

**Detección de Fitoquímicos, contenido de Vitamina C y Ácido
fólico en Chironja (*Citrus sinensis* x *Citrus paradisi*)
injertada en diferentes patrones de cítrica**

Por

Josephine Soto Vega

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIA

En

Ciencia y Tecnología de Alimentos

Universidad de Puerto Rico
Recinto Universitario de Mayagüez
Facultad de Ciencias Agrícolas
2005

Aprobado por:

Félix M. Román Pérez, M.S.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Edna Negrón de Bravo, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

María del C. Rodríguez, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Wanda Almodóvar, M.S.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón de Bravo, Ph.D.
Director de Departamento

Fecha

ABSTRACT

The purpose of this research was to determine the contents of vitamin C, folic acid and the phytochemicals flavonoids in the chironja fruit grafted on four different rootstocks. A comparative analysis was conducted within the different rootstocks to determine if significant differences exist among all and between oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). Folates and flavonoids were determined with an HPLC method and vitamin C was detected by the Tillmans Method. Flavonoids determination revealed that naringenin, present in grapefruits, did not appear in chironja. Collected data revealed significant differences within the rootstocks evaluated for vitamin C contents. The estimated average for vitamin C in chironjas revealed 15 % below oranges and 13 % above grapefruits. Different limitations could not make possible quantification for folates in chironja. The findings of this study revealed part of the nutritional value of chironja which could be an important factor for marketing.

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue determinar si existen diferencias significativas en contenido de Vitamina C y Ácido fólico de la chironja injertada en cuatro patrones de cítricas y la comparación con los existentes en la china y la toronja; así como también para los flavonoides presentes. Para la detección de flavonoides y ácido fólico se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta ejecución y en la determinación de vitamina C el método de Tillmans. Los resultados reflejan que existe diferencia significativa para el contenido de vitamina C entre tres de los patrones estudiados. Además que existe un 13% más de vitamina C en chironja versus la toronja, y un 15% menos que el de la china. En flavonoides se encontró que el Naringenin, único encontrado en la toronja, no fue detectado en la chironja. La cuantificación de folato no fue posible, esto por diferentes limitaciones. Los análisis realizados a esta fruta permiten parte del contenido nutricional importante para su mercadeo.

A mis padres, mis hermanas, mis princesas María Fernanda y Mía y muy en especial a ti Rafael Mendoza; mi esposo, por tu apoyo y ayuda para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la **doctora María Rodríguez** por aceptar este proyecto, dedicarme de su tiempo y permitirme de sus conocimientos.

Al **Agrónomo Félix M. Román**, de la Estación Experimental Agrícola de Isabela, por decir siempre presente para brindar sus conocimientos y las muestras necesarias.

A la **doctora Edna Negrón**, por su apoyo y motivación en momentos difíciles, por su inolvidable frase “Welcome to graduate school”.

Al **doctor José Torres**, de Ponce School of Medicine; por su colaboración con la compra de reactivos para los análisis realizados.

Al **doctor José Dumas**, del Laboratorio Central Analítico de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico, por permitirme un espacio en su laboratorio y el uso del HPLC.

A la **señora Sheila M. Soler**, técnica del Laboratorio Central Analítico de la E.E.A. de la Universidad de Puerto Rico; por brindarme de su tiempo y conocimientos para trabajar con el HPLC.

Al Centro de Investigación Científica de la Pontífice Universidad Católica de Puerto Rico, donde se realizó la mayor parte de este trabajo. **Doctora Lissette Santos** y muy en especial a la **señorita Daisy Morales**, técnica del laboratorio de bioquímica; por hacer de este laboratorio y su calor humano un ambiente agradable de trabajo. Por permitirme ser parte de su laboratorio y por su valiosa ayuda para la realización de este trabajo.

A todas mis compañeras de estudio, muy en especial a **Yaritza, Maridia y Diana**, porque juntas fue más llevadero volver a la Universidad.

A la **señora María L. Vega**, mi madre; por sus oraciones y por cuidar de mis amores en lo que llegaba de Mayagüez.

A mis amores, **María Fernanda y María Alejandra**; por entender que Mamá tiene que estudiar.

A **Rafael O. Mendoza**, por tu amor incondicional y tu apoyo, por tus empujoncitos para que no me rindiera. Te Amo.

A ti mi **Padre Celestial**, porque cuando ya no podía más te entregué mi trabajo y por ti; termino.

MIL GRACIAS

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
AGRADECIMIENTOS	v
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Cítricos	5
Injertos en cítricos	5
Historia de la chironja	6
Fitoquímicos	9
¿Qué son?	9
Familias de los fitoquímicos	9
Análisis para la detección de fitoquímicos	10
Características funcionales de los fitoquímicos	11
Flavonoides en cítricos	14
Flavonoides e implicaciones con la salud	15
Contraindicaciones de los flavonoides	17
Recomendaciones (DRI's) para fitoquímicos	19
Vitamina C	19
Definición	19
Comportamiento químico de la molécula	20
Análisis para la detección de ácido ascórbico	20
Características funcionales de la vitamina C	22
Vitamina C como precursor de salud	23
Vitamina C en los alimentos	24
Recomendaciones (DRI's) de vitamina C	25
Ácido fólico	27
Definición	27
Comportamiento químico de los compuestos de folato	28

Análisis para la detección de folato	30
Características funcionales del ácido fólico.....	34
Ácido fólico como precursor de salud	35
Ácido fólico en los alimentos	37
Recomendaciones (DRI's) de ácido fólico	37
MATERIALES Y MÉTODOS	39
Muestreo de la chironja.....	39
Selección de la muestra.....	39
Preparación de la muestra	39
Análisis de los componentes nutricionales	40
Detección de Flavonoides	40
Detección de Vitamina C	42
Detección de Folatos	44
RESULTADOS.....	49
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	66
RECOMENDACIONES.....	68
BIBLIOGRAFÍA	69
APÉNDICE.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Funciones de algunos Fitoquímicos en los alimentos [14].....	12
Tabla 2: Flavonoides en cítricos.....	15
Tabla 3: Contenido de Vitamina C en alimentos.....	25
Tabla 4: Recomendaciones (DRI's) para Vitamina C.....	27
Tabla 5: Contenido de Ácido fólico en alimentos.....	37
Tabla 6: Recomendaciones (DRI's) para Ácido fólico.....	38
Tabla 7: Flavonoides detectados en los diferentes patrones de Chironja para cada uno de los bloques de cosecha.....	50
Tabla 8: Contenido de Vitamina C (mg) para cada una de las muestras de Chironja evaluadas de acuerdo al patrón y al bloque de cosecha.....	53
Tabla 9: Porcentaje de recuperación para muestras de Chironja con 5-metiltetrahydrofolato añadido a diferentes concentraciones.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estructura común de los Flavonoides [17].	13
Fiigura 2: Molécula de Ácido ascórbico oxidada y reducida.	20
Figura 3: Reacción de oxidación del Ácido ascórbico.	21
Figura 4: Estructura del Ácido fólico.	28
Figura 5: Estructura de los compuestos de Folato.	29
Figura 6: Etapas para el análisis de Folato en alimentos.	33
Figura 7: Cromatograma para la solución de estándares de Flavonoides.	51
Figura 8: Cromatograma obtenido para muestra de Chironja.	52
Figura 9: Contenido promedio de Vitamina C en Chironja por Patrón.	54
Figura 10: Contenido promedio de Vitamina C en Chironja por Bloque.	55
Figura 11: Contenido promedio de Vitamina C en Chironja en comparación con el contenido en China y en Toronja.	56
Figura 12: Curva de calibración para el estándar 5-metiltetrahydrofolato.	58
Figura 13: Cromatograma para el estándar 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF).	59
Figura 14: Cromatograma para muestra de Chironja con 5-MTHF añadido.	60

LISTA DE APÉNDICE

Figura	Página
1 Foto de la fruta de <i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus paradisi</i> (Chironja).....	75
2 Foto del árbol de Chironja, (<i>C. sinensis</i> x <i>C. paradisi</i>).....	76
3 Foto del árbol de Chironja, (<i>C. sinensis</i> x <i>C. paradisi</i>).....	77
4 Foto del Equipo de Cromatografía líquida de alta ejecución (HPLC)....	78
5 Foto de las columnas de filtración.....	79
6 Cromatograma para muestra de leche con estándar de flavonoides añadido.....	80

Tabla	Página
1 Propiedades de estándares de flavonoides evaluados.....	81
2 Estadísticos para el contenido de Vitamina C en Chironja por patrón.....	82
3 Estadísticos para la evaluación de Vitamina C en patrones por bloque...82	
4 Estadísticos mediante la prueba de Bonferroni para Vitamina C.....	83

INTRODUCCIÓN

Por décadas la recomendación por aumentar el consumo de frutas y vegetales en el patrón de alimentación del ser humano ha ido en incremento continuamente. Anteriormente se recomendaba un consumo variado de los grupos de frutas y vegetales por día para lograr una ingesta adecuada en el renglón de vitaminas y minerales. Esto debido a la amplia gamma de estos nutrientes que posee la mayoría de los alimentos pertenecientes a estos dos grupos. En la actualidad además de promover la variedad diaria para cada uno de estos grupos también se ha aumentado las porciones recomendadas por día para cada persona [1]. Este aumento correlaciona con estudios realizados que demuestran que a mayor consumo de estos alimentos, mayor la prevención contra diferentes enfermedades o condiciones de salud. Entre estas condiciones se han podido mencionar, el cáncer, problemas cardiacos, inmunológicos, entre otros [2].

La mayoría de las especies de frutas específicamente aquellas pertenecientes al género *Citrus*, o mejor conocidas como cítricos han sido vinculados a un sinnúmero de beneficios para la salud del ser humano. Su amplia composición nutricional y contenido vitamínico los coloca entre uno de los más recomendados para consumo diario en el grupo de las frutas. Entre estas vitaminas, una de las de mayor contenido en este género lo es la vitamina C, ésta es relacionada a la absorción del hierro y folato en el sistema sanguíneo. También ha sido asociada a la disminución de riesgo de cáncer, esto por su función como antioxidante. Además se le reconoce por su importancia en la formación del colágeno entre otras cosas.

Otra importante vitamina que se puede encontrar a través de los cítricos lo es el ácido fólico o según su nombre genérico; folato. Este es asociado a la prevención de diferentes condiciones como enfermedades del tubo neural en fetos, cáncer de seno y colorectal, enfermedad de Alzheimer, ataques al corazón, entre otros. También los cítricos forman parte del tan llamado grupo de los alimentos que batallan contra enfermedades (“Food that fight diseases”), esto por contar con la presencia de fitoquímicos (sustancias químicas no nutritivas, biológicamente activas, presentes en alimentos provenientes únicamente de plantas); actualmente conocidas como la vitamina F. Estos componentes han sido altamente reconocidos como promotores de salud por su prevención en el desarrollo o formación de diferentes tipos de cáncer, además de otras enfermedades.

Mediante este estudio se evaluó una fruta perteneciente al sub-género *Eucitrus* del género *Citrus*. Esta es conocida por su nombre genérico como Chironja (Apéndice Figura 1). Esta fruta es considerada un híbrido creado por la unión del *Citrus sinensis* (china) y el *Citrus paradisi* (toronja), y de aquí que surge su nombre. En Puerto Rico fue descubierta para el año 1956, y por algunas de sus características es que se consideró que haya surgido de esta unión [3]. Se seleccionó esta fruta para reconocer si el que haya sido considerada como un híbrido de la china y la toronja le permitió reunir las mejores propiedades nutricionales de cada una de estas frutas, logrando así un mejor valor nutricional en el grupo de los cítricos.

Los análisis realizados a través de este estudio para cada uno de los diferentes patrones injertados con chironja, (mandarinas Sun Chu Sha y Cleopatra; Naronja y HRS812 Sunkie-Benecke trifoliate orange) tienen como propósito el permitir conocer

parte del valor nutricional de esta fruta. Se seleccionó específicamente la determinación de vitamina C, ácido fólico y algunos fitoquímicos en la fruta por las diversas características o propiedades que posee cada uno de ellos en prevención de muchas de las condiciones o enfermedades de alto índice de mortalidad. Al determinar el contenido de vitamina C y folato presente en ésta, se puede comparar el contenido entre cada uno de los patrones mencionados, además de compararlos con los contenidos establecidos de acuerdo a la literatura tanto para la china como para la toronja. También se logra reconocer algunos de los fitoquímicos que posee, específicamente aquellos pertenecientes a la familia de los flavonoides, para así determinar si aquellos que son únicos de cada especie se presentan en una misma fruta, la chironja.

Gran cantidad de estudios han sido realizados en diferentes cítricos de regiones extranjeras, mediante los cuales se ha podido conocer desde el contenido calórico de la fruta, hasta la presencia de los diferentes nutrientes disponibles, incluyendo cada uno de los componentes que se analizan mediante este estudio. Así también han sido evaluados muchos otros alimentos pertenecientes a los demás grupos. Durante la revisión de literatura y búsqueda de datos sobre la chironja y otros cítricos de la producción agrícola en Puerto Rico, se pudo determinar que no existe ninguna colección que especifique resultados de contenidos de nutrientes en estos productos. Por esta razón uno de los objetivos específicos de este estudio es el comenzar el análisis nutricional de productos agrícolas producidos en Puerto Rico, con el propósito de permitir la recolección de datos y crear una base de datos para

referencia. Esta base de datos podría permitir la promoción y consumo de productos locales siendo utilizada como herramienta para la educación al público.

El conocer la composición de nuestros productos y la importancia de éstos, puede promover el mayor uso y consumo de ellos, permitiendo así, un mayor desarrollo y crecimiento de la industria agrícola de nuestro país.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cítricos

Se cree las especies pertenecientes al género “*Citrus*” provienen de las regiones tropicales y subtropicales de Asia y del Archipiélago Malayo, y de ahí se han propagado a diferentes partes del mundo. El género *Citrus* se divide en dos subgéneros muy diferentes: *Eucitrus* y *Papeda*. Los criterios de clasificación son morfológicos, tales como caracteres de la hoja, de la flor y de la fruta. El subgénero *Eucitrus* incluye toda especie de *Citrus* cuya fruta contiene un jugo agradable, que va, desde ácido, sub-ácido o dulce y en el cual hay poca o ninguna gota de aceite. En el subgénero *Papeda*, se incluyen las frutas no comestibles, por contener densas aglomeraciones de un aceite acre que imparte al jugo un sabor amargo y áspero [3].

Injertos en cítricos

Por cientos de años los árboles de cítricos eran propagados mediante el uso de semillas. Estos árboles provenientes de semillas, usualmente presentan un periodo juvenil prolongado, el cual puede convertirse indeseable por ser un proceso de crecimiento excesivo sin ninguna producción. También estos árboles provenientes de semillas presentan susceptibilidad a diferentes enfermedades y problemas relacionados al suelo, en particular el hongo *Phytophthora parasítica* que causa la enfermedad podredumbre del tallo y la raíz “root or foot rot”. Debido al esparcimiento de este hongo surge la necesidad de adoptar el desarrollo de árboles

injertados como fuente de combatir la enfermedad, además de proveer también aceleración al proceso de producción. De aquí que surge el que la mayoría de los cítricos a nivel mundial consisten actualmente de dos partes que combinan atributos favorables del injerto y del patrón. La selección del patrón es una consideración principal y de gran importancia en cada crecimiento de cítricos. Esta selección es fundamental para el éxito de la cosecha; ya que éste es la raíz del árbol, quien además de ser soporte es responsable de la absorción de agua y de nutrientes, también es encargado de adaptar el injerto a condiciones particulares del suelo y de proveer tolerancia a enfermedades. No existe un patrón perfecto, para cada situación. La selección de éste debe estar basado en factores como: producción de la región donde se encuentra, clima local y condiciones de suelo; así como el uso que se le dará a la cosecha (Ej. Fresco o procesado) [4].

Historia de la chironja

La variedad de cítrico, chironja, objeto del presente estudio, corresponde al subgénero *Eucitrus* del género *Citrus*. Surge la chironja en Utuado, Puerto Rico y es descubierta para el mes de febrero de 1956, cuando se denota, entre un cultivo de chinás (naranjas) de Puerto Rico, un árbol cuya fruta y demás caracteres diferían de los otros cítricos conocidos (Apéndice Fig. 3 y 4). No se ha podido precisar con certeza como surgió este tipo de cítrico, pero a juzgar por las características generales que presenta el árbol, su follaje y su fruta, puede implicarse la combinación de propiedades de la especie *Citrus sinensis*, la china y de la *Citrus paradisi*, la toronja o

pomelo. De ahí que surge el nombre con que ha sido bautizada, chironja [3]. Aunque aún no se ha podido aseverar que éstos sean los padres de la chironja, ya que ésta posee características propias que le distinguen de los demás cítricos. Por tanto, ha sido considerada como una nueva variedad de cítrico.

