ejemplo, la naranja agria (7,85 mg/g) y la naranja valencia (2,5 mg/g), varían considerablemente. Lo mismo sucede con el limón mexicano (5,73 mg/g) y limón real (3,58 mg/g) (Escobar *et al.*, 2010). La cantidad obtenida en la cáscara de lima es mayor comparándola con los cítricos mencionados anteriormente, lo que hace más atractiva la utilización de este desecho para la obtención de biocompuestos.

Flavonoides Totales

El contenido de flavonoides de las muestras analizadas se muestran en la figura 2. Para los extractos con hexano fue nula la cuantificación. Por otra parte, los extractos metanólicos fueron 68 % mayor que los acetónicos. En estos mismos extractos se tiene que el T2 es aproximadamente 40 % menor que el T1, siendo este último el mejor. Por lo que se comprueba que entre más pequeño es el tamaño de partícula la mejor será la extracción.

La mayor cantidad de flavonoides cuantificados en las muestras (extractos metanólicos) fue de 14,32 mg quercetina/g ms. Esta cantidad es elevada y según Coll *et al.* (1998), los flavonoides están presentes principalmente en la cáscara y bagazo que, en la pulpa; en general, se considera que los flavonoides mayoritarios son hesperidina (Aprox. 10 %) y naringina (Aprox. 80 %). En estudios de Escobar *et al.* (2010) obtienen 0,17 y 1,32 mg/g respectivamente, en extractos metanólicos de la cáscara de este mismo fruto. Aunque en nuestro estudio no se cuantificaron de forma independiente

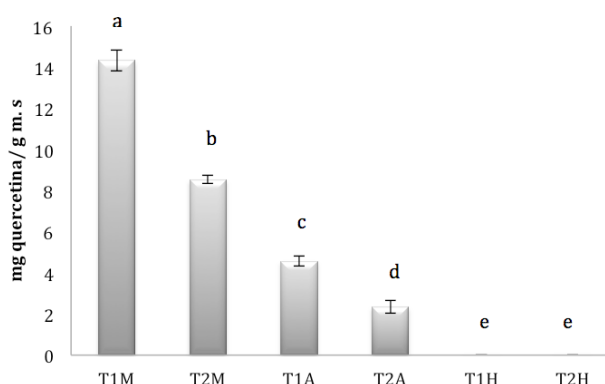


Figura 2. Contenido de flavonoides en cáscara de lima. Letras iguales indican que no hay diferencia estadística significativa.

Figure 2. Flavonoid content in lime peel. Identical letters indicate no statistically significant differences.

hesperidina y naringina, el porcentaje de ambos en la cáscara de lima es de aproximadamente 90 % y por lo tanto, se puede especular que es mayor la cantidad de flavonoides totales en esta investigación que los obtenidos por los de Escobar *et al.* (2010).

Las condiciones de extracción que mostraron la mayor cantidad de flavonoides fueron iguales a las obtenidas en fenoles totales. Esto tiene relación pues los flavonoides están químicamente clasificados dentro de los compuestos fenólicos. Marcano y Hasegawa (1991) señalaron que las agliconas de los flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona, esto confirma la presencia de compuestos fenólicos polares en cáscara de cítricos.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es un parámetro que determina qué tanto el compuesto antioxidante evita que su sustrato se oxide. En la figura 3 se muestran los valores para los diferentes extractos de la cáscara de lima, empleando los radicales DPPH• y ABTS⁺. Los valores obtenidos indican hasta un 91,69 % y 81,5 % de inhibición para los radicales ABTS⁺ y DPPH•, respectivamente. Resultados similares se reportaron por Muthiah *et al.* (2012) que además fueron superiores a los obtenidos en cáscara de naranja agria y limón, pero menores que la cáscara de pomelo (KunduSen *et al.*, 2010). Sin embargo, esta elevada capacidad antioxidante es importante para la salud porque puede prevenir enfermedades como el cáncer y otras enfermedades degenerativas, así como algunas actividades biológicas (antiinflamatoria, antidiabética, etc.).

