

“UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



“EXTRACCIÓN ASISTIDA POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE NARANJA (*Citrus sinensis*)”

POR:

SILVIA MAGALI CRUZ LÓPEZ

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México
Mayo de 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“EXTRACCIÓN ASISTIDA POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE NARANJA (*Citrus sinensis*)”

Por:

SILVIA MAGALI CRUZ LÓPEZ

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

La cual fue revisada y aprobada por:

COMITÉ ASESOR



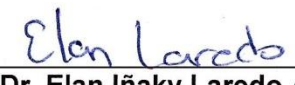
Dr. Leonardo Sepúlveda Torre
Asesor principal



Dra. Xochitl Ruelas Chacón
Coasesor interno



Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés
Coasesor externo



Dr. Elan Iñaky Laredo Alcalá
Coasesor externo



Dr. José Buñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Saltillo, Coahuila, México

Mayo del 2018

**“UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO
NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS

**“EXTRACCIÓN ASISTIDA POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE
NARANJA (*Citrus sinensis*)”**

Por:

SILVIA MAGALI CRUZ LÓPEZ

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

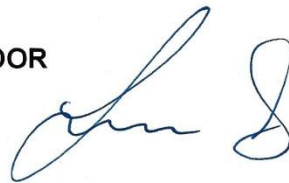
INGENIERÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

JURADO CALIFICADOR



Dra. Xochitl Ruelas Chacón

Presidente



Dr. Leonardo Sepúlveda Torre

Vocal



Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés

Vocal



Dr. Elan Iñaky Laredo Alcalá

Vocal Suplente

Saltillo, Coahuila, México

Mayo del 2018

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por iluminar mi camino, por darme salud, sabiduría y cuidarme siempre, por permitirme llegar hasta aquí, que en los momentos de desesperación me dió la fuerza y la valentía para seguir adelante, gracias padre por tu infinito amor y todas tus bendiciones.

A mis padres **Andrés y Rosa**, quienes me han dado su amor incondicional, por creer en mí, por ser el mayor ejemplo de sacrificio y lucha, por quitarse el pan de la boca con tal de que nos faltara nada a mí y mis hermanos, mil gracias los amo con toda mi alma.

A mis hermanos, **Samuel, Floriberto, Abinadi, Limber y Dilmar** por caminar conmigo durante este tiempo, por su apoyo incondicional y el cariño que siempre me han brindado.

Mis asesores Dr. Iñaky Laredo, Dr. Leonardo Sepúlveda, Dr. Juan Alberto Ascasio y Dra. Xochitl Ruelas, por la confianza depositada en mí, su apoyo y paciente guía para la realización de este trabajo que me engrandece profesionalmente y me impulsa a seguir adelante.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** que me permitió formarme profesionalmente a través de su personal docente.

A **David García Perez** por su compañía y comprensión quien fue capaz de contenerme cuando todo iba mal y hacerme mejor persona. Gracias por amarme como solo tú lo puedes hacer.

A **mis amigos**, Bethi, Brenda, Nayetxi, Yazmin, Dulce, Liliana, Christian, Omar y Margarito por todas las experiencias compartidas, cariño y apoyo.

Al DIA (Departamento de Investigación en Alimentos) U A de C, por permitirme desarrollar parte del experimento en los laboratorios de posgrado. Gracias por su disposición.

Asimismo a la empresa **GreenCorp Biorganix** de México por darme un espacio en sus laboratorios de Centro de innovación y Desarrollo Tecnológico para realizar mis experimentos. Gracias

A quienes tienen tiempo de leer esta tesis.

A quienes hoy me acompañan, Gracias.

DEDICATORIAS

Este trabajo se la dedico principalmente a **Dios** por todo su amor hacia mí y por darme la dicha de compartir estos momentos con las personas que más amo en la vida que es mi familia, amigos y amor.

A mis padres **Rosa y Andrés** que fueron mi motor principal para culminar este sueño, les dedico con todo cariño y amor, los amo demasiado.

A mis hermanos, **Samuel, Floriberto, Abinadi, Limber y Dilmar** por su amor incondicional y por estar al pendiente de mí en todo momento, este logro lo comparto con ustedes. Los amo con todo mi corazón.

A mis cuñadas **Consuelo y Lidia** por ser las hermanas que nunca tuve gracias por sus consejos y por su apoyo en todo momento, las amo mucho.