Durante la revisión de literatura para conocer datos sobre el objetivo del estudio, la chironja, se pudo encontrar que es muy poco lo escrito sobre este fruto. Un estudio completo fue realizado para el mes de junio de 1976 por el horticultor Carlos G. Moscoso, entonces Director Auxiliar de la Estación Experimental Agrícola, Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico (UPR) [3]. En este estudio se detallan los hallazgos de la chironja y sus caracteres generales además de un estudio botánico, químico, citogénico y biométrico. También se presentan las posibilidades comerciales e industriales para aquél entonces en términos de venta de fruta fresca y conservas. Mediante el estudio citogénico de la investigación realizado por el Sr. Moscoso, la chironja es caracterizada como el posible resultado de una hibridación. Según el análisis estadístico se demuestra que la chironja es una fruta con características propias que la distinguen de las demás frutas cítricas y que, por consiguiente, debe considerarse como un nuevo tipo de cítrico. Aunque mediante el análisis de la comparación de caracteres de la chironja con los de la naranja (china) y toronja (pomelo), éste se asemeja en jugos a la china y en hojas a la toronja a pesar de poseer sus propias características. Respecto al mercadeo de la chironja, el análisis realizado por el horticultor Moscoso sugiere que los primeros estudios fueron realizados en 1959 por el Departamento de Economía Agrícola de la Estación Experimental de la UPR; siendo el fin principal de estos estudios el determinar el

grado de aceptación de esa fruta por parte del público. Los resultados nunca se dieron a la publicidad, pero demostraron que el grado de aceptación de la chironja fue uno excepcionalmente alto. Otro estudio similar fue realizado en 1964 presentando resultados parecidos a los del primero, esto en lo concerniente a la aceptación y demanda de la chironja. Además de demostrarse que la chironja, como fruta fresca, tiene buenas posibilidades de mercadeo, también reúne las condiciones favorables de transportación para ser exportada. Esto de acuerdo a varios embarques realizados a España durante los meses de invierno de 1965, donde la fruta fue recibida en perfecto estado luego de 15 días de tránsito pasada una semana de su recolección. También fue evaluada la fruta como conserva reflejando resultados en clasificación de 8 para la escala Peryen, [5], lo cual corresponde a la categoría de “gusta mucho”. Como pasta y cascos en almíbar, presentó un resultado de aceptable y muy aceptable para la misma escala.

Otro estudio fue realizado en 1997, donde se evaluaron diferentes tratamientos para prolongar el largo de vida útil poscosecha de la fruta. Esto para lograr la competencia con otros cítricos importados y hasta considerar la exportación del mismo [6].

Luego de estos estudios, al menos publicado no se encontró ningún otro. De acuerdo a la experiencia actual por agrónomos en el campo de cítricos, éstos indican que actualmente la fruta no refleja el mismo mercadeo que presentó en sus inicios, según refleja el estudio antes realizado. Según sus opiniones, tal vez, el fruto actualmente no es bien conocido por nuestra sociedad, por lo que su consumo ha disminuido [7].

Fitoquímicos

¿Qué son?

Los fitoquímicos son sustancias químicas encontradas únicamente en tejidos provenientes de plantas, los cuales se presentan en cantidades variadas en un alimento en particular siendo los responsables de impartir el color y sabor en éste. Además de esta función en los alimentos, los fitoquímicos, siendo componentes naturales bioactivos encontrados, trabajan con nutrientes presentes en los alimentos para proteger el organismo contra enfermedades [8]. Unos actúan como antioxidantes, otros estimulan sistemas enzimáticos y otros alteran la producción de hormonas, estimulando el sistema inmunológico o con efecto antiviral y/o antibacterial [9]. Estudios sugieren que los fitoquímicos también ayudan a disminuir o retrasar el proceso de envejecimiento y a reducir el riesgo de muchas enfermedades que incluyen desde el cáncer, enfermedades del corazón, infartos, presión sanguínea elevada entre otros [10].

Familias de los fitoquímicos

Existen cientos de fitoquímicos, muchos de ellos son similares en función o composición, por lo que son agrupados por categorías o familias. Algunas de las familias más conocidas de estos componentes lo son: carotenoides, isoflavones, isoprenoides, isothiocianatos, monoterpenos, flavonoides, fitoesteroles y ácidos grasos omega-3 y 6 entre otros [11]. Al momento, en el grupo de las frutas cítricas,

han sido detectados un sinnúmero de carotenoides, monoterpenos y fenoles; en realidad se han detectado sobre 170 diferentes fitoquímicos en una china (naranja) [12]. En el grupo de los monoterpenos existen alrededor de 40 limonoides en cítricos, siendo limonín y nomilín de los principales. Estos componentes ocurren en altas concentraciones principalmente en el jugo de china y toronja, y son algunos los responsables de proveer, de cierto modo, ese sabor agrio de los cítricos. Según la literatura, en el grupo de los cítricos también se pueden encontrar un sinnúmero de flavonoides, siendo estos los principales fitoquímicos evaluados a través de este estudio. Específicamente en el *C. sinensis* (china), se han encontrado el hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeritin, diosmin, rutin, entre otros. En el caso del *C. paradisi* (toronja), además de cada uno de los encontrados en la china también se han encontrado el prunin, poncerin y el naringin entre otros, con este último conocido como el principal y el más abundante encontrado en la toronja [13].

Análisis para la detección de fitoquímicos

De acuerdo a la Asociación de Químicos Analíticos por sus siglas en ingles AOAC, existe un sinnúmero de técnicas en evaluación para la determinación de diferentes familias de fitoquímicos. Estos varían de acuerdo al componente a ser separado, por las propiedades y el comportamiento que presente. Estas técnicas van desde viscometría de masa por ejemplo para determinación de ácidos grasos esenciales, así como inmunoensayos, diferentes técnicas de cromatografía de gases

(GC) y por separación de cromatografía líquida de alta ejecución (HPLC), espectometría de masa, HPLC y/o GC con espectometría de masa, entre otros

.

Características funcionales de los fitoquímicos

Son estas sustancias químicas, no nutritivas pero sí biológicamente activas las encargadas de impartir color, sabor y hasta protección a las plantas y los alimentos de donde provienen. Son las diferentes familias de fitoquímicos las encargadas de realizar diversas reacciones químicas llevando a cabo cambios en color en un mismo alimento o en una planta, de igual manera en sabor y hasta en aroma [14]. Algunos ejemplos de fitoquímicos encargados de estas funciones se resumen a través de la Tabla 1.

Flavonoides

Es este grupo o familia de fitoquímicos considerados como los más abundantes en el grupo de las frutas, especialmente se consideran como una de las familias más detectadas en las frutas cítricas. Los flavonoides, también conocidos como bioflavonoides, son un grupo de sustancias polifenólicas las cuales están presentes en la mayoría de las plantas vasculares, concentrados principalmente en la semilla, corteza, flor y en la piel y pulpa de las frutas. Son principalmente reconocidos como los pigmentos responsables del color de las hojas en las plantas, especialmente durante el otoño [15]. Un sin-número de medicinas provenientes de plantas contienen estos componentes, los cuales han sido reportados como poseedores de acción o

actividad antiinflamatoria, antioxidante, antialérgica, hepatoprotectora, antitrombótica, antiviral y anticarcinogénica [16].

Tabla 1: Funciones de algunos Fitoquímicos en los alimentos [14].

Función	Color	Fitoquímicos	Ejemplo de Alimentos
Impartir Color	Rojo	Licopeno, Flavonoides Antocianinas Ácido elágico	Tomate Melón de agua Fresas Uvas rojas
	Anaranjado	Carotenoides	Papaya Cantaloupe Albaricoques Melocotones
	Verde	Isotiocianatos, Indoles	Brécol Col de Bruselas
	Blanco	Sulfitos, Indoles	Cebolla Chayotes Ajos Coliflor
	Violeta	Fenoles Isotiocianatos Ácido Elágico	Arándanos Blueberries Repollo rojo
Impartir sabor	_____	Flavonoides Fenoles	Cítricos
Impartir protección	_____	Fitatos Inhibidor - proteasa	_____

Son los flavonoides compuestos de bajo peso molecular formados por una estructura de tres anillos con varias sustituciones. Son estas características estructurales las que aparecen como necesarias para la mejor actividad de cada uno de los flavonoides, especialmente la función de antioxidante, y de antiproliferativos que los destaca en el sistema [17]. Los componentes estructurales comunes a estas moléculas incluyen dos anillos de benceno en cualquier lado de un anillo de tres carbonos (Figura 1). Múltiples combinaciones de grupos hidroxilos, azúcares, oxígeno, y grupos de metilo unidos a esta estructura crean las diferentes variedades o clases de flavonoides: flavonoles, flavanones, flavones, flavan-3-oles (catequizas), antocianinas, glucósidos, e isoflavones [17]. También éstas forman parte de las numerosas familias que componen los tan llamados fitoquímicos, recientemente conocidos como vitamina F.

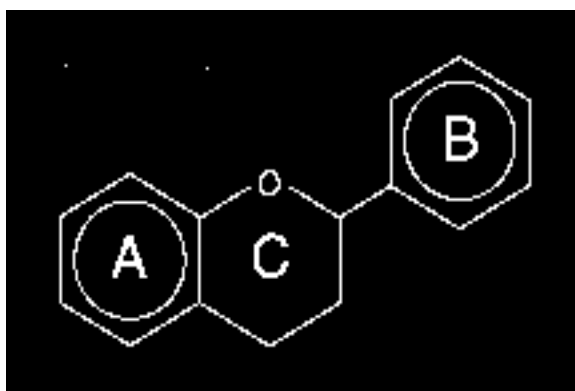


Figura 1: Estructura común de los Flavonoides [17].

En su función de antioxidantes los flavonoides han sido estudiados en su actividad con el ácido ascórbico, esto por coexistir en un sin número de plantas y sus productos. Existe un acumulado de literatura respecto a la interacción de estos dos componentes

en los sistemas biológicos. Muchos flavonoides sirven como antioxidantes para el ácido ascórbico. Estudios “in Vitro” indican que éstos tienen la capacidad de retardar la conversión de ascorbato a dehydroascorbato. Uno de los mecanismos utilizados en esta reacción envuelve la quelación de cobre y de otros minerales trazas por los flavonoides llevando a retrasar la oxidación del ácido ascórbico por metales. Además de estas funciones, también se le otorga a los flavonoides algunas funciones fisiológicas como el aumentar la absorción de la vitamina C, proveer la estabilización de la molécula de ácido ascórbico, lograr la reducción de dehydroascorbato a ascorbato para poder ser utilizado y el permitir un almacenaje metabólico de la vitamina [18].

Flavonoides en cítricos

De acuerdo a la literatura, los resultados obtenidos por diferentes investigaciones en cítricos para fitoquímicos demuestran que existe una gran variedad de flavonoides para las diferentes especies. Este contenido de flavonoides se ha encontrado que puede variar entre un cultivo y otro para una misma especie; además de que se ha detectado que puede existir un flavonoide en la hoja del árbol o en la piel de la fruta y no presentarse en el interior de la fruta y viceversa [13]. De acuerdo al Servicio de Investigación de Agricultura del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos por sus siglas en inglés (ARS-USDA), se resume un contenido amplio de flavonoides en cítricos. A través de la Tabla 2 se obtienen algunos de los detectados para el *C. sinensis* y para el *C. paradisi*.

Tabla 2: Flavonoides en cítricos.

Especie	Sub-clase	Flavonoide
<i>Citrus sinensis</i>	Flavanone glycosido	Eriocitin
		Hesperetin
	Flavones	Apigenin
		Luteolin
	Flavonoles	Kaempferol
		Myricetin
		Quercetin
	Flavone glycosido	Diosmin
		Rutin
<i>Citrus paradisi</i>	Flavanone glycosido	Eriocitin
		Hesperedin
		Naringin-4'-glycosido
		Poncerin
		Prunin
	Flavones	Apigenin
		Luteolin
	Flavonoles	Kaempferol
		Myricetin
		Quercetin
	Flavone glycosido	Diosmin
		Kaempferol glycosido
		Rutin

Flavonoides e implicaciones con la salud

En general, los fitoquímicos han sido vinculados con la promoción de salud; principalmente se le ha atribuido su efecto contra el desarrollo y la formación de células cancerosas. En términos de flavonoides, alrededor de 4,000 diferentes han sido identificados, muchos en frutas, vegetales y bebidas como el té, café, cerveza, vino y jugo de frutas [19]. Por su capacidad de antioxidantes, los flavonoides pueden proteger las células de los efectos dañinos que causan especies de oxígeno reactivo.

Un desbalance entre antioxidantes y estas especies de oxígeno resultan en estrés oxidativo, altamente relacionado al cáncer, envejecimiento, aterosclerosis, daño isquémico, enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas (Ej. Parkinson's y Alzheimer) [20]. Estudios indican que muchos flavonoides ayudan proveyendo protección contra estas enfermedades por su contribución junto con vitaminas antioxidantes y enzimas, para formar un sistema de defensa antioxidante al cuerpo humano. Específicamente en estas familias de flavonoides, muchos han sido estudiados, en el caso de aquellos presentes en cítricos evidencia sugiere que pueden ayudar a disminuir los niveles de colesterol en sangre [21], control en los procesos inflamatorios [22], beneficios para personas con Diabetes Mellitus [23], reducción en reacciones alérgicas [24], además de la prevención de diferentes tipos de cáncer [25]. Un estudio realizado en colaboración con el USDA y enfocado en 22 flavonoides encontrados naturalmente en chinas (naranjas) reveló según el Dr. Najla Guthrie, presidente de la investigación que estos compuestos pueden ser efectivos en cáncer del pulmón, próstata y de las células melanomas. También se encontró efectividad de los flavonoides en la inhibición del crecimiento de células de cáncer del seno [26]. Otros estudios también conducidos por el Dr. Guthrie indican que estos componentes encontrados en jugos de cítricos demostraron reducir el crecimiento de células carcinógenas del colon, esto en pruebas de laboratorio [26]. Otros estudios presentados por la Sociedad Americana del Cáncer, reforzaron el que los flavonoides son una importante clase de compuestos protectores beneficiosos en disminuir diferentes tipos de cáncer y también de algunas enfermedades cardiovasculares [27]. Además de estas importantes funciones en la prevención del cáncer; investigaciones

sugieren también actividad protectora en condiciones como hemorroides [28], insuficiencia crónica de venas [29], sangrado de encías y nariz [30], y en el tratamiento de Lymfedema (arm swelling) [31]. Principalmente para estas condiciones los flavonoides: diosmin y hesperidin combinados, han sido asociados al tratamiento de cada una de estas condiciones, al igual que el rutin; cada uno de estos encontrados en diferentes cítricos. Estudios epidemiológicos también han demostrado que la ingesta de flavonoides está inversamente relacionada a la mortalidad por enfermedades coronarias y a la incidencia de ataques al corazón. Otra importante colaboración de estos componentes se relaciona a las lipoproteínas de baja densidad, conocidas por sus siglas en inglés LDL. La oxidación de estas lipoproteínas se reconoce que juega un rol importante en el desarrollo de la aterosclerosis. Las células del sistema inmunológico llamados macrófagos reconocen y atrapan las LDL oxidadas, proceso que lleva a cabo la formación de placa aterosclerótica en las paredes arteriales. La oxidación de las LDL puede ser inducida tanto por macrófagos y también catalizada por iones de metales como el cobre. Muchos estudios demuestran que algunos de los flavonoides pueden proteger las LDL de ser oxidadas por cualquiera de estos mecanismos [32].

Contraindicaciones de los flavonoides

Efectos adversos aún no han sido detectados en el ser humano por el consumo de flavonoides naturales de los alimentos, a diferencia de aquellos encapsulados en suplementos. Esto según la literatura, ha sido explicado por la baja disponibilidad, el

rápido metabolismo y la eliminación de la mayoría de los flavonoides mediante el sistema. Sin embargo, sí se ha encontrado que existe interacción entre algunos flavonoides y medicamentos. En el caso de los cítricos, estudios sugieren que la presencia del flavanone naringenin principalmente en la toronja (*C. paradisi*) por el alto contenido en esta fruta, además de otros componentes como los furanocumarines de esta misma fruta han sido responsables de algunas reacciones con medicamentos. Estos componentes actúan en la inhibición de dos diferentes sistemas encargados del metabolismo de diferentes drogas. El primer sistema es la Glicoproteína-p, sistema encargado de transportar medicamentos y disminuir la absorción de éstos. Algunos de estos medicamentos incluyen: agentes antihipertensivos, antiarrítmicos, agentes quimioterapéuticos, agentes antifungales, inhibidores de proteasa para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), agentes inmunosupresores, algunos antibióticos, el Digoxin (agente anticonvulsivo) y receptores antagonistas de H₂. El consumo de toronja se ha encontrado que aumenta la bio-disponibilidad de medicamentos y sustratos de la glycoproteina-p, llevando a riesgo de toxicidad de éstos. El otro sistema incluye la enzima intestinal P450 (CYP), ésta es encargada del metabolismo de drogas como: inhibidores de la reductasa HMG-CoA (atorvastatin, lovastatin y simvastatin), antagonistas de canales de calcio, agentes antiarrítmicos, inhibidores de proteasa del VIH, inmunosupresores, antihistamínicos, benzodiazepinas y drogas para tratar la disfunción eréctil (sildenafil). El consumo de toronja inhibe la actividad de esta enzima, permitiendo así un almacenamiento del medicamento creando un exceso del mismo en el cuerpo humano [33].

Recomendaciones (DRI's) para fitoquímicos

Aún no existen recomendaciones de consumo específicas para la variedad de fitoquímicos. Sí se ha recomendado de manera general el aumentar el consumo de los alimentos que los puedan contener. De acuerdo al “Food and Nutrition Board, Institute of Medicine” encargados de determinar las recomendaciones dietarias de nutrientes “Dietary Reference Intakes” (DRI's), aún está en desarrollo y evaluación los reportes para compuestos bioactivos como fitoestrógenos y fitoquímicos, además del rol del alcohol en la salud y en enfermedades.

Vitamina C

Definición

La vitamina C es un compuesto altamente polar, entonces altamente soluble en agua, e insoluble en solventes no-polares. La vitamina C actúa como agente reductor en reacciones de hidroxilación o reacciones de oxido-reducción (son reacciones donde ocurre transferencia de electrones entre especies, permitiendo la oxidación de una especie y llevando la otra especie a ser reducida). Es considerada como el agente reductor más reactivo que puede ocurrir en forma natural en el tejido vivo, también es considerada como nutriente esencial para el ser humano, ya que éste no puede sintetizarlo por sí solo [34].