Los extractos con mayor contenido fenólico resultaron ser los de mayor actividad inhibitoria del radical DPPH•, lo que demuestra que dicha actividad biológica se atribuye a los compuestos fenólicos obtenidos en la fracción en me-

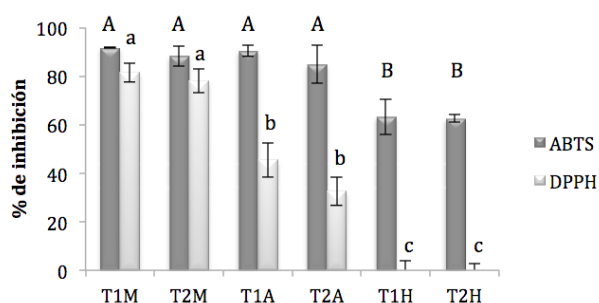


Figura 3. Comparación del porcentaje de inhibición de ABTS y DPPH de la cáscara de lima utilizando diferentes tratamientos de extracción. Letras iguales indican que no hay diferencia estadística significativa (letras mayúsculas y minúsculas son para los tratamientos de ABTS y DPPH respectivamente).

Figure 3. Comparison of ABTS and DPPH inhibition percent from lime peel using different extraction treatments. Identical letters indicate no statistically significant differences (capital letters and small letters are for ABTS and DPPH treatments respectively).

tanol; sin embargo, la actividad inhibitoria del radical ABTS⁺ tuvo un comportamiento similar para los extractos con metanol y acetona, debido a la interacción del radical con los compuestos extraídos. Por otro lado, el ABTS⁺ es soluble en solventes acuosos y orgánicos, lo cual lo hace un método apto para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica de extractos y fluidos biológicos (Schlesier *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2005), por ello se le ha llamado en ocasiones capacidad antioxidante total. No obstante algunos compuestos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al del DPPH•, como es el caso de los carotenoides (Prior *et al.*, 2005).

Los datos obtenidos muestran valores inferiores de porcentaje de inhibición en el método DPPH• con respecto al ABTS⁺, esto debido a la baja selectividad del ABTS⁺, que reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado, independientemente de su potencial antioxidante real (Roginsky y Lissi, 2005). Por otro lado, la capacidad antioxidante de los extractos de frutos cítricos se debe a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y otro tipo de compuestos fenólicos, como se reporta generalmente en la literatura (Bocco *et al.*, 1998; Kawaii *et al.*, 2000; Escobar *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2006). Por lo tanto, se debe tener en cuenta que el DPPH• es más selectivo que el ABTS⁺ y, a diferencia de este último, no reacciona con los flavonoides carentes de grupos hidroxilo en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo (Roginsky y Lissi, 2005). Es por ello que existe tanta variación en las mediciones de capacidad antioxidante. Se han encontrado diferentes investigaciones donde varían tanto las cantidades de reactivos y de las muestras, como del tipo de manejo y medición de las mismas. Por tanto, resulta complicada la comparación de los resultados obtenidos de estas mediciones con otras investigaciones.

CONCLUSIÓN

La cáscara de lima, considerada un desecho, es una importante fuente de compuestos fenólicos y además posee una alta actividad antioxidante. Empleando metanol como solvente y un tamaño de partícula pequeño (aproximadamente 300 μm), se obtienen las condiciones óptimas de extracción de fenoles y flavonoides, así como de su actividad antioxidante. Sin embargo, se esperan más estudios sobre la composición, propiedades y obtención de compuestos de la cáscara de lima que permitan su amplia utilización en la industria alimentaria y/o farmacéutica.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Ciénega (CUCI) y Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). A CONACYT por el apoyo a la becaria Viridiana Pérez Nájera con CVU 447576.