A mis sobrinos **Carlos, Melani y Levi** por llenar de alegría el hogar, por darme mucho amor y ser una segunda madre para ustedes, los amo con toda mi alma.

A **David** simplemente por ser un regalo y una bendición de Dios, por llenar mi vida de alegría, por amarme y cuidarme, te amo mucho.

A mis amigas, **Dorian y Diana** por ser las mejores amigas del mundo, por su amor y apoyo, por estar siempre conmigo a pesar de la distancia, gracias por estar en mi vida. Las amo demasiado.

“Mira que te mando que te esfuerces, y seas valiente; no temas ni desmayes, porque yo el señor tu Dios estoy contigo en donde quiera que vayas.” Josué 1:9

ÍNDICE

Contenido	Página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. JUSTIFICACIÓN.....	4
1.2. HIPÓTESIS.....	5
1.3. OBJETIVOS.....	5
1.3.1. General.....	5
1.3.2. Específicos.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1. Naranja.....	6
2.2. Funciones biológicas de los compuestos de cáscara de naranja.....	8
2.3. Taninos.....	9
2.3.1. Fuentes de taninos.....	11
2.3.2. Factores que afectan la concentración de taninos.....	12
2.4. Taninos condensados o proantocianidinas.....	13
2.4.1. Biosíntesis de taninos condensados.....	16
2.4.2. Aplicaciones de taninos condensados.....	19
2.4.3. Biodegradación de taninos.....	21
2.5. Ácidos hidroxicinámicos y benzóicos.....	24
2.5.1. Ubicación y funciones en las plantas.....	25
2.5.2. Aplicación de los ácidos fenólicos en alimentos.....	26
2.5.3. Aplicación de los ácidos fenólicos en la salud humana.....	27
2.6. Fermentación en estado sólido.....	29
2.6.1. Aspectos importantes de la fermentación sólida.....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1. Reactivos.....	31
3.2. Obtención, identificación y conservación del microorganismo.....	31
3.3. Obtención y acondicionamiento del soporte de cáscara de naranja.....	32
3.4. Evaluación del crecimiento radial de la cepa <i>Aspergillus niger</i> utilizando cáscara de naranja.....	33
3.5. Producción de compuestos bioactivos por fermentación en estado sólido.....	34
3.6. Evaluación de los factores que influyen en el proceso de Fermentación.....	34
3.7. Recuperación de los compuestos bioactivos obtenidos por fermentación en estado sólido.....	36
3.8. Determinación de azúcares totales por microplaca.....	37
3.9. Determinación de taninos hidrolizables por microplaca.....	37
3.10. Determinación de taninos condensados por microplaca.....	38
3.11. Análisis de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa ionización por electrospray espectrometría de masas (RP-HPLC-ESI-MS).....	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	41