Comportamiento químico de la molécula

La vitamina C pura, es un sólido blanco cristalino soluble en agua y en alcohol etilo. Su nombre químico se conoce como ácido ascórbico.

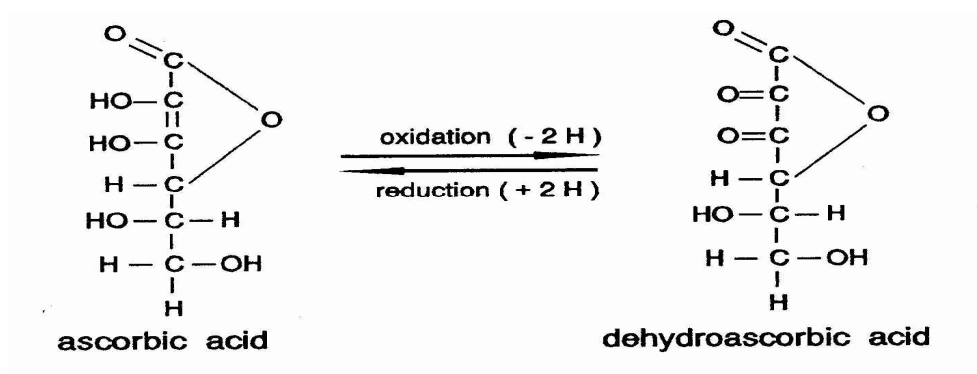


Figura 2: Molécula de Ácido ascórbico oxidada y reducida [34].

Debido a que esta vitamina es un ácido, es razonablemente estable en soluciones ácidas, pero en soluciones básicas o neutrales es fácil y rápidamente oxidada por oxígeno disuelto. La oxidación de la vitamina C, ácido ascórbico, ocurre por la pérdida de dos átomos de hidrógeno, según la molécula es convertida en ácido dehydroascórbico (Fig. 2).

Análisis para la detección de ácido ascórbico

De acuerdo a la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) se establece como método aprobado para la detección de vitamina C, el Método Tillmans. Éste es una titulación de oxidación-reducción (Figura 3), donde se permite la oxidación del

ácido ascórbico presente en la materia evaluada mediante un tinte orgánico conocido como 2,6-dicloroindofenol (DCP) [35]. Las reacciones de oxidación y de reducción ocurren simultáneamente; por lo que según la vitamina C es oxidada, el DCP es reducido, ganando los dos átomos de hidrógeno que pierde cada molécula del ácido ascórbico presente. Según el DCP es reducido, ocurre un cambio en color en el tinte de rojo a incoloro. Debido a que la reacción entre el DCP y el ácido ascórbico es sumamente rápido, este cambio en color puede ser utilizado como índice del punto en la titulación; donde todo el DCP ha sido consumido o reducido por la vitamina disponible. En el procedimiento de titulación esta observación visual es conocida como el punto final, donde en este caso mientras haya vitamina C sin ser oxidada la solución será una incolora, una vez se concluyan las reacciones de óxido-reducción, la solución presentará un color rosado translúcido, dando la conclusión a la vitamina C disponible.

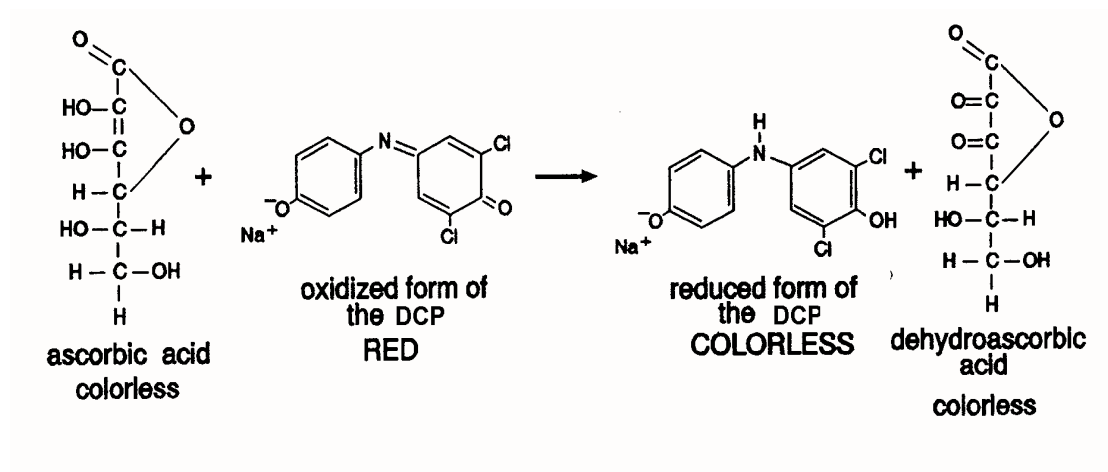


Figura 3: Reacción de oxidación del Ácido ascórbico [34].

Características funcionales de la vitamina C

A diferencia de la mayoría de los mamíferos, los seres humanos no poseen la habilidad de fabricar su propia vitamina C. Esta vitamina debe ser obtenida a través de la dieta, ya que es considerada como un nutriente esencial en el sistema humano; esto debido a sus importantes roles en el funcionamiento de este sistema. Dentro de los roles que posee, se encuentra la síntesis de colágeno (componente estructural importante en los vasos sanguíneos, tendones, ligamentos y huesos). También juega un rol importante en la síntesis de norepinefrina (crítico neurotransmisor para la función cerebral). Además, la vitamina C se requiere para la síntesis de carnitina (pequeña molécula esencial en el transporte de grasas a los organelos celulares llamados mitocondrias), para la conversión de energía [36]. Estudios recientes también sugieren que la vitamina C está envuelta en el metabolismo de colesterol a ácidos biliares, lo cual a su vez tiene implicaciones en los niveles de colesterol en sangre y la incidencia de colelitiasis (cálculos o piedra en vesícula) [37]. La vitamina C también es considerada como un antioxidante altamente efectivo. Aún en cantidades pequeñas, esta vitamina puede proteger moléculas indispensables en el cuerpo, tales como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos (DNA y RNA). Ésta los protege de daños causados por radicales libres (moléculas altamente reactivas con oxígeno) o por especies de oxígeno reactivo que puede ser generado por el metabolismo normal o por exposición a toxinas y contaminantes (Ej. Fumar). La vitamina C también es capaz de regenerar otros antioxidantes presentes como por ejemplo la vitamina E [38].

Vitamina C como precursor de salud

El Instituto Americano de Investigación en Cáncer recientemente revisó sobre 4,500 estudios; logrando un filtrado para formar o dar parte a un solo reporte: “Alimento, Nutrición y la Prevención del Cáncer: Una Perspectiva Global: El cáncer es una enfermedad prevenible”. Continúan las recomendaciones manteniendo el mismo dato: El comer cinco o más servicios de frutas y vegetales por día puede prevenir sobre el 20% de todos los casos de cáncer, incluyendo desde cáncer de colon, cáncer gástrico, de pulmón, esófago, seno, vejiga, páncreas y próstata [39]. Además de la prevención de los diferentes tipos de cáncer, también se ha encontrado que sirven como tratamiento y/o prevención de muchas otras condiciones o enfermedades.

Uno de los mayores combatientes del cáncer lo son los antioxidantes. Estos componentes de los alimentos ayudan a estabilizar los radicales libres y logran detener el daño celular causado por el cáncer. A través de este estudio se analiza la presencia de vitamina C o ácido ascórbico, considerado como el antioxidante hidrosoluble de mayor importancia. De acuerdo a esta capacidad de antioxidante también se logra inhibir la formación de nitrosaminas (carcinógenos), permitiendo así reducir la incidencia de los diferentes tipos de cáncer antes mencionados, entre otros [40].

La vitamina C juega un importante rol en el funcionamiento del cuerpo humano, es un componente presente en todos sus órganos. Sin la vitamina C el cuerpo no sería capaz de absorber otros dos importantes componentes: hierro y ácido fólico. Según

estudios se encontró que la absorción de hierro, ya sea de origen animal o vegetal, ocurre mejor, cuando se toma al mismo tiempo con una fuente rica en vitamina C. Un consumo de 75mg de vitamina C proveniente de alimentos, promueve un aumento de seis veces más la absorción del hierro heme en comparación al consumo de hierro sin la dosis de vitamina C en la misma comida [41]. Otra importante característica que se le ha encontrado a la vitamina C, es su capacidad de prevención o disminución de la incidencia de la enfermedad de Alzheimer. Según un estudio realizado en 1988, [42], y luego confirmado por otro estudio, [43], al menos un consumo diario de 500mg de vitamina C o 400 IU de vitamina E promueven un beneficio razonable de protección contra esta enfermedad. También estudios demuestran que el uso de vitamina C y E disminuyen marcadamente la progresión de la enfermedad de Parkinson. Luego se detectó que la vitamina E, por si sola, no promueve este retraso de la enfermedad, sin embargo la vitamina C, por si sola, promueve este retraso del mismo modo que en unión con la vitamina E [44]. También la vitamina C en su capacidad de antioxidante se encontró que inhibe la oxidación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) permitiendo así que éstas mantengan su capacidad cardioprotectora [45].

Vitamina C en los alimentos

Además de sus funciones como un nutriente esencial, el ácido ascórbico es ampliamente utilizado como un ingrediente/aditivo, esto por sus propiedades reductoras y de antioxidante. De esta manera provee o permite protección o

preservación a la materia a la cual se añade El ácido ascórbico puede obtenerse fácilmente a través de la fuente dietaria, siendo las frutas principalmente el grupo de alimentos de mayor contenido, figurando los cítricos como fuente excelente; también algunos vegetales pueden ser catalogados como buena fuente de este nutriente.

Según se puede apreciar mediante la Tabla 3 las cantidades de vitamina C varían por alimento y por porción o servicio del mismo.

Tabla 3: Contenido de Vitamina C en alimentos [46].

Alimentos	Porción	Vitamina C (mg)
Jugo de China	½ Taza (4oz.)	62
Jugo de Toronja	½ Taza (4oz.)	47
China	1 mediana	70
Toronja	½ mediana	44
Fresas	1 Taza	82
Tomate	1 mediano	23
Pimienta roja dulce	½ Taza, molida cruda	141.6
Brécol	½ Taza, cocida	58
Papas	1 mediana, asada	26

Recomendaciones (DRI's) de vitamina C

La deficiencia severa de vitamina C es conocida por siglos como una potencial enfermedad llamada, escorbuto. Para finales de los años 1700's la marina británica reconoció que el escorbuto podría ser curado por el consumo de cítricos (chinas y/o limones), aún así la vitamina C no fue aislada y descubierta hasta inicio de los años

1930 [47]. Los síntomas del escorbuto incluyen contusión y fácil sangrado, pérdida de cabello y dientes y dolor e inflamación en las uniones “joints” o coyunturas. Estos síntomas surgen por la debilidad ocasionada a los vasos sanguíneos, tejido conectivo y huesos por la deficiencia en colágeno. Otros síntomas también pueden ocurrir como la fatiga, esto ocasionado por la disminución en los niveles de carnitina, necesaria para la derivación de energía proveniente de la grasa, o por la disminución del neurotransmisor norepinefrina. El escorbuto es raro en países desarrollados, ya que según estudios puede ser prevenido por tan solo 10mg de vitamina C por día. Sin embargo, casos recientes han ocurrido en niños y ancianos en dietas muy restringidas [48].

En Estados Unidos, la ingesta recomendada por día (DRI's) para la vitamina C fue revisada recientemente para lo que anteriormente era 60mg/d para hombres y mujeres adultos. Los DRI's continúan principalmente basados en la prevención de enfermedades por alguna deficiencia y en la promoción de óptima salud. Para fumadores la ingesta recomendada es 35mg/d mayor que para los no fumadores, esto debido al estrés oxidativo que presentan los fumadores debido a las toxinas del humo del cigarrillo y porque presentan niveles bajos en vitamina C. Las recomendaciones de acuerdo a la edad y sexo de la persona se resumen a través de la Tabla 4.

Tabla 4: Recomendaciones (DRI's) para Vitamina C [49].

Ingesta Dietaria Recomendada (DRI) para Vitamina C			
Etapas de vida	Edades	Hombres (mg/día)	Mujeres (mg/día)
Infantes	0 – 6 meses	40 (IA)*	40 (IA)*
Infantes	7 – 12 meses	50 (IA)*	50 (IA)*
Niños	1 – 3 años	15	15
Niños	4 – 8 años	25	25
Niños	9 – 13 años	45	45
Adolescentes	14 – 18 años	75	65
Adultos	19 años o más	90	75
Fumadores	19 años o más	125	110
Embarazadas	18 años o menos	-	80
Embarazadas	19 años o más	-	85
Lactantes	18 años o menos	-	115
Lactantes	19 años o más	-	120

IA: Ingesta adecuada

Ácido fólico

Definición

El ácido fólico (2-amino-4-hydroxy-6-methyleneamino benzoil-L-glutamic acid pteridine) es un compuesto pteridino heterocíclico con la siguiente estructura (Fig. 4) [50]. Es una vitamina perteneciente al complejo B, por lo que es hidrosoluble.

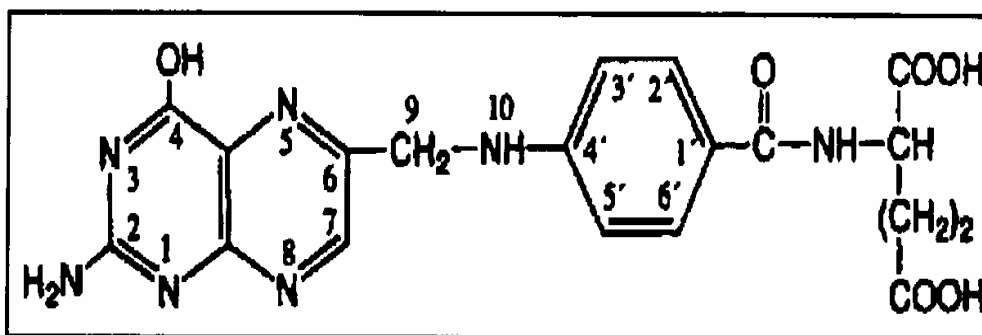


Figura 4: Estructura del Ácido fólico.

Comportamiento químico de los compuestos de folato

El ácido fólico, generalmente, no es encontrado de forma natural en los alimentos. Sin embargo, es la forma sintética más común y estable que existe, por lo que se utiliza para la fortificación de alimentos y para la preparación de fármacos y suplementos.

Folato es el nombre genérico que se le ha dado a los diferentes compuestos basados en la estructura del ácido ptericoico, conjugado con uno o más L-glutamatos unidos a través del grupo carboxilo del amino ácido (Fig. 5) [50].

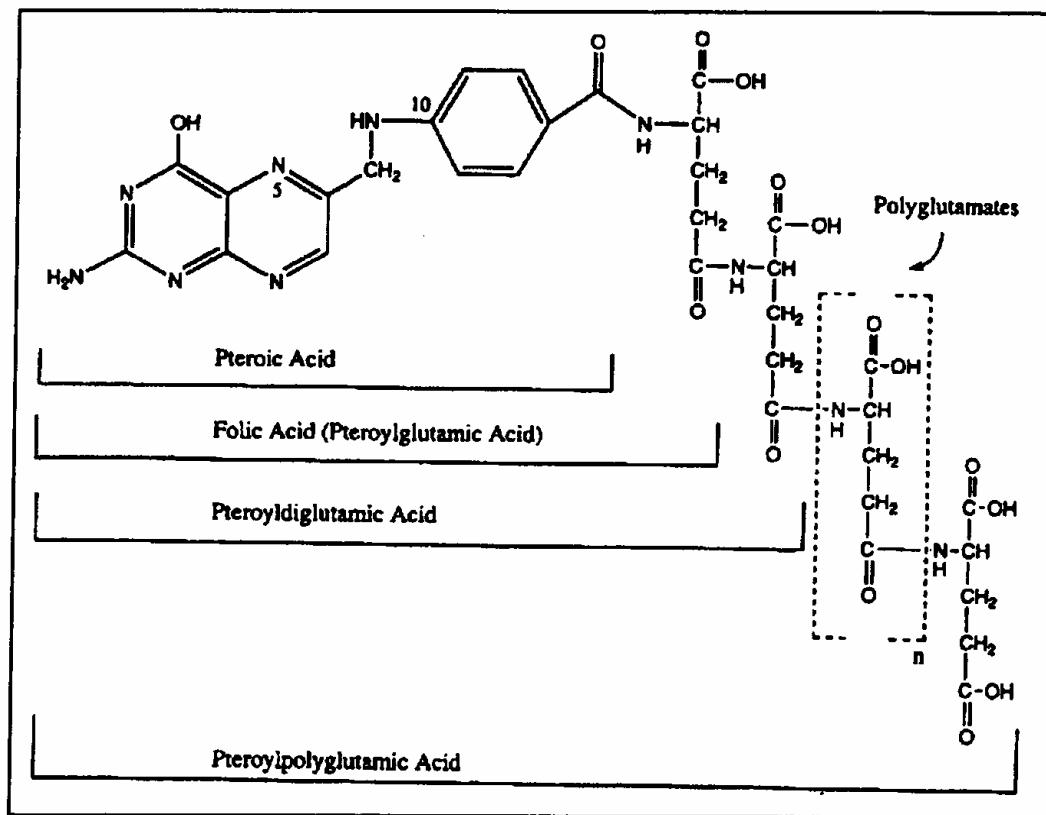


Figura 5: Estructura de los compuestos de Folato.