REFERENCIAS

- Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A. y Del Rio, J.A. 1997. Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 45: 4505- 4515.
- Bocco A., Cuvelier M. E., Richard H., Berset C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46 (6): 2123-2129.
- Braddock, R.J. 1999. Flavonoids and limonoids. *Handbook of citrus by-products and processing technology*. Wiley Interscience (ed), Florida, EEUU. pp 209-216.
- Carrol, K.K., Kurowska, E.M. y Guthrie, N. 1999. Use of citrus limonoids and flavonoids as well as tocotrienols for the treatment of cancer, en *International Patent WO 9916167*.
- Coll, M.D., Laecina, J., Tomás-Barberán, F. 1998. Recovery of flavanones from wastes of industrially processed lemons. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 206: 404-407.
- Del Toro-Sánchez, C.L., Lara-Rodríguez, A., Jave-Suárez, L.F., Ramos-Zavala, L. Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Sahagún, A., Castellanos-Hernández, O.A., Guerrero-Medina, P.J. y Morales-Del Río, J.A. 2011. Extractos de *Anemopsis californica* contra líneas celulares cancerosas. VIII encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. León, Guanajuato, México. pp 1-5.
- Escobar M., Hernández H. Y., Barragán B. E. 2010. Extracción de compuestos fenólicos de cáscaras de cítricos producidos en México (naranja valencia, naranja agria, limón mexicano, limón real, mandarina, toronja y lima). XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. VII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. VIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. Acapulco, Guerrero, México.
- Girard, B. y Mazza G. 1998. Functional grape and citrus products. In: Mazza G. *Functional Foods, Biochemical and Processing*. Technomic Publishing Company (ed), Pensilvania. pp 155-178.
- Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Parkys, Y.S., Haruenkit, R., Lojek, A., Ciz, M., Capi, A., Libman, I., Trakhtenberg, S. 2001. Comparison of some bio-chemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*. 74: 309-15.
- Huet, R. 1982. Constituents of citrus fruits with pharmacodynamic effect: citroflavonoids. *Fruits*. 77: 267-271.
- Kang, H.J., Chawla, S.P., Jo C., Kwon, J.H. y Byun, M.W. 2006. Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresource Technology* 97: 614- 620.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., Koizumi, M., Ito C. y Furukawa, H. 2000. Quantitative study of flavonoids in leaves of citrus plants. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 48(9): 3865-3871.
- Khan, I.Z., Kolo, B.G., y Aquil, M. 1998. Flavonol glycosides from *Centaurea senegalensis* DC. *Global Journal of Pure Applied Sciences*. 4: 255.
- Kuljarachanan, T., Devahastin, S., Chiewchan, N. 2009. Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying. *Food Chemistry*. 113: 944-949.
- KunduSen, S., Saha, P., Bhattacharya, S., Bala, A., Mazumder, U.P., Gupta, M., Haldar, P.K. 2010. Evaluation of *In vitro* antioxidant activity of *Citrus maxima* on reactive oxygen and nitrogen species. *Pharmacologyonline* 3: 850-857.
- Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A. G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*. 71: 214-222.
- Maeda-Yamamoto, M., Kawahara, H., Tahara, N., Tsuji, K., Hara, Y. y Isemura, M. 1999. Effect of tea polyphenols on the invasión and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT1080 cells. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 47: 2350-2354.
- Maksimovic, Z., Malencic, D. y Covacevic, N. 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Mayadis stigma* extracts. *Bioresource Technology*. 96: 873 - 877.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. 1991. *Fitoquímica orgánica*. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. pp 45.
- Marín, F.R., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J. y Pérez-Álvarez J.A. 2007. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*. 100(2): 736-741.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable radical dipheylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin. Journal Science Technology*. 26(2): 211-219.
- Mullen W., Marck S.C. y Crozier A. 2007. Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 55(8): 3148-3157.
- Muthiah, P.L., Umamaheswari, M., Asokkumar, K. 2012. *In vitro* antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of *Citrus*. *International Journal of Phytopharmacy*. 2(1): 13-20.
- Oyvind A. y Kenneth M. 2006. Separation and Quantification of Flavonoids. *En Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Oyvind A. y Kenneth M (ed), Taylor & Francis Group, New York. pp 1-31.
- Prior, R.L., Wu, X. y Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 53: 4290-4302.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231-1237.
- Ramos, J.A. 2003. Riesgos y oportunidades de la red de valor naranja. En FIRA. XXXIV. 319. 1-160.
- Rodríguez, P., Córdova, J., Castillo, G. y Lugo, E. 2006. Efecto de la fermentación sólida sobre la liberación de compuestos fenólicos y flavonoides e incremento de la actividad antioxidante en cáscara de *Citrus limetta* Risso, utilizando *Aspergillus saitoi*. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. pp 1.
- Roginsky, V. y Lissi, E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92 (2): 235-254.
- Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V. y Bitsch, R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*. 36(2): 177-187.
- Shahidi, F. 1997. Natural antioxidants an over view. En *Natural Antioxidants*. AOCS Press. Illinois. pp 1-11.
- Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y.S. 2006. Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*. 99: 838-841.
- Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology*. 5:218-23.