4.1. Identificación del microorganismo.....	41
4.2. Contenido de azúcares totales.....	43
4.3. Cuantificación de taninos hidrolizables.....	45
4.4. Cuantificación de taninos condensados.....	46
4.5. Efecto de los factores independientes sobre la liberación de taninos condensados.....	48
4.6. Identificación por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de compuestos de la cáscara de naranja por extracción asistida por fermentación en estado sólido.....	52
5. CONCLUSIÓN.....	55
6.PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.....	56
7. REFERENCIAS.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Nombre	Página
Figura 1. Estructura de los compuestos flavan-3-oles más comunes.....	14
Figura 2. Modelo de la estructura de los taninos condensados.....	15
Figura 3. Despolimerización de taninos condensados (Proantocianidina).	16
Figura 4. Biosíntesis de taninos condensados y antocianinas, mostrando las enzimas e intermediarios implicados.....	17
Figura 5. Esquema simplificado de las vías de hidroxilación que pueden tomar los precursores de las unidades de flavan 3-ol que forman los taninos condensados.....	19
Figura 6. Estructuras químicas de ácidos fenólicos, derivados de ácidos cinámicos y benzoicos.....	25
Figura 7. Conservación del microorganismo en tubos inclinados con agar papa dextrosa (APD).....	32
Figura 8. Acondicionamiento y conservación de la cáscara de naranja....	33
Figura 9. Evaluación del crecimiento radial de la cepa de <i>Aspergillus niger</i> en cáscara de naranja.....	34
Figura 10. Preparación del inóculo y conteo en cámara de Neubauer.....	34
Figura 11. Esquema del proceso de fermentación en estado sólido.....	36
Figura 12. Recuperación de los compuestos bioactivos.....	36
Figura 13. Determinación de azúcares totales por microplaca	37
Figura 14. Determinación de taninos hidrolizables por microplaca	38
Figura 15. Determinación de taninos condensados por microplaca	38
Figura 16. Equipo de Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) y muestras de cáscara de naranja obtenido por fermentación sólida	40
Figura 17. Características microscópicas observadas a partir de cultivo de <i>Aspergillus niger</i> con Azul de metileno, observado en un microscopio con objetivo de 40 x.....	41
Figura 18. Cabezas aspergiliares de <i>A. niger</i>	42
Figura 19. Crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> en APD.....	42
Figura 20. Curva estándar de dextrosa para cuantificar azúcares totales..	43
Figura 21. Concentración de azúcares totales en cada tratamiento.....	44
Figura 22. Curva estándar para cuantificar los taninos hidrolizables.....	45
Figura 23. Concentración de taninos hidrolizables en cada tratamiento.....	45
Figura 24. Curva estándar para la determinación de taninos condensados	46
Figura 25. Concentración de taninos condensados de cada tratamiento...	48
Figura 26. Cantidad de taninos condensados a partir de la fermentación en estado sólido.....	49
Figura 27. Diagrama de Pareto de los factores evaluados en el diseño experimental	49
Figura 28. Efecto del MgSO ₄ y KCl sobre el efecto de liberación de taninos condensados.....	50
Figura 29. Efecto del MgSO ₄ e inóculo sobre el efecto de liberación de taninos condensados.....	51
Figura 30. Efecto del KCl e inóculo sobre el efecto de liberación de taninos condensados.	52

ÍNDICE DE CUADROS

Nombre	Página
Cuadro 1. Concentración de flavonoides en flavedo, albedo y cáscara de naranja variedad Valencia (mg por 100g de peso fresco).....	7
Cuadro 2. Contenido de taninos condensados poliméricos en algunos alimentos (USDA, 2004).....	11
Cuadro 3. Porcentaje de taninos condensados reactivos con formaldehído en medio ácido en los extractos liofilizados y la corteza de las especies estudiadas.....	12
Cuadro 4. Microorganismos productores de taninas.....	22
Cuadro 5. Matriz condensada de tratamientos a través de un diseño exploratorio Box Hunter y Hunter.....	35
Cuadro 6. Compuestos polifenólicos identificados por cromatografía líquida de alta resolución HPLC	53

RESUMEN

En la elaboración de jugos y bebidas en base de cítricos, en el procesamiento de la materia prima se generan una gran cantidad de residuos que pueden ser aprovechados para la obtención de moléculas con aplicación en el área de alimentos y farmacia. El objetivo de este trabajo fue extraer los compuestos bioactivos de la cáscara de naranja utilizando un sistema de fermentación en estado sólido por *Aspergillus niger* y como soporte cáscara de naranja. Se evaluaron las condiciones iniciales de fermentación en el cual se utilizó un diseño exploratorio Box Hunter y Hunter, en la matriz experimental se evaluaron 3 variables independientes: inóculo (esporas/g), KCl (g/l) y MgSO₄ (g/l) a dos niveles uno mínimo (-1) y máximo (+1) con un total de 8 tratamientos por triplicado. Todos los experimentos se manejaron a una temperatura de 28 °C, se incubaron por 12 días, posteriormente se recuperaron los extractos con papel filtro utilizando una solución de etanol- agua al 50 %. Se observó mayor contenido de taninos condensados en todos los tratamientos que taninos hidrolizables. El valor más alto en taninos condensados (127.52 g/l) se obtuvo con el tratamiento cuatro con una cantidad de inóculo de 1×10^8 (esporas/g), 0.76 (g/l) de KCl y MgSO₄. En los azúcares totales el valor más alto (123881.31 mg/l) se obtuvo con el tratamiento tres bajo las siguientes condiciones: inóculo 1×10^8 (esporas/g) 0.76 (g/l) de KCl y 1.56 (g/l) MgSO₄. Para la identificación de compuestos bioactivos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) los resultados mostraron que en todos los tratamientos se encontraron los siguientes compuestos: Escopoletina, ácido ferúlico, ácido glicólico *p*-cumaroil, (-) –epicatequina, cirsimaritina, ácido 5-O-galoilquínico, ácido ferúlico 4-O-glucósido, ácido 3-feruloilquínico, ácido 5-5-Dehidroferúlico, luteolin 7-O-(2-apiosil-glucósido), apigenina 6,8-di-C-glucósido, quercetina 3-O-xilosil-glucurónido, Isoramnetina 3-O-glucósido7-O-ramnosido. La utilización de cáscara de naranja representa una alternativa biotecnológica para la producción de biocompuestos, que son considerados como antioxidantes naturales o como aditivos alimentarios.