Las formas naturales en que se encuentra el folato son aquellas donde el anillo pteridina es reducido con o sin sustitución en el carbono de la posición 5 y 10. El folato 5Me-H₄ es la forma en que circula en el torrente sanguíneo en los seres humanos y algunas veces es utilizado también para la fortificación de alimentos.

Los compuestos de folato más importantes que surgen de forma natural en los alimentos lo son el 5 methyl tetrahydrofolato (5Me-H₄ folato), 5-formyl tetrahydrofolato (5HCO-H₄ folato) y el tetrahydrofolato (H₄ folato). Siendo el 5-methyltetrahydrofolato el principal en el torrente sanguíneo de los seres humanos y el único encontrado en cítricos según establece la literatura [51]. Los compuestos de

folato son considerados como la vitamina más inestable del complejo B, esto, principalmente por calor y oxidación. Además de que puede surgir la interconversión entre cada una de las moléculas, dependiendo del ambiente oxidativo y del pH del medio en que se encuentre. Otro compuesto de folato que puede encontrarse en alimentos o fluídos biológicos es el 10-formyltetrahydrofolato (10 HCO-H₄ folato). Este compuesto puede también surgir o formarse como intermediario o como entidad semi-estable durante el análisis en la detección de folatos, especialmente, si la extracción utilizada es acídica. El grado en que este compuesto surge en los alimentos aún se desconoce ya que es muy inestable. Estudios previos han demostrado que el 10 HCO-H₄ folato es convertido a 5HCO-H₄ folato durante la extracción con calor [51]. Es muy poca la información confiable en la literatura en relación al surgir natural de este componente (10 HCO-H₄ folato) en los alimentos. Debido a que este componente no está disponible en forma comercial, no pudo ser determinado a través de este estudio. Si fuese el principal componente para investigar, es de suma importancia que el método de extracción de folato no sea uno de calor, como el utilizado en este análisis, esto debido a la inestabilidad que presenta este componente.

Análisis para la detección de folato

La detección de este nutriente en un alimento es una de mucha cautela; esto a consecuencia de las cantidades tan bajas en que se encuentra en los alimentos, también al alto nivel de inestabilidad que posee. Por muchos años el folato total en

un alimento ha sido determinado con diferentes grados de precisión, principalmente mediante ensayos microbiológicos [52]. Estos ensayos permiten conocer el contenido total de folato en un alimento mediante la utilización de diferentes cultivos de bacterias, este método es uno de larga duración además de que no permite conocer cada uno de los compuestos individuales de los folatos presentes en la muestra. Además del tiempo prolongado de análisis, otra desventaja de este medio es la interferencia de factores en los cultivos que puedan contaminarlos. Los datos existentes sobre las diferentes formas o compuestos de folato presentes en un alimento son resultados más recientes y los métodos de detección del mismo continúan en desarrollo y optimización. Varias técnicas han sido utilizadas incluyendo bio-ensayos, ensayos microbiológicos, “ligandbinding” y radio-ensayos. El ensayo microbiológico con el microorganismo *Lactobacillus casei* para la determinación de folato total en un alimento es la técnica clásica y aprobada por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos, por sus siglas en inglés AOAC [52]. La detección mediante el sistema de cromatografía líquida de alta ejecución (HPLC) en comparación con la técnica aprobada actualmente ofrece ser una técnica avanzada y de gran precisión esto de acuerdo a estudios realizados por el Food Standard Agency para el USDA. Según ésta agencia se han realizado análisis para diferentes alimentos simultáneamente utilizando estas dos técnicas, obteniendo resultados similares para ambas, con poca o ninguna diferencia significativa. Las técnicas utilizando el sistema de HPLC también poseen grandes ventajas como el permitir mayor rapidez en la detección total de folatos, además de permitir resultados individuales de los diferentes tipos de folato presentes en los alimentos, esto a diferencia del método

microbiológico. Aún existe controversia respecto a la precisión existente por esta nueva técnica, existen estudios que concluyen igual o mayor precisión; y otros que reportan diferencias entre ambos métodos [51]. Según científicos del “Food Standard Agency” cualquier método que intente la determinación de folato en alimento u otras muestras biológicas debe considerar las siguientes áreas (Fig. 6).

Los folatos deben ser primero extraídos de la matriz del alimento. Esto es usualmente acompañado por tratamiento de calor con soluciones amortiguadoras que contengan antioxidantes y a un pH cercano al neutral, con variables importantes como: el tiempo de calentamiento, temperatura, tipo y concentración de antioxidantes utilizados. Luego se añade una composición enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de estos componentes. El efecto de componentes no folatos en la muestra debe ser eliminado antes de la determinación de folato para evitar interferencias. Esta limpieza es requerida si el método de HPLC es el utilizado para la detección, esto para mayor claridad en los resultados obtenidos. Finalmente, es la etapa de la determinación. Para las formas naturales de folato se requiere el detector de luz ultravioleta (UV) además de un detector de fluorescencia; a diferencia de la detección de ácido fólico la cual solo requiere evaluación a través del detector de luz UV. También otros sistemas como electroquímico, “diodearray” y espectrometría de masa están comenzando a ser utilizados en la detección de folato, estos prometen ser técnicas con alto grado de precisión y con mayor rapidez que el método oficial actual.

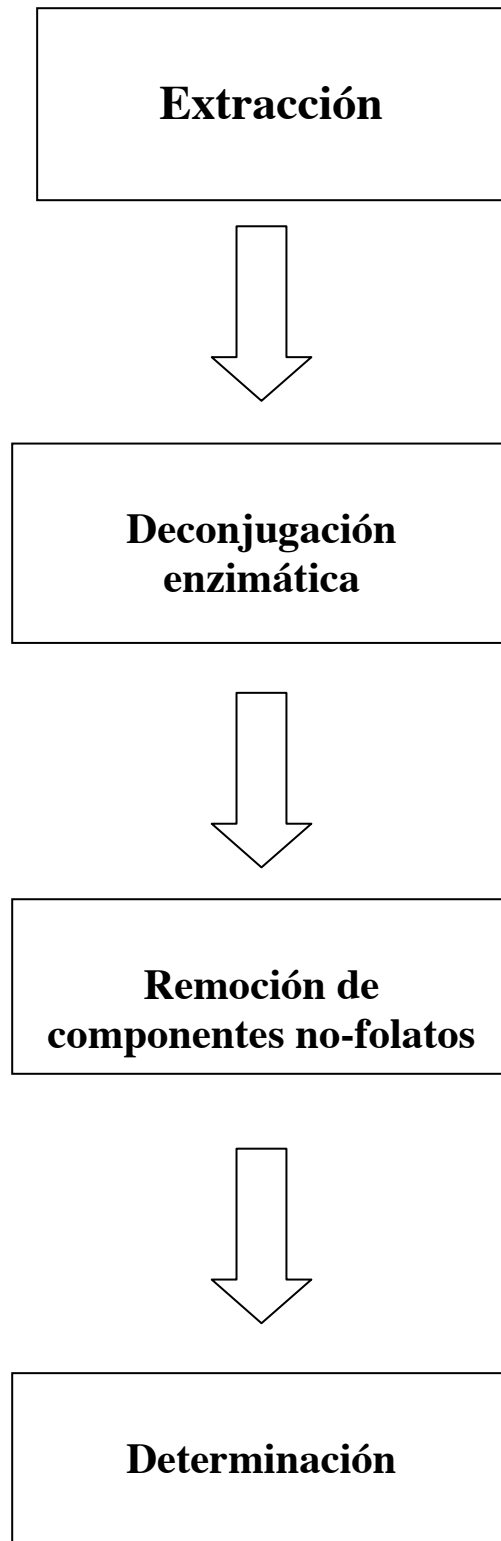


Figura 6: Etapas para el análisis de Folato en alimentos [51].

Características funcionales del ácido fólico

La determinación de folato o ácido fólico es una de mucha importancia, ya que es considerado un nutriente esencial para el desarrollo y funcionamiento del ser humano. Esto debido a su importancia en la producción del ácido deoxiribonucleico (DNA) y del ácido ribonucleico (RNA), además de su función de trabajar con la maduración de las células rojas. La deficiencia de folato, ya sea por ingesta inadecuada o por problemas metabólicos, es común en muchas partes del mundo. Esta deficiencia puede resultar en problemas de división celular y de síntesis de proteínas, ambos procesos críticos en el crecimiento y desarrollo de tejidos. También el reemplazo de células rojas y de células del tracto gastrointestinal presenta alteraciones, por lo que puede surgir un tipo de anemia conocida como anemia megaloblástica, además de deterioro del sistema digestivo [53]. En particular, la deficiencia presente en mujeres previo a la concepción se ha encontrado que puede llevar a defectos en el tubo neural en el feto lo cual ha sido considerado como responsable de la fortificación de alimentos en los Estados Unidos. Por esta razón, la fortificación de cereales y de todo producto a base de harinas es mandatorio en los Estados Unidos a una razón de $140\mu\text{g}/100\text{g}$ de alimento. Niveles mayores se recomendarían para brindar mayores beneficios, pero existe el riesgo de enmascarar la deficiencia de cobalamina (vitamina B12); debido a esto la fortificación aún continúa siendo un motivo de controversia [54].

Ácido fólico como precursor de salud

Además de las importantes características funcionales de esta vitamina del complejo B, también se le ha asociado a un sinnúmero de condiciones las cuales puede prevenir. De acuerdo a estudios realizados, el ácido fólico según antes mencionado tiene la capacidad de prevenir defectos del tubo neural, defecto severo de nacimiento, esto por su función en permitir aumentar el sustrato disponible para la reductasa termolabile (5,1.0 methylenetreta hydrofolate). Esto resultaría en un aumento en la conversión del amino ácido homocisteína al amino ácido metionina (amino ácidos encontrados en el torrente sanguíneo), llevando a eliminar o a reducir el riesgo de que no cierre el tubo neural [55]. Otros estudios también demuestran que una dieta alta en ácido fólico y vitamina B6 puede ayudar a disminuir el riesgo de cáncer del seno. Los resultados sugieren que las mujeres que quieren protegerse contra el cáncer del seno deben tener una dieta alta en estos nutrientes, específicamente, aquellas mujeres que consumen bebidas alcohólicas deben prestar atención especial a la ingesta de ácido fólico ya que también las protege de los efectos negativos causados por el alcohol. Esto según el estudio presentado en el *Journal of the National Cancer Institute* sobre la relación del ácido fólico y la vitamina B6 como modo de protección contra el cáncer del seno [56].

Estudios recientes también establecen el consumo de ácido fólico como uno de prevención de ataques al corazón ocasionados por niveles elevados de homocisteína. Según estudios, el consumo adecuado de alimentos ricos en folato (aproximadamente 392mg/d) está asociado con la disminución de un 22% de los niveles de homocisteína en el cuerpo [57]. Otro estudio realizado por científicos del *National Institute of*

Aging publicado en enero de 2002 asocia la deficiencia del ácido fólico en el cuerpo con aumento en la susceptibilidad de la Enfermedad de Parkinson. Según este estudio, se detectó en ratas que aquellas con niveles bajos de folato en la sangre presentaban niveles elevados de homocisteína en sangre y cerebro. Este exceso de homocisteína provocaba daño al DNA de las células nerviosas de la sustancia nigra (estructura del cerebro encargada de producir dopamina). Esta pérdida en producción de dopamina causaba disfunción a las células nerviosas llevando a las ratas a la inhabilidad de dirigir o controlar sus movimientos de forma correcta [58]. Al relacionar este estudio con seres humanos se encuentra que las personas con esta enfermedad presentaban niveles bajos de ácido fólico en sangre, aunque esto no puede determinarse si fue la causal de la enfermedad o si fue causado por mala alimentación debido a la enfermedad. Pero basado en este estudio, Dr. Mattson; investigador principal del estudio especula que el consumo adecuado de ácido fólico, ya sea por dieta o suplemento, puede ayudar a proteger el envejecimiento cerebral y el que no haya producción de dopamina causando así el Parkinson u otra enfermedad neuro-degenerativa [59]. Esta capacidad del ácido fólico para disminuir los niveles de homocisteína en el cuerpo, además de ayudar en la prevención de las condiciones antes mencionadas, también se le otorga la reducción en el riesgo de demencia y de la enfermedad de Alzheimer. Según estudios realizados, se detectó, que el amino ácido homocisteína en niveles elevados en sangre también está asociado a demencia y reducción cognoscitiva. Los resultados sugieren que controlar los niveles de este amino ácido en la edad mediana reduce grandemente el riesgo de desarrollar demencia en edad más avanzada [60].

Ácido fólico en los alimentos

De acuerdo a los datos establecidos del contenido de folato en los alimentos, éstos son encontrados principalmente en legumbres, vegetales de color verde, hígado, la levadura y algunos cítricos; estos últimos considerados como buena fuente de esta vitamina [61]. Para obtener una idea sobre las cantidades en un alimento, según la base de datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) podemos encontrar alrededor de $74\mu\text{g}$ de folato total en 8oz de jugo de china fresco y aproximadamente $25\mu\text{g}$ en 8oz de jugo de toronja fresco, otros datos de alimentos pueden obtenerse mediante la tabla 5 [46].

Tabla 5: Contenido de Ácido fólico en alimentos [46].

Alimento	Porción	Ácido fólico μg
Brécol, Crudo	1 Taza	55
Brécol, Hervido y Congelado	1 Taza	103
Cereal de arroz, listo para servir	$\frac{3}{4}$ Taza	346
China, Jugo concentrado diluido	1 Taza	110
China, Jugo fresco	$\frac{1}{2}$ Taza	37
China, Fresca	1 Taza	54
Fresas, Frescas	1 Taza	40
Tomate, Fresco	1 Taza	27
Toronja, Jugo Fresco	$\frac{1}{2}$ Taza	12.5
Toronja, Blanca Fresca	1 Taza	25
Papa, Asada con Piel	1 Mediana (202g)	57

Recomendaciones (DRI's) de ácido fólico

De acuerdo a las recomendaciones dietarias (DRI's) de 1998 en Estados Unidos se establece una ingesta diaria de $400\mu\text{g}$ en mujeres y hombres adultos (25 años o más)

saludables para satisfacer las necesidades básicas [62]. Estos números reflejan un aumento al compararse con las recomendaciones previas las cuales indicaban 180-200 μg /día. Este cambio surge debido a que en las últimas décadas se encontró la necesidad de niveles más altos de ácido fólico, 400 μg /día, principalmente para mujeres en edad reproductiva, como modo de prevención de defectos del tubo neural, esto según el Centro de Control y Prevención de enfermedades (CDC) para 1992. Las recomendaciones generales de acuerdo a la etapa de vida de la persona pueden ser obtenidas mediante la Tabla 6.

Tabla 6: Recomendaciones (DRI's) para Ácido fólico [62].

Ingesta Dietaria Recomendada (DRI) para ácido fólico			
Etapas de vida	Edades	Hombres (μg/día)	Mujeres (μg/día)
Infantes	0 – 6 meses	65 (IA)*	65 (IA)*
Infantes	7 – 12 meses	80 (IA)*	80 (IA)*
Niños	1 – 3 años	150	150
Niños	4 – 8 años	200	200
Niños	9 – 13 años	300	300
Adolescentes	14 – 18 años	400	400
Adultos	19 años o más	400	400
Embarazadas	18 años o menos	-	600
Embarazadas	19 años o más	-	600
Lactantes	18 años o menos	-	500
Lactantes	19 años o más	-	500

*IA: Ingesta Adecuada

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de la chironja

Selección de la muestra

Las chironjas evaluadas se obtuvieron de la Estación Experimental Agrícola de Isabela, P.R. (Apéndice Fig. 3 y 4). El área provee cuatro bloques con siembras de chironjas, en un suelo de la serie Coto (Typic Hapludox, arcilloso caolinítico, isohipertérmico) con un pH de 5.9 y buen drenaje; cada bloque con uno o dos árboles injertados en las cuatro combinaciones injerto-patrón (Cleopatra, Naronja, Sun Chu Sha y Hrs812 Sunki-Benecke trifoliolate orange). En cada uno de los bloques se recolectaron dos frutas de cada variedad mediante un muestreo aleatorio, donde en el caso que existieran dos árboles, se seleccionó al azar el que proveería la fruta. La fruta se cosechó en su punto óptimo de consumo y se analizó inmediatamente.

Preparación de la muestra

Una vez cosechadas las frutas se lavaron y se rebanaron en mitades para obtener el jugo mediante un exprimidor eléctrico. Se midieron los sólidos solubles totales (grados Brix) del jugo de cada chironja a través de un refractómetro, esto para determinar que están en su punto óptimo de consumo. Los grados Brix recomendados en chironja fluctúan entre (9 – 12 grados) [64]. De estar en su punto óptimo se procedió a evaluar la fruta inmediatamente para los diferentes metabolitos a

determinar, de lo contrario se descartó y se comenzaba a evaluar otra fruta. Para cada uno de los análisis se utilizó el jugo de la fruta inmediatamente extraído, esto para evitar principalmente oxidación de vitamina C, cambios en folato, así como en fitoquímicos.

Análisis de los componentes nutricionales

Detección de Flavonoides

Análisis cualitativo de flavonoides en la chironja [65].

1. Extracción e hidrólisis:

Se obtuvieron 15ml de jugo de chironja y se le añadieron 40ml de metanol acuoso al 62.5% (conteniendo 2g/l BHA), luego se añadió 10ml de HCl (6M) cuidadosamente. Se calentó la muestra en un baño de vapor hasta alcanzar temperatura de 90 °C. Se colocó en sistema de reflujo por espacio de 2 horas, llevando luego a enfriar en el refrigerador. Luego se diluyó la muestra con metanol hasta alcanzar volumen de 100ml y se pasó a sonicar por 5 minutos para formar el extracto final. Aproximadamente 3ml del extracto final se filtraron a través de un filtro de 0.45 micrómetros (Santorius Minisart) antes de inyectar 20 μ l al sistema de HPLC. Cada muestra se preparó y analizó en duplicado.