Palabras clave: cáscara de naranja, fermentación sólida, compuestos bioactivos, taninos condensados

1. INTRODUCCIÓN

La naranja es la fruta que más se produce en el mundo y la de mayor consumo per cápita (Ramos-Novelo, 2003). Proviene del sureste de Asia y pertenece al género *Citrus* de la familia de las Rutáceas (*Rutaceae*). De entre los diferentes tipos de naranja, la variedad dulce (*Citrus sinensis*) es la más importante.

México es un gran productor de cítricos, la citricultura mexicana aporta el 15 por ciento de la producción mundial. Del total de la superficie plantada de frutales en el país, los cítricos representan el 44 %. Los cítricos en México se cultivan en 23 estados de la República generando una producción de 5.5 millones de toneladas anuales. De la producción nacional se destina un 15 % a la industria, generando aproximadamente 189,750 toneladas de cáscara como subproductos en la industria (SAGARPA, 2009).

Alrededor de un tercio de frutas cítricas van a producir jugo fresco o bebidas a base de cítricos. El rendimiento de jugo de frutas cítricas representa la mitad del peso de la fruta, y por lo tanto una gran cantidad de desecho de pulpa y cáscara es producido cada año a nivel mundial (Li y col. 2006a). En la agricultura y producción tradicionales, estos residuos (cáscaras) tienen valor bajo o nulo y aún pueden constituir un problema ambiental debido a su acumulación cerca de las zonas industriales. Los residuos generados han sido tradicionalmente transformados en salvado peletizado para alimento de animales (Rezzadori y col. 2012) Sin embargo, se ha encontrado que las cascaras son la principal fuente de polifenoles en frutas cítricas (Padilla-Camberos y col. 2014). Residuos de cáscara de naranjas dulces y amargas, limones y mandarinas han probado ser fuente importante de ácidos fenólicos y flavonoides, principalmente polimetoxiflavonas (PMFs), flavanonas, y flavanonas glicosiladas (Wang y col. 2014; Xi y col. 2014). Por otro lado, algunos estudios han argumentado que los flavonoides agliconas exhiben una mayor capacidad antioxidante y eficiencia para captar radicales que

sus respectivos glucósidos (Cavia-Saiz y col. 2010). En lo que respecta a la cáscara de naranja dulce (*Citrus sinensis*), se encuentra tener un buen potencial antioxidante y puede usarse como aditivo en preparaciones alimenticias y medicinales (Anagnostopoulou y col. 2006). Por otra parte, polimetoxiflavonas hidroxiladas y flavonoides metiladas en cáscara de naranja dulce fueron identificados (Li y col. 2006a). La extracción de estos compuestos bioactivos mejorará así el valor de los productos de la cáscara de cítricos.

El interés en el desarrollo de bioprocesos para la producción o extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales ha aumentado en los últimos años debido a las posibles aplicaciones de estos compuestos en las industrias alimentaria, química y farmacéutica. Por lo general, los compuestos bioactivos se recuperan de fuentes naturales mediante extracción sólido-líquido empleando solventes orgánicos en sistemas de reflujo de calor (Martins y col. 2010; Wang y Weller, 2006). Sin embargo, recientemente se han propuesto otras técnicas para obtener estos compuestos, incluido el uso de fluidos supercríticos, procesos de alta presión, extracción asistida por microondas y extracción asistida por ultrasonido (Cortazar y col. 2005; Markom y col. 2007; Wang y Weller, 2006). La extracción para la producción de compuestos bioactivos mediante fermentación es también una alternativa novedosa que merece atención, ya que es capaz de proporcionar extractos de alta calidad y alta actividad al tiempo que excluye cualquier toxicidad asociada a los solventes orgánicos. En este proceso, se obtienen compuestos bioactivos como metabolitos secundarios producidos por microorganismos después de que se completa el crecimiento microbiano (Nigam, 2009). Los estudios sobre cultivo líquido muestran que la producción de estos compuestos comienza cuando el crecimiento está limitado por el agotamiento de un nutriente clave: fuente de carbono, nitrógeno o fosfato (Barrios-González y col., 2005). En este contexto, la fermentación en estado sólido (SSF) ha recibido una gran atención porque este bioproceso tiene el potencial de convertir con éxito residuos agroindustriales de bajo costo y alta productividad volumétrica, (Padey y col. 2008; Rodríguez y col. 2006; Robinson y col. 2003) en una gran variedad de compuestos valiosos, incluidos compuestos fenólicos bioactivos.