2. Extracción e hidrólisis de Flavonoides – Glycósidos

Se obtuvo 0.5g de muestra y se le añadieron 20ml de Metanol ac. (62.5%). Se dejó en reposo por 10 minutos y luego de sedimentarse la muestra se obtuvo una

alícuota de 2ml y se le añadió 2ml de agua (Grado HPLC). Se llevó a pH de 2.5 mediante HCl y NaOH. Se filtró la muestra a través de un filtro de $0.45\mu\text{m}$ y luego se inyectó $20\mu\text{l}$ a través del sistema de HPLC. Cada muestra se realizó en duplicado.

3. Sistema HPLC

En el sistema de Cromatografía líquida de alta ejecución por sus siglas en inglés HPLC (Apéndice Fig. 5), se utilizó una columna de fase reversa Carbone 18 (250 x 4.6 micrómetros, 5 micrómetros). La fase móvil consistió de metanol-agua (30/70 v/v) con 1% de ácido fórmico (A) y metanol 100% (B). El gradiente fue de 25-86% (B) en 50 minutos a una razón de flujo de 1ml/min, para un largo de onda de 285 - 325 nm. Para la detección de flavonoides – glycosidos; se utilizó una fase móvil de 1% ácido fórmico en agua HPLC (A) y 100% acetonitrilo (B). El gradiente fue de 5 – 60% B en 60 minutos a una razón de flujo de 1ml/min, para un largo de onda de 285 – 325 nm.

4. Estándares evaluados

Se utilizó una solución comercial con una mezcla de los siguientes flavonoides: naringenin, kaempferol, myricitin, quercetin y rutin (flavonoide-glycosido); siendo éstos algunos de los principales flavonoides encontrados en cítricos. Se preparó el estándar a diferentes concentraciones (0.2mg/ml; 0.5mg/ml; 1.0mg/ml). Se pesó el estándar y se llevó a volumen con metanol hasta lograr las concentraciones mencionadas.

5. Validación del Método

Se validó el método mediante la técnica de “spiked”, donde se realizaron cuatro réplicas para una muestra de leche íntegra en polvo. Se escogió esta muestra por ser

una de origen animal, además de ser una recomendada por la metodología por su alto proceso de elaboración, lo cual elimina muchos de sus componentes naturales que puedan interferir. Se procedió a evaluar un blanco consistiendo de leche diluida en agua (razón de 1:1), según sus instrucciones de preparación y se llevó a cabo el procedimiento realizado a la chironja. Se obtuvo otra muestra de leche ya preparada y se le añadió el estándar evaluado logrando dos diferentes concentraciones ($0.3\mu\text{g/ml}$) y ($0.5\mu\text{g/ml}$) luego se continuó con el mismo tratamiento que para cada una de las muestras de chironja evaluadas. Se analizó cada muestra mediante el sistema de HPLC para determinar la presencia de cada uno de los componentes añadidos. Para esto se utilizó el mismo gradiente y la razón de flujo utilizado para la detección de flavonoides y el de flavonoides-glycósidos.

Detección de Vitamina C

Determinación de ácido ascórbico mediante el Método de Tillmans (Titulación de 2,6 - Dicloroindofenol) [23].

1. Preparación de soluciones:

a. Ácido metafosfórico-acético:

Para 500ml, se pesó 15g de ácido metafosfórico y se le añadió 40ml de ácido acético y 200ml de agua destilada para disolver, luego se llevó a volumen de 500ml y se filtró la solución. La solución tiene duración de una semana una vez preparada.

b. Solución de Indofenol (Tinte para titular)

Para 200ml, se pesó 50mg de 2,6-dicloroindofenol y se disolvieron en 50ml de agua destilada y se pesó 42mg de Bicarbonato de sodio, se agita vigorosamente y luego de disolverse se lleva a volumen de 200ml y se filtra la solución. La solución tiene duración de una semana una vez preparada.

2. Estandarización del tinte:

Se colocaron 2 ml de solución de ácido ascórbico estándar (1 mg/ml) en tres diferentes matraces de 50 ml cada uno, conteniendo 5 ml de solución de ácido metafosfórico – acético *(A1a). Se tituló cada uno con la solución de indofenol *(A1b) hasta obtener un color rosado que persistiera por 5 segundos. Simultáneamente se titularon 3 blancos, los cuales consistían de 7 ml de la solución de ácido metafosfórico - acético llevado a volumen de 15 ml con agua destilada.

3. Preparación de la muestra:

Se obtuvieron 2 ml de la muestra y se pesaron, se añadieron a un matraz (50ml) con 5 ml de ácido metafosfórico acético. NOTA (Si la muestra permanecía con mucho color se añadían 20 ml de agua y 5 ml de metafosfórico acético). Se tituló con la solución de indofenol hasta obtener un color rosado que persistía por 30 segundos.

4. Contenido de ácido ascórbico

Fórmula:

$$\frac{C * V * FD * 100}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

Donde: C = mg de ácido ascórbico/ml tinte

V = ml tinte para titular muestra

FD = factor de dilución utilizado

Detección de Folatos [12]

1. Preparación de soluciones:

a. Amortiguador de fosfato (1/15M)

Para 1 litro, se pesaron 3.6g KH_2PO_4 y 8.3g K_2HPO_4 y se disolvieron en un litro de agua (Grado HPLC), con 15 g de Ascorbato de sodio como antioxidante.

b. Amortiguador de NaCl

Para 1 litro, se pesaron 58g NaCl y se añadió a 1 litro del amortiguador de fosfato (1/15M) y se lleva a pH de 7.0 ± 0.05 .

2. Extracción y deconjugación enzimática

Se obtuvo 80mg de Clara-Diastasa, 80mg de Tripsina y se mezclaron con 100ml de amortiguador de fosfato 1/15M *(C1a); a esta mezcla se le añadió 10g del jugo de chironja. Se homogenizó la muestra por 5 minutos mediante un sonicador y luego se

llevó a hidrólisis por 3 hrs. en un baño de agua con temperatura de 40 °C moviendo la muestra generosamente cada 30 minutos. Una vez hidrolizada se centrifugó la muestra por espacio de 20 minutos con 2000 RPM y temperatura de 15°C. Luego se filtró la muestra con un filtro de doblez (d = 23cm). Se obtuvo 10ml de la solución clara a través de una pipeta y se colocó en un matraz de 50ml con 0.8g de DEAE-Sephadex. Se movió la mezcla generosamente por 30 minutos y se dejó en reposo a temperatura ambiente por varios minutos.

3. Limpieza de la muestra

Se enjuagó la solución del matraz en una columna de filtro (Apéndice Fig. 6) con amortiguador de fosfato, pH 7.0. Luego se colectó la fracción de folatos que está en la columna añadiendo de 20-25ml del amortiguador de NaCl *(C1b), permitiendo un flujo de 1ml/min aproximadamente. Se obtuvo la solución colectada y se filtró a través de un filtro de 0.45 μ m para HPLC y se procesó inmediatamente.

4. Sistema de HPLC

Para la detección de folatos se utilizó un gradiente binario en sistema de cromatografía de alta ejecución (HPLC) con fase reversa y columna C₁₈, mediante dos detectores (fluorescencia y luz ultravioleta). El detector de fluorescencia con largo de onda de excitación de 300nm y emisión de 360nm (alta sensibilidad). El detector de luz UV midió a un largo de onda de 280nm y 290nm. El sistema utilizó una fase móvil A (95/5 Amortiguador de Fosfato/Acetonitrilo) y B (80/20 Amortiguador de Fosfato/Acetonitrilo). El volumen de inyección fue de 100 μ l con tiempo de corrida de 25 minutos. Para cada una de las muestras también se procesó un blanco.

5. Cálculo del contenido de cada componente de Folato

Se determinó la concentración de folato para cada una de las muestras mediante la interpolación en las gráficas de calibración y se calculó la concentración de cada componente de folato de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{C_1 * V * D_D * D_E * D_C * 100}{W * 1000} \quad \mu\text{g/g}$$

Donde: C_1 = concentración en ng/ml interpolados de la gráfica
 V = Volumen de extracción inicial (100 ml)
 D_D = Dilución por reconstitución
 D_E = Dilución por extracción (si se diluyó)
 D_C = Dilución/Concentración por limpieza (Normalmente = 1)
 W = Peso de la muestra

6. Estándares evaluados

A. Preparación de soluciones:

a. 0.05M solución de Borato de sodio

Se pesó 9.54g de Tetrahydroborato de sodio en un matraz volumétrico de 500ml y se llevó a volumen con agua destilada.

b. 0.05M solución de Borato con Mercaptoetanol (0.4%w/v)

Se añadió 0.4ml de mercaptoetanol a una volumétrica de 100ml y se llevó a volumen con la solución de Borato de sodio (6 A1). Preparar el mismo día de su uso.

c. Solución de Amortiguador de Fosfato; 0.1M, pH 7.0

Se pesó 7.02g de Dipotasio hidrogenado de fosfato y 2.62g de Potasio dihidrogenado de fosfato en un vaso de 500ml. Se le añadió 400ml de agua purificada y se mezcló hasta disolver. Mediante un metro de pH, se ajustó el pH de la solución

hasta aproximadamente 7.0 ± 0.05 a través de HCl (1M) o KOH (1M) según requerido. Luego se transfirió a una volumétrica de 500ml y se llevó a volumen con agua purificada.

B. Preparación de estándares ($500\mu\text{g/ml}$)

a. 5Methyl H4 folato

Se pesaron $0.0055 \pm 0.00005\text{g}$ de este estándar en una volumétrica de 10ml y se diluyó a volumen con el amortiguador de Borato de sodio con Mercaptoetanol, se mezcló hasta diluido.

b. 5Formyl H4folato (Ácido folínico)

Se pesaron $0.0108 \pm 0.00005\text{g}$ del estándar en una volumétrica de 25ml y se diluyó con el amortiguador de Borato de sodio con Mercaptoetanol, se mezcló hasta diluido.

c. H4 folato

Se pesaron $0.0125 \pm 0.00005\text{g}$ del estándar en una volumétrica de 25ml y se diluyó con el amortiguador de Borato de sodio con Mercaptoetanol, se mezcló hasta ser diluido.

d. Ácido fólico

Se pesaron $0.0100 \pm 0.00005\text{g}$ del estándar en una volumétrica de 25ml y se diluyó con el amortiguador de Borato de sodio con Mercaptoetanol, se mezcló hasta diluido.

7. Validación del Método

El método fue validado mediante el análisis de la misma fruta, la chironja. Se seleccionó la misma fruta para mantener un pH igual al del alimento evaluado, para

así poder descartar variables que estén afectando la detección. Ésta se evaluó en triplicado y se analizó por dos diferentes ocasiones. A cada muestra se le añadió una cantidad específica del estándar 5 metyl-tetrahidrofolato uno de los evaluados en la chironja. Se le añadió este estándar logrando dos diferentes concentraciones ($0.2\mu\text{g/ml}$) y ($0.3\mu\text{g/ml}$) una vez presente en el volumen total de la muestra. Luego se procesó cada muestra mediante el mismo método utilizado para las muestras de chironja y se procedió a medir mediante el sistema de HPLC. Se determinó el porcentaje del folato (5 MTHF) añadido que se recuperó para ser comparado con el porcentaje que se añadió a la muestra, y se determinó el porciento de recuperación mediante la curva de calibración realizada para éste estándar en concentraciones de $0.02\mu\text{g/ml}$ hasta $0.5\mu\text{g/ml}$.

RESULTADOS

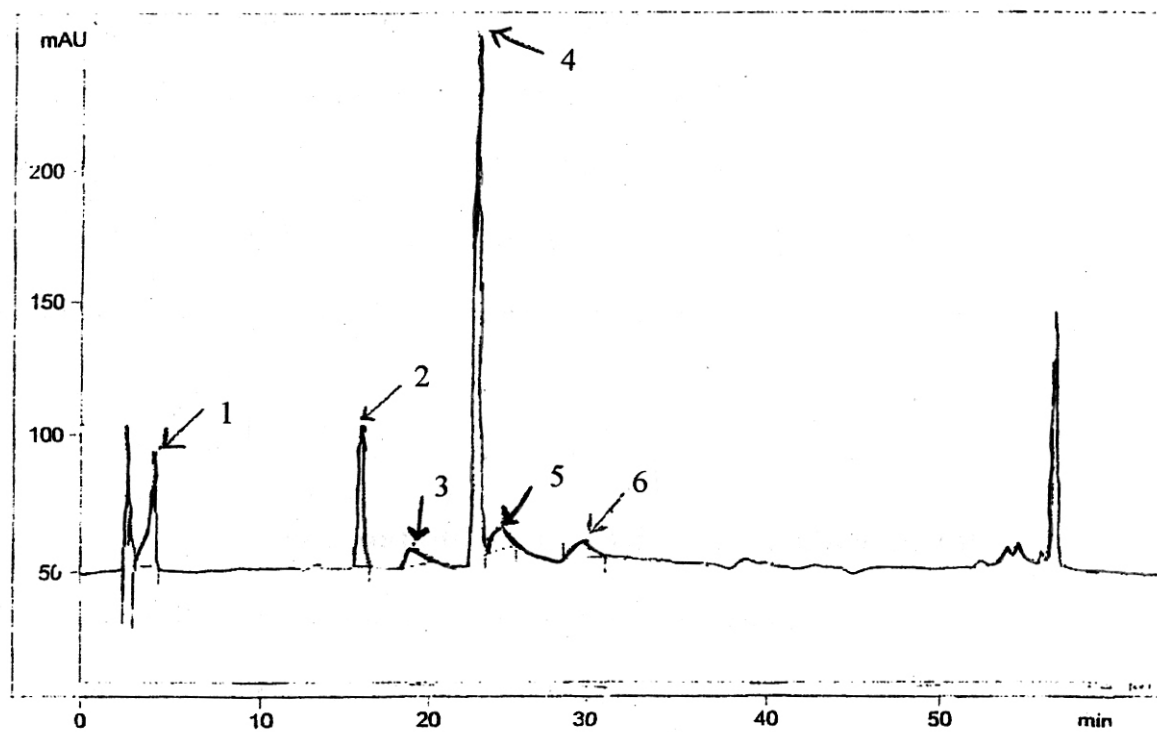
A través de la página 50 a la página 60 se presentan los datos obtenidos mediante esta investigación para los diferentes componentes estudiados en la Chironja. De acuerdo a la comparación de cromatogramas obtenidos por la separación de HPLC para la solución del estándar de flavonoides evaluados con los obtenidos para las muestras de Chironja; se resumen los flavonoides encontrados en el jugo de esta fruta a través de la Tabla 7 de este capítulo. Cada uno de estos se identifica de acuerdo a las propiedades o comportamiento que presentan para su detección (Apéndice Tabla 1). El método utilizado fue validado a través de una muestra de leche íntegra en polvo, a la cual se le añadió el estándar de flavonoides a diferentes concentraciones (Apéndice Fig. 6)

Tabla 7: Flavonoides detectados en los diferentes patrones de Chironja para cada uno de los bloques de cosecha.

Patrón/Bloque	Flavonoides				
Cleopatra	Myricetin	Naringenin	Quercetin	Kaempferol	Rutin
1	*		*	*	*
2	*		*	*	*
3	*		*	*	*
4	*		*	*	*
Naronja					
1	*		*	*	*
2	*		*	*	*
3	*		*	*	*
4	*		*	*	*
Sun Chu Sha					
1	*		*	*	*
2	*		*	*	*
3	*		*	*	*
4	*		*	*	*
Sunkie Benecke					
1	*		*	*	*
2	*		*	*	*
3	*		*	*	*
4	*		*	*	*

* Flavonoide presente en la muestra

Figura 7: Cromatograma para la solución de estándares de flavonoides.



Leyenda:

1 Catechin

2 Rutin

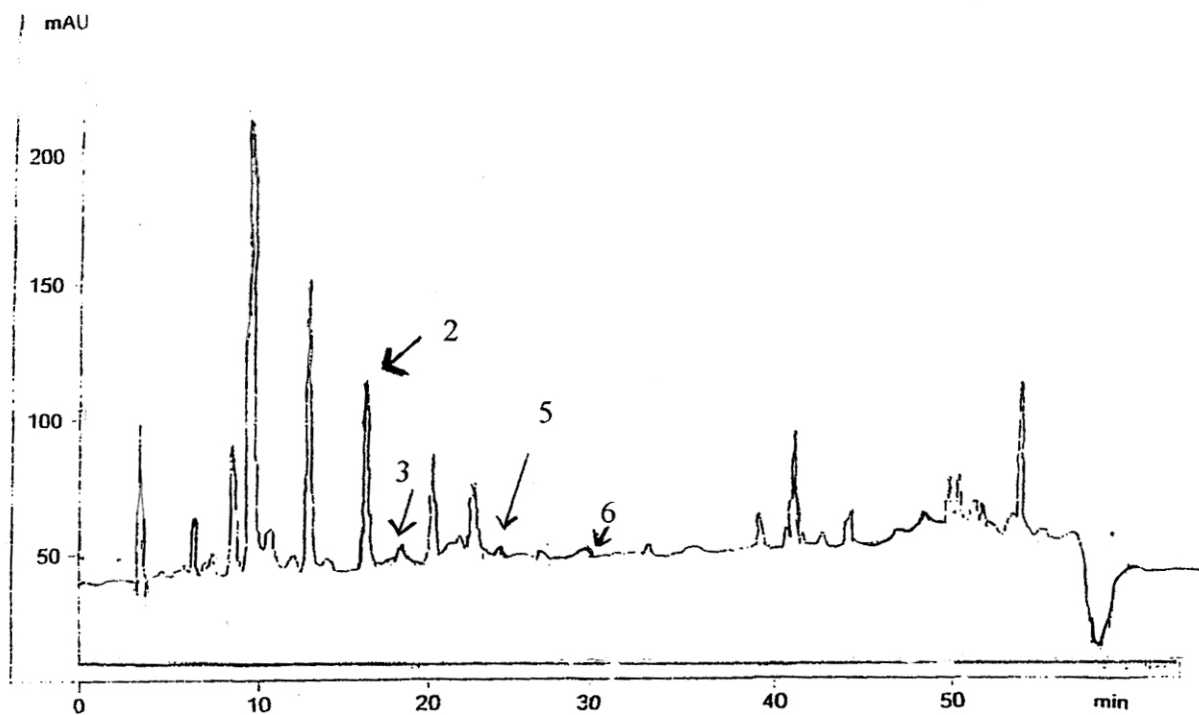
3 Myricetin

4 Naringenin glucósido

5 Quercetin

6 Kaempferol

Figura 8: Cromatograma obtenido para muestra de Chironja.