1.1 JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, la preocupación por el aprovechamiento de residuos agroindustriales ha tomado gran fuerza entre la comunidad científica y sobre todo a nivel industrial, en donde los procesos de transformación generan subproductos que pueden ser útiles en otras actividades. De hecho, estudios recientes han demostrado que las cáscaras de frutas como la naranja contienen antioxidantes que podrían tener un efecto benéfico en la salud humana (Londoño-Londoño y col. 2010).

En México se produce aproximadamente 189,750 toneladas de cáscara de cítricos al año, como residuo de las industrias, por lo que su aprovechamiento resulta importante. La obtención de compuestos bioactivos a nivel industrial es mediante el uso de técnicas convencionales, como el uso de ácidos o bases fuertes lo cual involucra un impacto negativo al medio ambiente, además que el proceso de recuperación del producto es costoso. En este trabajo se propone una alternativa biotecnológica para revalorizar y utilizar los residuos de cáscara de naranja y obtener productos de alto valor agregado, utilizando un sistema de fermentación en estado sólido, esto conlleva a diferentes ventajas como ser un proceso fácil y de bajo costo, permite aprovechar los residuos de naranja como soporte-sustrato, el producto se puede recuperar más fácilmente, entre otras.

1.2 HIPOTESIS

La extracción asistida con fermentación sólida utilizando residuos de naranja con *Aspergillus niger* permitirá la acumulación y recuperación de los compuestos bioactivos

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 General.

Obtener compuestos bioactivos a partir residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) utilizando extracción asistida por fermentación en estado sólido.

1.3.2 Específicos

- Identificar y caracterizar al microorganismo que se utilizará en el proceso de fermentación en estado sólido.
- Extraer los compuestos bioactivos presentes en la cáscara de naranja mediante el empleo de un diseño experimental exploratorio Box Hunter & Hunter.
- Cuantificar e Identificar los compuestos bioactivos obtenidos a partir de la extracción asistida por fermentación en estado sólido.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 NARANJA

La naranja es la fruta que más se produce en el mundo y la de mayor consumo per cápita (Ramos-Novelo, 2003). Proviene del sureste de Asia y pertenece al género *Citrus* de la familia de las Rutáceas (*Rutaceae*). De entre los diferentes tipos de naranja, las variedades de naranja dulce (*Citrus sinensis*) son las más importantes a nivel comercial.

Los frutos de los cítricos son bayas modificadas llamados hesperidios, que se caracterizan por ser carnosos y tener semillas dispuestas en forma radial en su parte central. Generalmente la cáscara de la naranja está formada por el exocarpo, capa externa de color llamado flavedo, y por el mesocarpo, capa interna esponjosa de color blanco conocida como albedo. El endocarpo es la parte comestible del fruto; corresponde a la porción interior de los carpelos, los cuales son segmentos cerrados que contienen vesículas con jugo y semillas (Davies y Albrigo, 1994). El número de gajos de la naranja es igual o superior a siete. En su estado maduro, el fruto alcanza un diámetro de 6 a 10 centímetros y un peso sin cáscara de 150 a 200 gramos.

El albedo de la cáscara es rico en celulosa, hemicelulosa, lignina, sustancias pécticas y compuestos fenólicos (Ligor y Buszewski, 2003); por su parte, los constituyentes más importantes del flavedo son compuestos carotenoides y aceites (Cancalon, 1994).

El contenido total de carotenos es de 30 a 300 mg/kg de cáscara de naranja fresca (Fálder, 2003), siendo la violaxantina el pigmento carotenoide más abundante en cáscara de naranja dulce madura (Rodrigo y col. 2004). El aceite esencial contenido en el flavedo varía en un rango de 0.5 a 3.0 kg/t de naranja. Está compuesto por terpenos (>90 %), compuestos oxigenados y compuestos no volátiles. Los principales terpenos presentes en el aceite de naranja son el limoneno y el α -pineno y los principales compuestos oxigenados son el linalol y el

decanol (Díaz y col. 2005). Tanto en el flavedo como en el albedo de la cáscara se encuentran presentes flavonoides (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentración de flavonoides en flavedo, albedo y cáscara de naranja variedad Valencia (mg por 100g de peso fresco).

Flavonoide	Flavedo	Albedo	Cáscara ^α
Flavononas			
Eriocitrina	8.2	3.6	5.9
Neoeritrina	0.0	0.0	0.0
Narirutina	13.3	118	66.5
Naringina	0.0	0.0	0.0
Hesperidina	495	2300	1410
Neohesperidina	0.0	0.0	0.0
Neoponcirina	10.1	73.0	42.1
Poncirina	0.0	0.0	0.0
Flavonas			
Rutina	0.0	0.0	0.0
Isorroifolina	2.3	0.0	1.1
Roifolina	11.8	0.0	5.8
Diosmina	11.1	0.0	5.5
Neodiosmina	6.0	0.0	3.0
Flavonas Polimetoxiladas			
Sinensetina	64.6	4.5	34.0
Nobiletina	33.7	3.1	18.1
Tangeritina	15.7	1.6	8.5
Heptametoxiflavona	4.1	0.0	2.0

^α Datos calculados a partir de los resultados experimentales de flavedo y albedo.
Fuente: Nogata y col. 2006.

La cáscara de naranja dulce contiene otros compuestos bioactivos, como las polimetoxiflavonas (Li y col. 2006a), ácidos fenólicos, flavonoides, limonoides y fibra (Huang y Ho, 2010)

2.2 FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS DE LA CASCARA DE NARANJA

Los flavonoides son polifenoles que se encuentran comúnmente en frutas, en cítricos, vegetales, nueces y granos; se pueden encontrar en forma libre o unidos a azúcares formando heterósidos; estos compuestos han despertado un gran interés en la investigación debido a que se ha reportado que poseen diversas propiedades benéficas para la salud del ser humano, tales como actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas, protección contra enfermedades del corazón, además de propiedades antioxidantes. Además, se ha reportado que los frutos cítricos tienen un alto contenido de compuestos fenólicos, siendo las cáscaras de estos frutos una fuente importante de estos compuestos. Los tres tipos de flavonoides presentes en los cítricos son: flavanonas, flavonas y flavonoles. (Martínez-Valverde y col., 2000; Kang y col. 2006).

Tradicionalmente, la cáscara de naranja se procesaba para obtener fracciones valiosas para aplicaciones en alimentos, medicamentos y cosméticos (Li y col., 2006a). Estudios realizados por Huang y Ho (2010) reportaron efectos biológicos en cáscara Tonkan (*Citrus tankan Hayata*) y la cáscara Ponkan (*Citrus reticulate Blanco*), contienen polimetoxi-flavonas, muestran actividad antiinflamatoria.

Se tienen informes que en la cáscara de naranja dulce (*Citrus sinensis*), tiene un buen potencial antioxidante y puede usarse como aditivo en preparaciones alimenticias y medicinales (Anagnostopoulou y col. 2006). También se han identificado polimetoxiflavonas hidroxiladas y los flavonoides metilados en la cáscara de naranja dulce (Li y col. 2006a).

La hesperidina, un glucósido de flavanona, mejora la integridad vascular, disminuye la permeabilidad capilar y se administra como un suplemento a los pacientes con fragilidad de los vasos sanguíneos (Londoño-Londoño y col. 2010). El Nobiletin, una polimetoxiflavona, también mostró actividad inmunomoduladora, antiaterogénica y otras actividades biológicas (Huang y Ho, 2010).

2.3 TANINOS

Son polifenoles vegetales, metabolitos secundarios presentes en la vacuola y el citoplasma de muchas plantas (flores, frutos, semillas, hojas, raíces, madera y corteza), indistintamente de su ubicación geográfica (Rosales y col., 2002; Cano y col., 2002; Kim, 2009, Córdoba 1989).