Leyenda:

1 N/A

4 N/A

2 Rutin

5 Quercetin

3 Myricetin

6 Kaempferol

La técnica utilizada para la cuantificación de vitamina C refleja los resultados obtenidos mediante la Tabla 8; así como las figuras 9 a la 11 en las próximas páginas.

Tabla 8: Contenido de Vitamina C (mg) en 100g para cada una de las muestras de Chironja evaluadas de acuerdo al patrón y al bloque de cosecha.

Patrón	Replica	BLOQUE				
		1	2	3	4	Promedio Total
Sunki Benecke	1	44.568	45.043	45.323	45.067	44.803
	2	45.260	44.603	44.285	45.352	
	3	44.045	44.325	44.568	44.182	
	4	45.066	45.383	44.703	45.068	
	Promedio	44.735	44.839	44.720	44.917	
Naronja	1	36.596	36.623	37.203	36.524	36.875
	2	37.258	37.254	37.322	36.652	
	3	35.040	37.184	36.645	37.182	
	4	37.170	37.425	36.855	37.062	
	Promedio	36.516	37.122	37.006	36.855	
Cleopatra	1	45.529	44.325	43.824	44.168	43.997
	2	43.441	44.213	44.163	43.740	
	3	43.693	43.752	43.722	43.812	
	4	43.809	43.659	43.852	44.253	
	Promedio	44.118	43.987	43.890	43.993	
Sun Chu Sha	1	43.809	44.253	43.585	43.489	44.061
	2	44.411	44.163	44.235	43.687	
	3	44.616	43.715	44.312	44.306	
	4	44.163	43.699	44.183	44.352	
	Promedio	44.250	43.958	44.079	43.958	

Figura 9: Contenido promedio de Vitamina C en Chironja por Patrón.

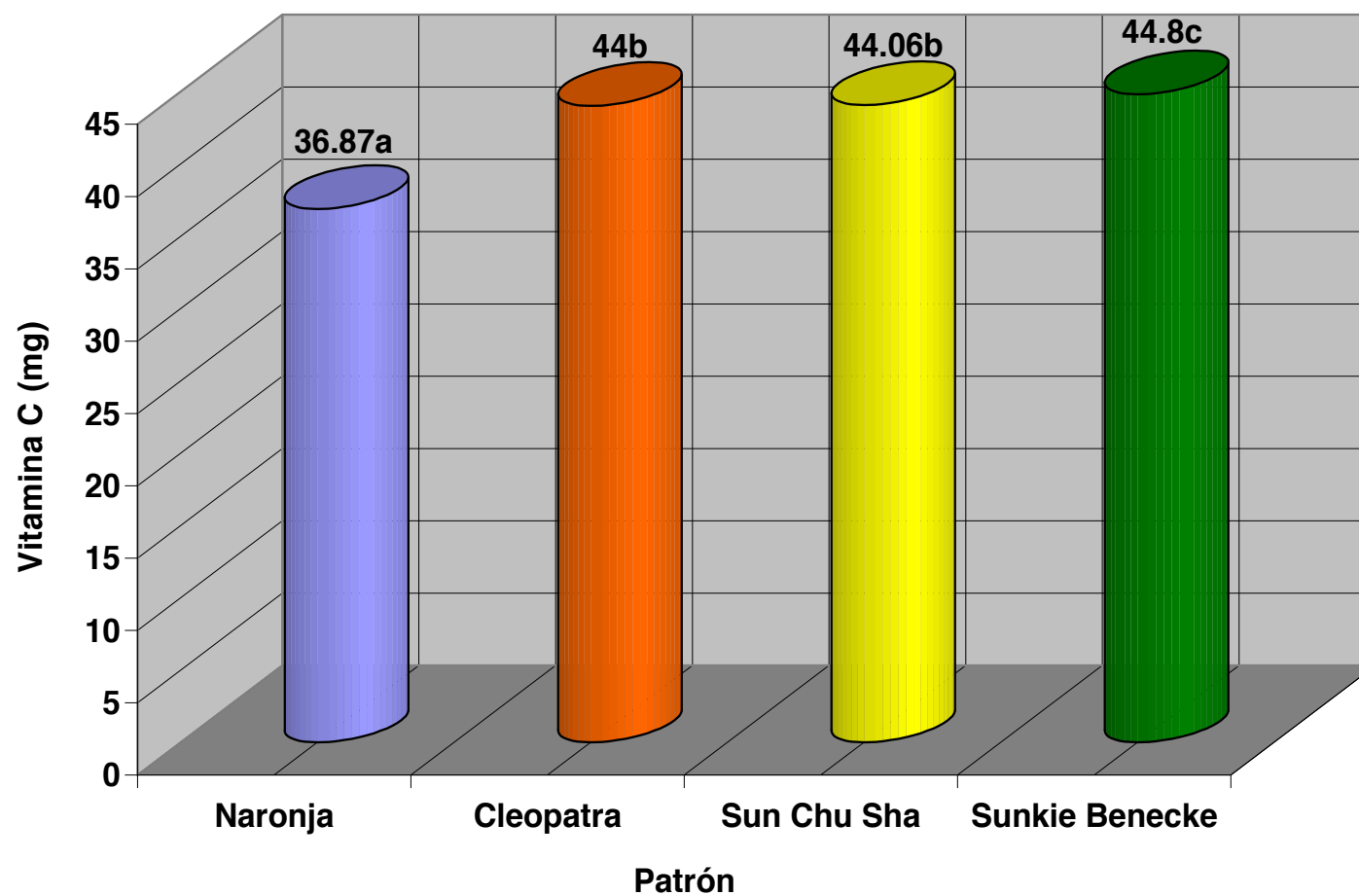


Figura 10: Contenido promedio de Vitamina C en Chironja por Bloque.

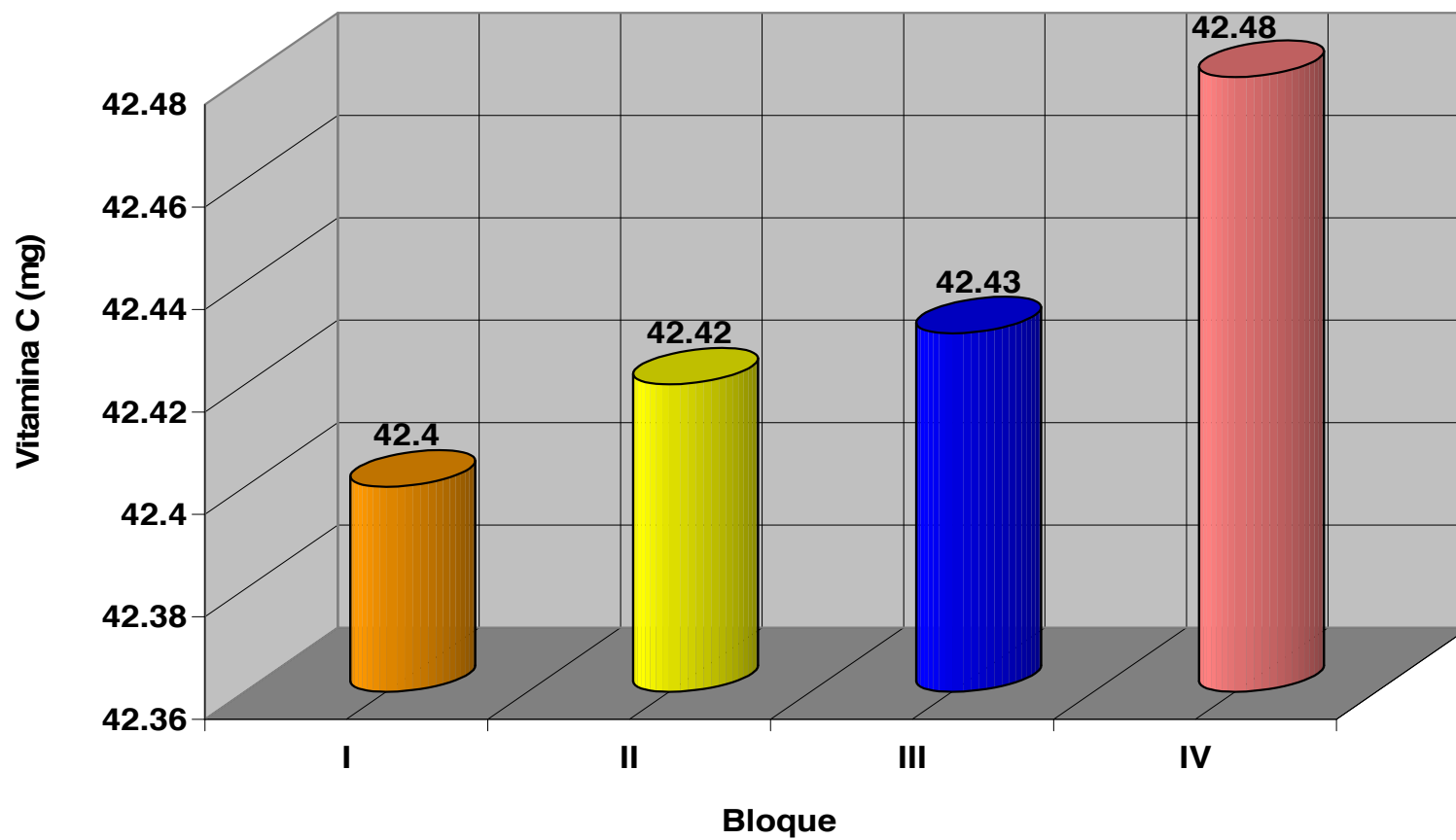
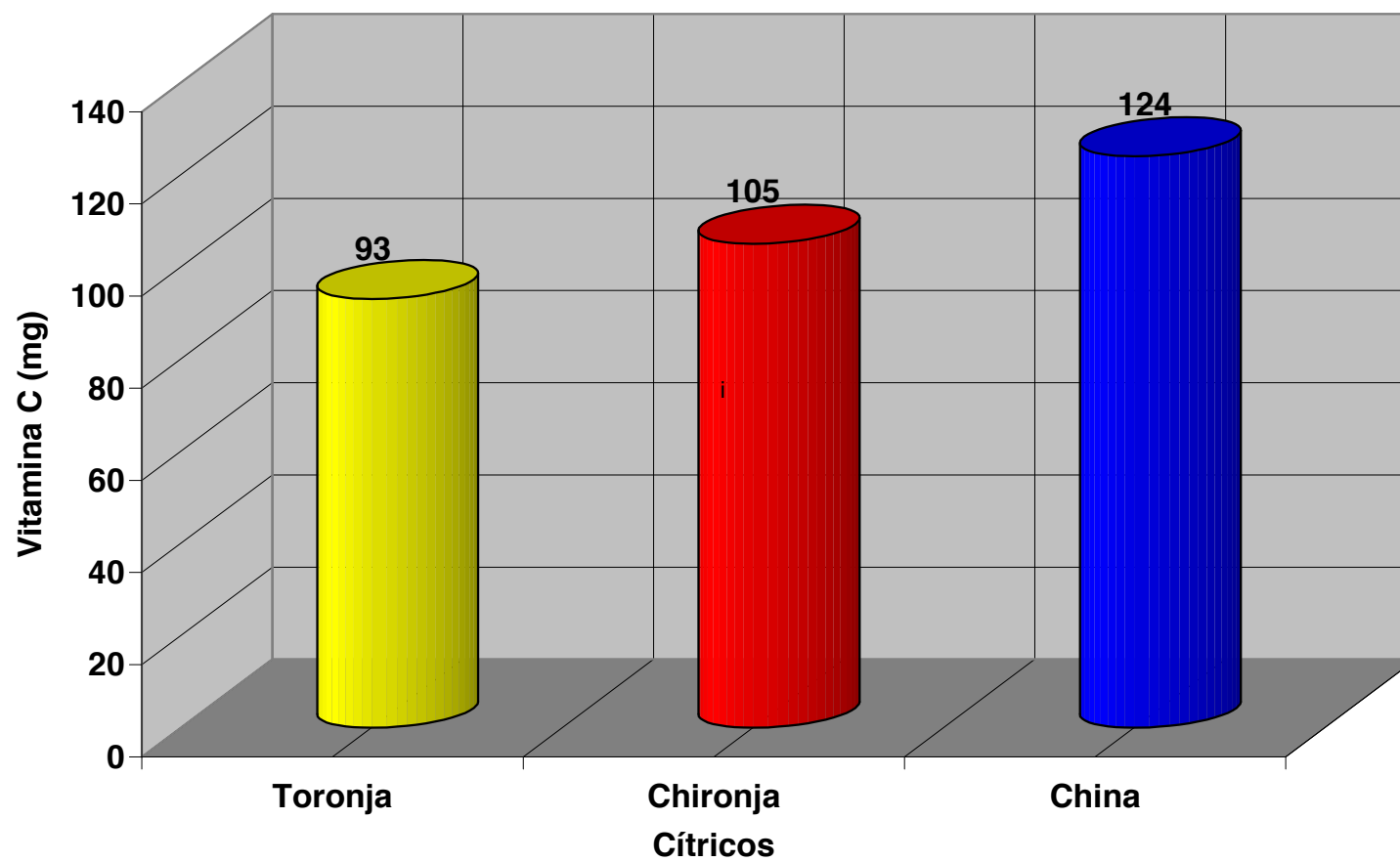


Figura 11: Contenido promedio de Vitamina C en Chironja en comparación con el contenido en China y en Toronja.



Durante la detección de folatos en chironja, se utilizó un método realizado por el Food Standard Agency para el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Éste fue utilizado para la evaluación de los compuestos de folatos (5-metil tetrahydrofolato, 5-formyl tetrahydrofolato, tetrahydrofolato y ácido fólico) en diferentes alimentos, incluyendo: leche descremada en polvo, fórmula infantil, pan integral, hígado de cordero, espinaca y polvo de levadura. Este método fue modificado para la determinación del 5-metiltetrahydrofolato en el jugo de Chironja. En este estudio el método fue validado mediante el uso de la misma muestra evaluada; la chironja. De acuerdo a la literatura la precisión para la validación de un método es definida como la diferencia entre el valor promedio medido para un material y el valor real. Las tablas y figuras que se presentan a continuación demuestran los resultados obtenidos para la validación de este método.

Tabla 9: Porcentaje de recuperación para muestras de Chironja con 5-Metil-tetrahydrofolato (5- MTHF) añadido a diferentes concentraciones.

5-MTHF	Muestra número	% Recuperado	Promedio % Recuperado
(0.2µg/ml)	1	90	90
	2	89	
	3	92	
(0.3µg/ml)	1	92	92
	2	91	
	3	92	

Figura 12: Curva de Calibración para el estándar 5-metiltetrahydrofolato.

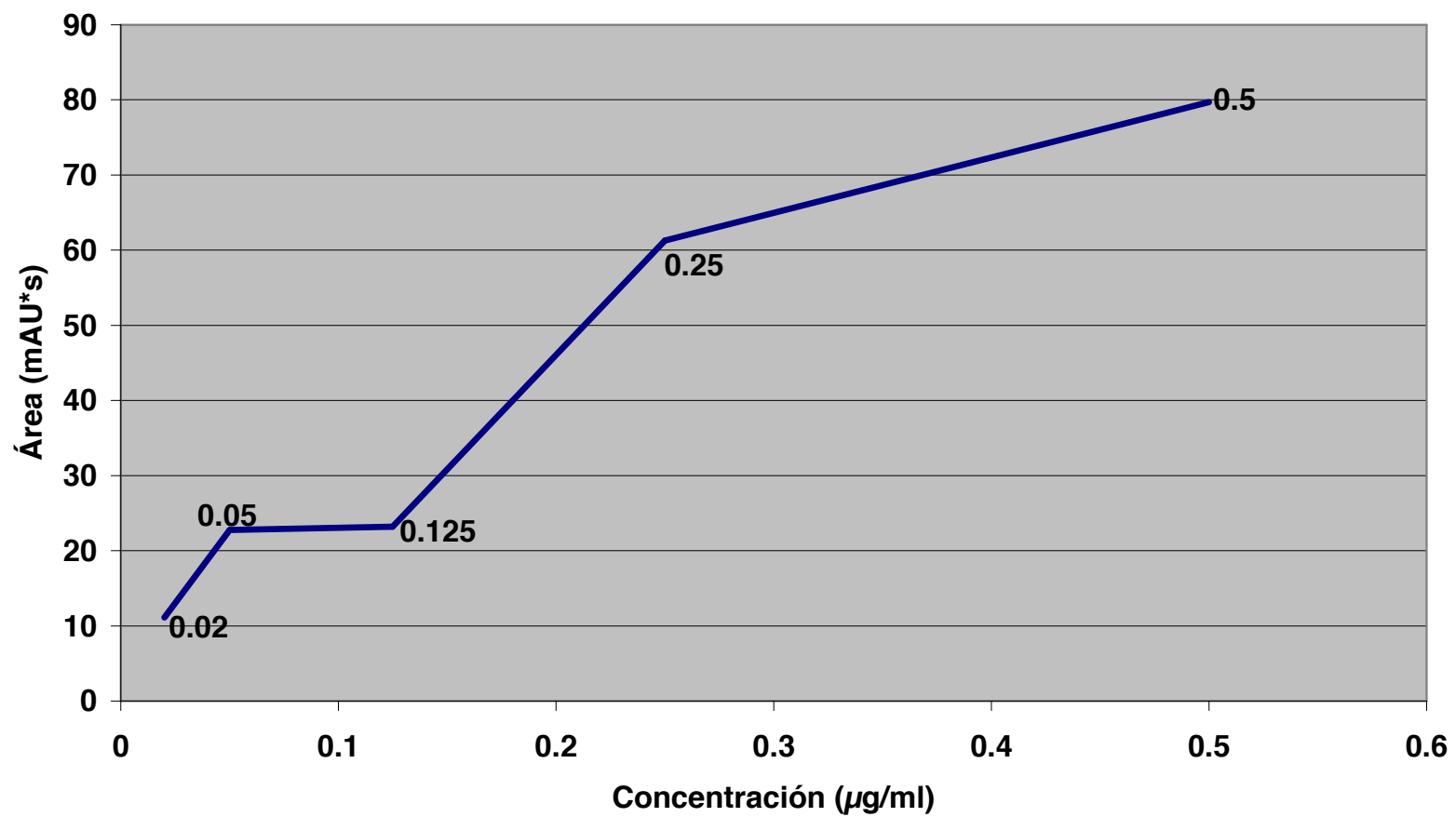


Figura 13: Cromatograma para el estándar 5-Metiltetrahydrofolato (5-MTHF).

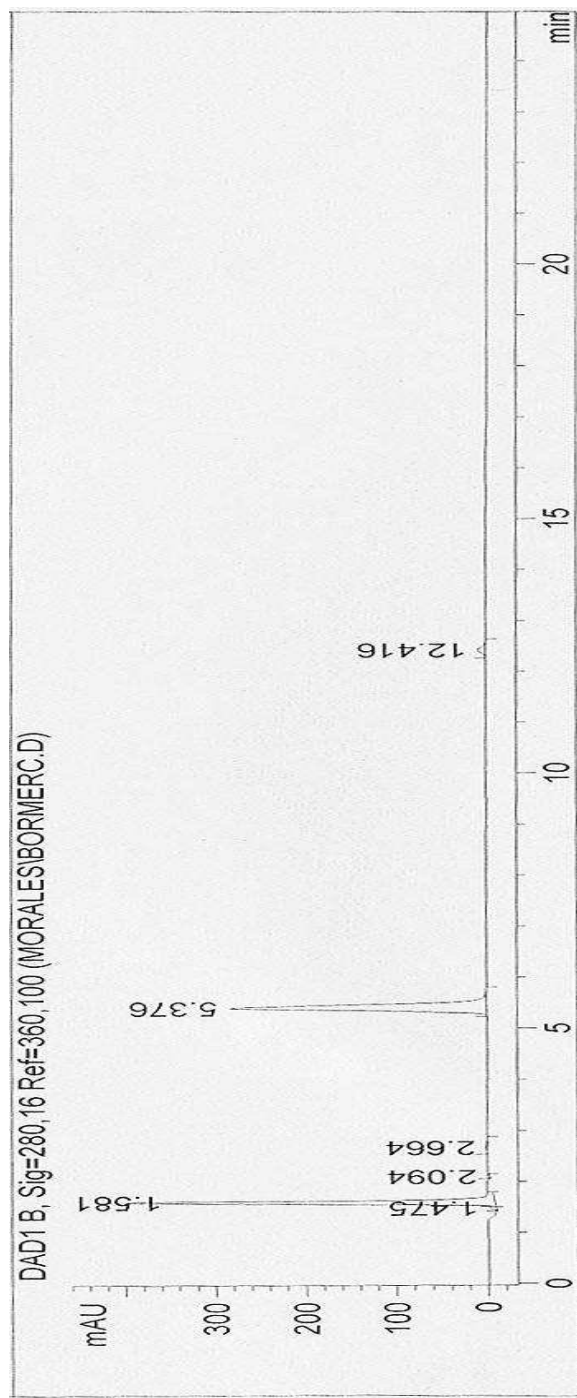
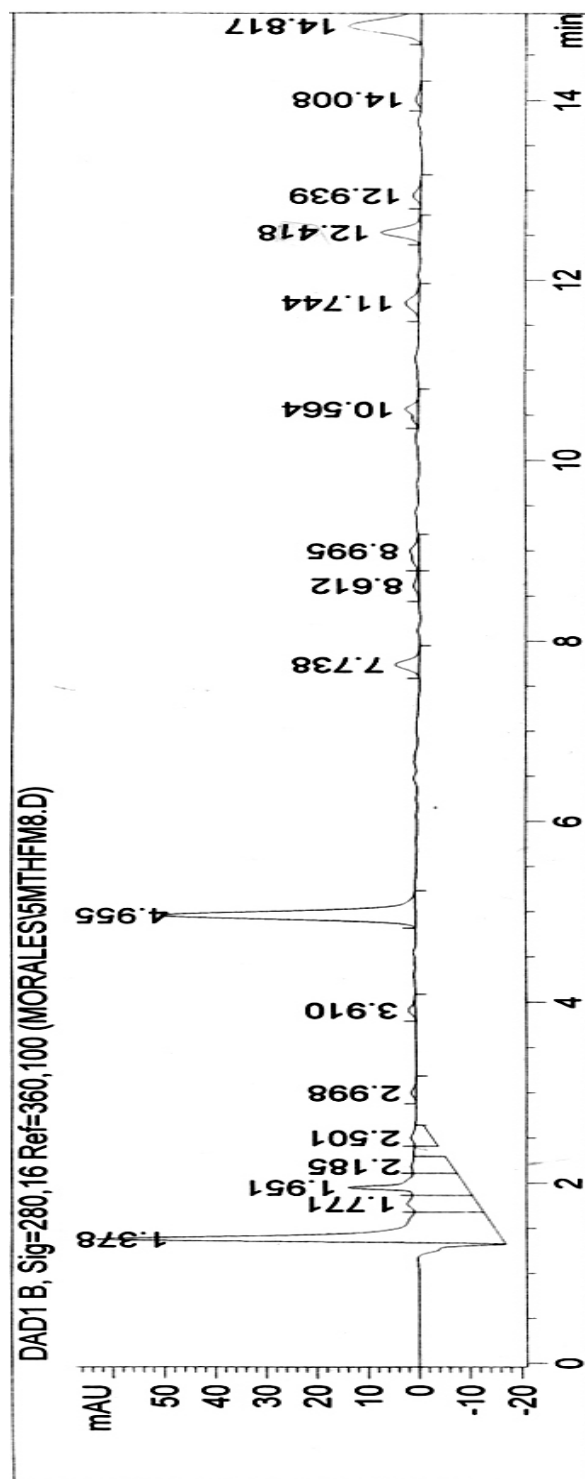


Figura 14: Cromatograma para muestra de Chironja con 5-MTHF añadido.



DISCUSIÓN

Para la evaluación de fitoquímicos en la chironja se estudiaron cinco diferentes flavonoides, estos conocidos como los más abundantes en el grupo de las frutas cítricas. La solución de estándar utilizada mediante este estudio, de acuerdo a la Figura 7 del capítulo de resultados refleja la presencia de los flavonoles Quercetin, Kaempferol, Myricetin y Rutin; así como para el flavanone glycoside Naringenin. A través de la Tabla 7 del mismo capítulo se resume por patrón de chironja y por bloque de cosecha los flavonoides encontrados. Según esta tabla se denota la ausencia del Naringenin- 4'-glycoside uno de los principales que se deseaba estudiar por su alto contenido en la toronja (*C. paradisi*). Este flavanone glycoside además de ser el más abundante en la toronja, también es el principal responsable de la mayoría de interacciones con medicamentos. Mediante la figura 8 se puede detectar la presencia de los flavonoles Quercetin, Myricetin, Rutin y Kaempferol en una de las muestras evaluadas; esto al compararse con el cromatograma obtenido para el estándar (Figura 7). Además se denota la ausencia del flavanone Naringenin; ya que ninguno de los picos obtenidos coincide con las propiedades establecidas para este componente (Apéndice Tabla 1). Estos cromatogramas coinciden para cada uno de los patrones de chironja evaluados y se detecta de igual manera en cada uno de los bloques de cosecha.

A través de la Figura 6 del Apéndice se obtienen los resultados para la validación del método donde se puede apreciar que se presentan los picos característicos de estos componentes, dando a entender que el método utilizado fue uno confiable.

Mediante los resultados presentados en el capítulo anterior, para el contenido de vitamina C de los diferentes patrones de chironja evaluados por bloque de cosecha (páginas 51 - 54); se puede estimar un promedio de 105mg de esta vitamina en 8oz del jugo de esta fruta. Según la tabla 8 del capítulo de resultados donde se resumen todos los datos obtenidos en contenido de vitamina C, se puede apreciar una diferencia significativa para el contenido en el patrón de Naronja; esto de igual manera se denota a través del promedio total de vitamina C en todos los bloques. Según la figura 9 del capítulo anterior se refleja una diferencia de un 16 – 17 % aproximadamente para el patrón de Naronja, el cual se presenta por debajo del contenido encontrado para los demás patrones evaluados. Mediante esta misma figura se denotan que letras diferentes indican diferencias significativas, por lo que resume diferencias para tres de los patrones evaluados. Para este estudio comparativo de patrones se realizó un análisis de varianza; donde se utilizó la prueba de LSD: Fisher con un alfa de 0.05. Mediante este análisis se comprueba que sí existe diferencia significativa entre el contenido promedio de vitamina C para los diferentes patrones. A través de la Tabla 2 del Apéndice (Prueba LSD: Fisher) se comprueban las diferencias existentes entre patrones. Según este análisis se demuestra que el promedio obtenido para el patrón de Naronja es diferente a los promedios en los patrones de Cleopatra, Sun Chu Sha y Sunkie Benecke. De igual manera el que el promedio de Sunkie Benecke se presenta diferente al de Naronja, Cleopatra y Sun Chu Sha. Sin embargo para los promedios encontrados en el patrón de Cleopatra y de Sun Chu Sha no se encontró diferencia significativa. Mediante este análisis la hipótesis de investigación queda aceptada; donde se concluye que sí existe diferencia

significativa entre los promedios obtenidos para al menos tres de los patrones evaluados (Apéndice Tabla 2).

Además de evaluarse la variabilidad existente entre los patrones de chironja estudiados; también se evaluó el factor de bloque, de manera de descartar el que sean heterogéneos y aporten otra variable al análisis. Según la figura 10 de los resultados obtenidos, los promedios establecidos para la chironja por bloque no demuestran diferencia significativa entre cada uno de los bloques. De igual manera se utilizó el análisis de varianza con la prueba LSD: Fisher (Apéndice Tabla 3), demostrando que existe homogeneidad en el diseño, descartando diferencia significativa entre los bloques. Estos resultados se comprueban mediante la prueba de Bonferroni para un alfa de 0.05 (Apéndice Tabla 4). Esta prueba demostró o comprobó las conclusiones obtenidas mediante la prueba LSD: Fisher realizada, tanto para las diferencias encontradas por patrones como para comprobar que existe homogeneidad entre los bloques de cosecha. Se utilizó la prueba de Bonferroni para confirmar los resultados obtenidos mediante LSD: Fisher por ser una más conservadora para análisis comparativos; esto para disminuir el Error tipo I que se acumula a través de este tipo de análisis.

La figura 11 del capítulo anterior permite una comparación entre los valores de vitamina C para la china y la toronja, establecidos por el banco de datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, y los encontrados para la chironja a través de este estudio. Mediante este gráfico se puede determinar que existe un contenido mayor en vitamina C para este híbrido que para la toronja; aunque algo menor que el contenido establecido para la china. Sin embargo puede

considerarse esta fruta como fuente excelente de vitamina C, ya que en tan solo seis a ocho onzas de su jugo provee la recomendación de consumo diario de esta vitamina.

De acuerdo a la validación del método o la técnica utilizada para la cuantificación de los compuestos de folatos se refleja en promedio un 90% de recuperación para la muestra con la concentración de $0.2\mu\text{g/ml}$ y un promedio de 92% de recuperación para la muestra de $0.3\mu\text{g/ml}$ (Tabla 9 del Capítulo 4). Este porcentaje de recuperación obtenido demuestra que el método de extracción y el equipo utilizado para la cuantificación de folatos en la chironja fueron efectivos. Por lo cual puede descartarse la técnica utilizada como el factor responsable del no poder cuantificar los folatos en la chironja. Estos porcentajes de folato recuperados se obtienen mediante la comparación de los cromatogramas obtenidos para las muestras evaluadas con el 5-MTHF añadido versus la curva de calibración realizada para este estándar a diferentes concentraciones (Figuras 12 - 14, Capítulo 4). Según la literatura, además de técnicas infructuosas en la detección de folatos también existen otros factores que interfieren o dificultan esta cuantificación; esto debido a la alta inestabilidad de esta vitamina y a la forma en que se encuentra adherida a la matriz del alimento. Entre los posibles factores responsables de no cuantificar el folato en la chironja se encuentran: (1) contenido de folato en el alimento; en muestras con bajo contenido la extracción se hace más difícil para su detección. Según la literatura el contenido de folato en la toronja es de sólo $0.1\mu\text{g/ml}$, por lo que si este híbrido posee igual característica que la toronja se puede considerar como uno de bajo contenido, dificultando entonces su extracción. (2) pH del alimento, a pH más ácido más difícil la cuantificación, por problemas de extracción del folato de la matriz del alimento; pH obtenido en la

chironja fue de 3.8 - 4.0; alimentos más estables aquellos con pH de 5.5 – 8.0, (3) antioxidantes utilizados, (4) enzimas utilizadas para la digestión e hidrólisis de la muestra, (5) tiempo y temperatura de procesamiento de las muestras, (6) sensibilidad del equipo utilizado para la detección de cantidades bajas de folato. Al evaluar cada uno de estos factores se puede determinar que el factor de mayor influencia sea el del pH del alimento, ya que es uno sumamente bajo (3.8 - 4.0). Esto al ser comparados con el pH de los alimentos evaluados por la metodología utilizada por el Food Standard Agency del USDA, los cuales fluctúan entre 5.5 - 7.0. Es el componente de mayor variabilidad al comparar la metodología utilizada. La validación del método descartó el que haya sido el método de detección o la sensibilidad del equipo, ya que se logró medir el estándar a tan baja cantidad como $0.025\mu\text{g/ml}$ (Fig. 13 y 14, Capítulo de resultados). En el caso de las enzimas y antioxidantes utilizados fueron los recomendados por la metodología, así como el tiempo y la temperatura de procesamiento. Las muestras fueron procesadas inmediatamente se extrajo el jugo, esto debido a la conocida inestabilidad de los folatos a diferentes componentes del medio ambiente (luz, oxígeno y temperatura, entre otros). Al descartar cada uno de estos componentes permanece como principal interferencia el pH del alimento y a su vez la extracción, ya que muestras con pH más ácido hacen la extracción más difícil para ser cuantificados. Luego de estas posibles interferencias en la cuantificación de folato es recomendable considerar el uso de la técnica oficial para su detección; esta técnica no fue utilizada mediante este estudio debido a la falta de equipo necesario para su análisis.

CONCLUSIONES

Según los hallazgos de este estudio se presentan las siguientes conclusiones:

1. Se puede considerar el jugo fresco de Chironja como una fuente de Flavonoides, esto de acuerdo a la variedad encontrada de estos componentes. Se pudo detectar la presencia de cuatro diferentes flavonoides dentro de cinco evaluados; entre los cuales están: Kaempferol, Myricetin, Quercetin y el Rutin. Cada uno de estos con diferentes aportaciones a la salud según establece la literatura. No se detectó la presencia del flavanone glycoside Naringenin-4'-glycoside; el de mayor abundancia principalmente en la toronja y relacionado a interacción con medicamentos. La ausencia de este flavanone en la chironja puede estar relacionado al sabor dulce que presenta esta fruta, ya que este componente es asociado principalmente a impartir sabores agrio y amargo en un alimento.
2. En contenido de vitamina C se puede considerar el jugo fresco de chironja como una fuente excelente de ésta, ya que se estima un promedio de 105mg en 8oz del jugo de esta fruta. Este contenido permite obtener la recomendación diaria de vitamina C (Tabla 4 del Capítulo 2) para un adulto en 6-8oz del jugo. Al comparar los valores de esta vitamina entre los de la china y la toronja se establece la chironja con un 13% más que en la toronja y un 15% menor que el de la china.

3. El contenido de folato en la chironja no pudo ser detectado. Se especula como principal factor de interferencia el pH de la chironja para la técnica de extracción utilizada, ya que en alimentos ácidos la extracción se hace más difícil por la forma en que se encuentra el folato en la matriz del alimento.
4. Se encontró diferencia significativa por patrón en contenido de vitamina C, lo cual indica la importancia en términos nutricionales del patrón seleccionado; no así para el bloque de cosecha entre los cuales se detectó homogeneidad. En detección de flavonoides no se encontró diferencia significativa por patrones. De la misma manera se detectó homogeneidad entre los bloques.

RECOMENDACIONES

1. En la determinación de fitoquímicos, se recomienda continuar la evaluación de otros flavonoides o de otras familias de estos para detectar posibles diferencias por patrones o por especies, ya que los encontrados mediante este estudio no reflejaron diferencias entre patrones. También es recomendable la evaluación a otras cosechas de chironja por la variedad que puede existir entre una cosecha y otra.
2. De acuerdo a las diferencias significativas presentes en el contenido promedio de vitamina C por patrón; se reafirma la importancia que establece la literatura de la selección de un patrón al momento de realizar un injerto.
3. La limitación principal de este estudio fue la determinación de folatos, para futuras investigaciones es recomendable considerar la utilización de la metodología oficial establecida por la Asociación de Químicos Analíticos (AOAC); esto debido a que las técnicas utilizadas mediante la cromatografía líquida de alta ejecución (HPLC) aún continúan en evaluación.
4. El continuar analizando este fruto para otros componentes, además de considerar evaluar otros productos agrícolas de P.R. para su contenido nutricional. Esto de manera de comenzar a crear una base de datos que permita la educación al público de estos y promueva el consumo de ellos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mc Nutt, K. 1995. Putting nutrition priorities into perspective. *Nutrition Today*. 30: 168-71.
2. Ziegler, R. 1991. Vegetables, Fruits and Carotenoids and the Risk of Cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*. 53 (suppl.): 251S-59S.
3. Moscoso, C. Junio, 1976. La chironja: una nueva fruta cítrica puertorriqueña. Universidad de Puerto Rico – RUM Estación Experimental Agrícola, Boletín núm. 248.
4. Davies, F. y L. Albrigo. 1994. Rootstocks. Citrus. CAB International. p. 83-86.
5. Peryan, O. y F. Pilgrim. 1957. Hedonic Scale Methods of Measuring Food Preferences. Institute of Food Technology. Chicago, Illinois.
6. Meléndez, M. 1997. Efecto del calcio, cera y empaque con láminas de plástico encogible en el largo de vida útil poscosecha de la chironja. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R.
7. Comunicación verbal con el Agrónomo Félix M. Román. Enero, 2004. Estación Experimental Agrícola, Isabela, Puerto Rico.
8. Mc Nutt, K. 1995. Medicinals in foods. *Nutrition Today*. 30: 218-22.
9. Deustch, L. 2000. Foods that Fight Disease. p. 7-11.
10. Bloch, A. y C. Thomson. 1995. Position of the American Dietetic Association: Phytochemicals and Functional Foods. *Journal of the American Dietetic Association*. 95: 493-496.
11. Deutsch, L. 2000. Foods that Fight Disease. p. 13-22.
12. Pierson, H.F. 1994. Oral presentation at 77th Annual meeting of the American Dietetic Association. Orlando, Florida.
13. Agricultural Research Service. April, 1999. Survey of Phenolic Compounds Produced in Citrus. USDA.
14. Adapted from Vegetarian Nutrition. 1998. Practice group of the Am. Dietetic Assoc.

15. Brouillard, R. y A. Cheminant. 1998. Flavonoids and plant color in Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties. p. 93-106.
16. Benaverte, O.; J. Castillo; y F. Marin. 1997. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. J. Agricultural and Food Chem. 45: 4505-4515.
17. Bast, A.; G. Haenan y C. Daelman. 1991. Oxidants and antioxidants: state of art. Am. J. Med. 91: 2S-13S.
18. Clemston, CAB. 1989. Bioflavonoids in Vitamin C. CRC Press Inc. p. 101-128.
19. Hughes, R. y H. Wilson. 1997. Flavonoids: Some Physiological and Nutritional Considerations. Prog. Med. Chem. 14: 285-301.
20. Nordmann, R. 1993. Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants. CR Seances Soc. Biol. Fil. 187: 277-285.
21. Lee, S. y Y. Park. 1999. Cholesterol – lowering activity of naringenin via inhibition of 3-hydroxy-3methylglutaryl CoA reductase and acyl CoA: in rats. Ann. Nutr. Metab. 43: 173-180.
22. Emim, J.; A. Oliveira y A. Lapa. 1994. Pharmacological evaluation of the antiinflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. J. Pharmacological. 46: 118-122.
23. Keenoy, B. y J. Vertommen. 1999. The effect of flavonoid treatment on glycation and antioxidant status in Type I diabetic patients. Diabetes Nutr. Metab. 12: 256-263.
24. Middleton, E. Jr.; G. Drzewiecki y J. Tatum. 1987. The effects of citrus flavonoids on human basophil and neutrophil function. J. Plant Med. 57: 325-328.
25. Mantey, J.; K. Grohmann y N. Guthrie. 2001. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. Curr. Med. Chem. 8: 135-53.
26. So, F. y N. Guthrie. 1996. Inhibition of human breast cancer cells proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. Nutr. Cancer. 26: 167-181.
27. Middleton, E. Jr. y C. Kandaswami. 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. Pharmacological Reviews. 52 (4): 673-751.

28. Godeberge, P. 1994. Deflon 500mg in the treatment of hemorrhoids disease: a demonstrated efficacy in comparison with placebo. In. *Angiology*. 45: 574-578.
29. Laurent, R.; R. Gilly y C. Frileux. 1998. Clinical evaluation of a venotropic drug in man. In. *Angiol*. 7: 39-43.
30. Gally, P. y M. Thiollet. 1993. A double-blind, placebo-controlled trial of a new veno-active flavonoid fraction in the treatment of symptomatic capillary fragility. *Int. Angiol*. 12: 69-72.
31. Pecking, A. y B. Ferrier. 1997. Efficacy of Deflon 500mg in the treatment of lymphedema. *Int. Angiol*. 48: 93-98.
32. Cook, N. y S. Samman. 1996. Flavonoids, Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr. Biochem*. 7: 66-76.
33. Bailey, D. y G. Dresser. 2004. Interactions between grapefruit and cardiovascular drugs. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 4(5): 281-297.
34. Fennemma, O. 1996. Water soluble vitamins. *Food Chemistry* 3rd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 559-567.
35. Association of Official Analytical Chemists. 1995. *Official Methods of Analysis*. Ascorbic acid in vitamin preparations and juices. 16th Ed. Section 45.1.14.
36. Mahan, L. y M. Arlin. 1992. *Vitamins. Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy*. W. B. Saunders Co., p. 99-101.
37. Simon, J. y E. Hudes. 2000. Serum ascorbic acid and gallbladder disease prevalence among US. Adults: the Third National Health and Nutr. Examination Survey (NHANES III). *Arch. Intern. Med*. 160(7):931-936.
38. Carr, A. y B. Frei. 1999. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am. J. Clin. Nutr*. 69(6):1086-1107.
39. Subar, A.; J. Heimendinger y S. Krubs – Smith. 1991. 5 a day for Better Health: a baseline study of Americans fruit and vegetable consumption. National Cancer Institute, NIH, Rockville, MD. p. 7.
40. Bethesda, M. 1991. Vitamin C and cancer prevention and control; NCI. *Am. J. Clin. Nutr*. 53: 2705-2825.
41. Cook, J. y Reddy, M. 2001. Effect of Ascorbic Acid Intake on Nonheme-iron Absorption from a Complete Diet. *Am. J. Clin. Nutr*. 73: 93-98.

42. Grundman, M. y P. Delaney. 2002. Antioxidants Strategies for Alzheimer Disease. *Nutrition Society*. 61: 191-202.
43. Engelhart, M.; M. Geerlings; A. Ruitenberg; J. van Swieten; A. Hofman; J. Wittteman, y M. Breteler. 2002. Dietary Intake of Antioxidants and Risk of Alzheimer Disease. *JAMA*. 287 (24): 3223- 3229.
44. Zhang, S.; M. Herman; H. Chan; D. Spielgelman; W. Willet y A. Ascherio. 2002. Parkinson's and vitamin therapy. *Journal of Neurology*. 59 (8): 1161-1169.
45. Hillstrom, R.; A. Ammons y S. Lynch. 2003. Vitamin C Inhibits Lipid Oxidation in Human HDL. *Journal of Nutrition*. 133: 3047-3051.
46. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 16-1 Nutrient Lists.
47. Mahan, L. y M. Arlin. 1992. Vitamins. *Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy*. W. B. Saunders Co. p. 103.
48. Stephen, R. y T. Utecht. 2001. Scurvy identified in the Emergency Department: a case report. *J. Emerg. Med*. 21(3): 235-237.
49. Food and Nutrition Board, Institute of Med. 2000. Vitamin C. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. National Academy Press, Washington D. C.; p. 95-100.
50. Fennemma, O. 1996. Water-Soluble Vitamins. *Food Chemistry* 3rd Edition. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 590.
51. Food Standards Agency. April 2002. Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Folate in Food.
52. Association of Official Analytical Chemists. 1995. Folic Acid in juices. *Official Methods of Analysis*, 16th Ed. Section 992.05.
53. Whitney, E.; E. Hamilton y S. Rolfes. 1990. The Water-Soluble Vitamins: B Vitamins and Vitamin C. *Understanding Nutrition*. West Publishing Co., New York; p. 209-212.
54. Food and Nutrition Board, National Research Council, National Academy of Sciences. 1974. Proposed Fortification for Cereal-Grain Products, National Academy Printing and Publishing Office, Washington D. C., p.36.

55. Fohr, I.; R. Prinz-Langenohl; A. Bronstrup; A. Bohlmann; H. Nau; H. Berthold y K. Pietrzik. 2002. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Genotype Determines the Plasma Homocysteine-Lowering Effect of Supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or Folic Acid in Healthy Young Woman. *Am. J. Clin. Nutr.* 75 (2): 275-282.
56. Zhang, S.; W. Willet; J. Selhub; D. Hunter; E. Giovannucci; M. Holmes; G. Colditz; y S. Hankinson. Plasma Folate, Vitamin B6 and B12, Homocysteine and Risk of Breast Cancer. *Journal of National Cancer Institute.* 2003; 95: 373-380.
57. Van Oort, F.; A. Boonstre; I. Brower; R. Clarke; C. West; M. Katan y P. Verhoef. 2003. Folic Acid and Reduction of Plasma Homocysteine Concentration in Older Adults, a Dose Response Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 77 (5): 1318-1323.
58. Scientifics of the National Institute on Aging. 2002. Mouse Experiments Link Folic Acid and Deficiency to Parkinsons Disease. *J. of Neurochemistry*, p.380-389.
59. Kruman, I.; T. Kumaravel; A. Lohani; W. Pedersen; R. Cutler; Y. Kruman; N. Haughey; J. Lee; M. Evans y M. Mattson. 2002. Folic Acid Deficiency and Homocysteine Impair DNA Repair Hippocampal Neurons and Sensitize them to Amyloid Toxicity in Experimental Models of Alzheimer Disease. *Journal of Neuroscience.* 22 (5):1752-1762.
60. Sesdradri, S.; A. Beiser y J. Selhub. 2002. Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer Disease. *New England Journal of Medicine.* 346 (7): 476-483.
61. Streiff, R. 1971. Folate levels in citrus and other juices. *Am. J. Clin. Nutr.* 24, 1390.
62. Food and Nutrition Board-National Academy of Science, Institute of Medicine. 1998. Dietary Reference Intakes (DRI's).
63. Comunicación telefónica con la Profesora Onilda Santana, de la EEA de Río Piedras, P.R. Febrero, 2004.
64. Gauch, R.; U. Leuenberger y U. Muller. 1993. Determination of folic acid (Pteroyl Glutamic acid) in food with HPLC. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 84: p. 295-302.
65. Justesen, U.; P. Knuthsen y T. Leth. 1998. Quantitative anlysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by HPLC with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatography A.* 799: p. 101-110.

APÉNDICE

Figura 1: Foto de la fruta de *Citrus sinensis* x *Citrus paradisi* (Chironja).



Figura 2: Foto del árbol de *Citrus sinensis* x *Citrus paradisi* (Chironja).



Figura 3: Foto del árbol de *Citrus sinensis* x *Citrus paradisi* (Chironja).



Figura 4: Foto del equipo de cromatografía líquida de alta ejecución (HPLC).



Figura 5: Foto de las columnas de filtración.



Figura 6: Cromatogramas para muestra de leche con estándar de flavonoides añadido.

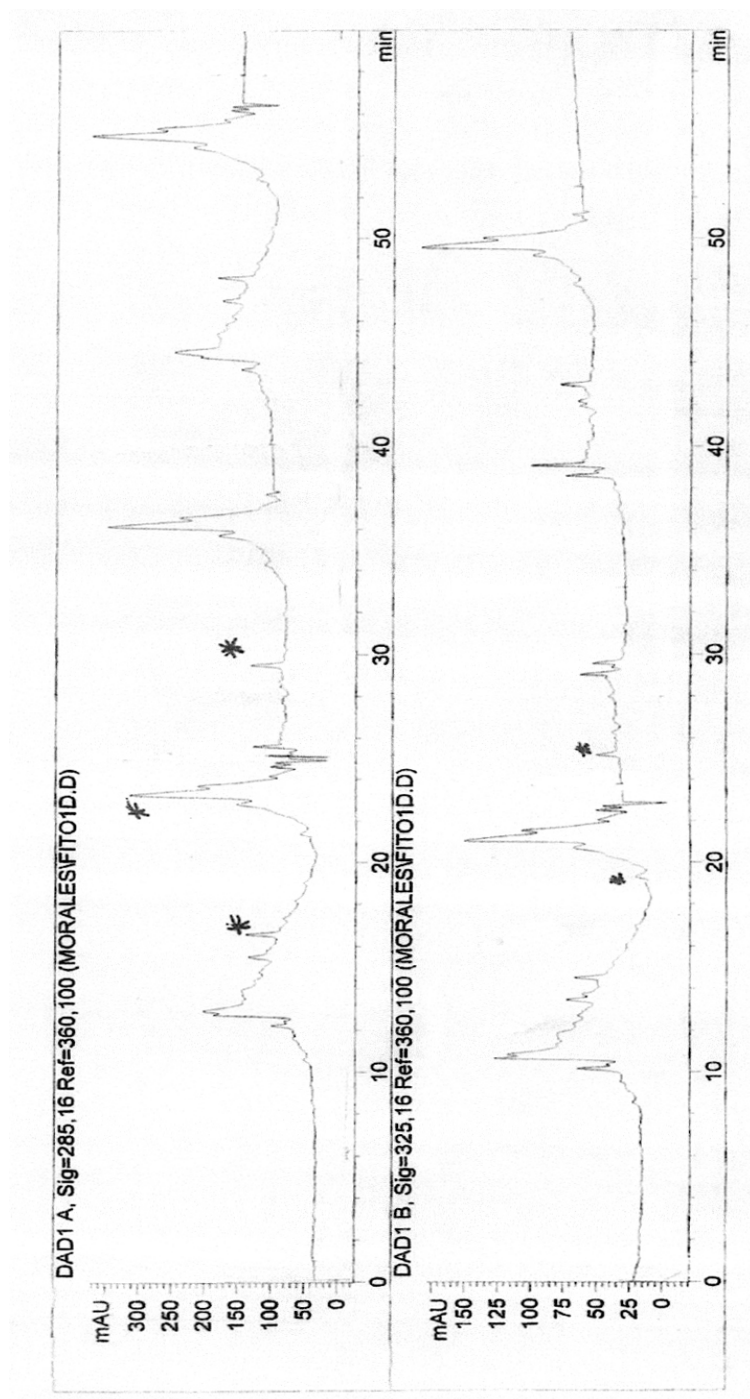


Tabla 1: Propiedades de estándares de Flavonoides evaluados.

Nombre del flavonoide	Tiempo de retención (min)	Límites de detección (ug/ml)
Myricetin	19.773	0.026
Naringenin	23.227	0.0003
Quercetin	24.480	0.0003
Kaempferol	29.427	0.003
Rutin	16.480	0.0003

Tabla 2: Estadísticos para el contenido de Vitamina C en Chironja por patrón.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VITAMINA C	64	0.98	0.98	1.13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	665.78	6	110.96	482.19	<0.0001
VARIEDAD	665.74	3	221.91	964.32	<0.0001
BLOQUE	0.04	3	0.01	0.06	0.9786
Error	13.12	57	0.23		
Total	678.90	63			

Prueba: LSD Fisher Alfa:=0.05 DMS:=0.33963

Error: 0.2301 gl: 57

VARIEDAD	Medias	n	
NA	36.87	16	A
CL	44.00	16	B
SCSK	44.06	16	B
SB	44.80	16	C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Tabla 3: Estadísticos para la evaluación de Vitamina C en patrones por bloque.

Prueba: LSD Fisher Alfa:=0.05 DMS:=0.33963

Error: 0.2301 gl: 57

BLOQUE	Medias	n	
1.00	42.40	16	A
3.00	42.42	16	A
4.00	42.43	16	A
2.00	42.48	16	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Tabla 4: Estadísticos mediante la prueba de Bonferroni para Vitamina C.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VITAMINA C	64	0.98	0.98	1.13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	665.78	6	110.96	482.19	<0.0001
VARIEDAD	665.74	3	221.91	964.32	<0.0001
BLOQUE	0.04	3	0.01	0.06	0.9786
Error	13.12	57	0.23		
Total	678.90	63			

Prueba: Bonferroni Alfa:=0.05 DMS:=0.46361

Error: 0.2301 gl: 57

VARIEDAD	Medias	n	
NA	36.87	16	A
CL	44.00	16	B
SCSK	44.06	16	B
SB	44.80	16	C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0.05$)

Prueba: Bonferroni Alfa:=0.05 DMS:=0.46361

Error: 0.2301 gl: 57

BLOQUE	Medias	n	
1.00	42.40	16	A
3.00	42.42	16	A
4.00	42.43	16	A
2.00	42.48	16	A

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0.05$)