Se distinguen por las siguientes características generales: son solubles en agua, su masa molecular oscila entre 500 y 5000 Daltons, por su estructura y carácter polifenólico (12-16 grupos fenólicos y 5-7 anillos aromáticos por cada 1000 unidades de masa molecular relativa), (Isaza,. 2007). Los taninos son compuestos que no solo poseen un elevado peso molecular, sino además presentan suficientes grupos hidroxilo unidos a estructuras fenólicas que les confieren la característica de formar complejos con proteínas, minerales y otras macromoléculas (Reed, 1995). Los taninos están compuestos de ésteres de ácido gálico (galotaninos) o ácido elágico (elagitaninos) con un núcleo de azúcar que generalmente es glucosa, y se hidrolizan fácilmente mediante ácidos o enzimas en productos monoméricos. (Bath y col. 1998)

Los taninos se clasifican en dos grupos hidrolizables y no hidrolizables o condensados, estos últimos tienen como núcleo central a un glucósido (un alcohol polihídrico como la glucosa) y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente ya sea con el ácido gálico o el ácido hexahidroxidifénico, formando los galotaninos y elagitaninos respectivamente (Chung y col. 1998a). Los taninos condensados también llamados proantocianidinas son moléculas oligoméricas o poliméricas de unidades flavan-3-ol o catequinas ligados por medio de carbono-carbono y uniones éter. Se han identificado quince clases de proantocianidinas (catequina y sus polímeros), prodelfinidinas (galocatecina y sus derivados) y propelargonidinas (afselecina y sus polímeros) o sus mezclas. En estos taninos, las unidades monoméricas están primariamente unidas por medio de uniones 4 → 6 o 4 → 8 carbono-carbono (unión β), o por medio de las uniones 4 → 8 carbono-carbono y 2 → 7 uniones aisladas en plantas no alimenticias o constituyendo compuestos menores en algunos alimentos. Los taninos pueden

variar desde dímeros hasta grandes polímeros. Se encuentran en una amplia variedad de alimentos como manzanas, bayas, chocolate, vinos rojos, frutos secos y otros (Sarría, 2005).

Una segunda clase de taninos presentes en alimentos son los derivados que se forman principalmente bajo condiciones enzimáticas oxidativas y atmosféricas o durante el procesamiento de los alimentos, como por ejemplo los que se encuentran en vinos rojos, té y café. A causa de la complejidad de los compuestos, ha sido difícil utilizar una estricta denominación química y con frecuencia se les han asignado nombres populares (Clifford, 1992). De los té oolong y negro se derivan las teoflavinas y derivados del flavanol. La característica de las teoflavinas es un anillo de siete miembros.

Otra clase de taninos en los alimentos, constan de ácido gálico o ácido elágico, al que esterifica un poliol no aromático, como el azúcar o el ácido quínico. En esta clase de taninos, también pueden producirse otras uniones (C-C o C-O-C), para formar dímeros y complejos superiores, que tienen varios grados de resistencia a la fractura química. Se ha demostrado el efecto de la mejora en las características sensoriales de los vinos, derivado de la acción de los taninos hidrolizables (Sarría, 2005).

Los polifenoles no constituyen un grupo químico único, tiene una amplia variedad de estructuras moleculares; en general, los taninos se agrupan en dos clases: condensados o proantocianidinas e hidrolizables; los condensados son polímeros de flavan-3-ol (catequina), flavab-3,4-diol (leucoantocianidina) o sus derivados, en tanto los hidrolizables, son los polímeros de ácido galico o ácido elágico esterificado con glucosa o con catequina (Reed, 1995).

Los taninos son compuestos que no solo poseen un elevado peso molecular, sino además presentan suficientes grupos hidroxilo unidos a estructuras fenólicas que les confieren la característica de formar complejos con proteínas, minerales y otras macromoléculas (Reed, 2010).

2.3.1 FUENTES DE TANINOS

La USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés) tuvo el interés de crear una base de datos que estableciera el tipo y las cantidades de taninos condensados presentes en distintos alimentos comunes de la dieta americana (USDA, 2004; Prior y Gu, 2005). Este documento reveló que la presencia de proantocianidinas (taninos condensados) variaba según la parte del fruto que se analizaba, siendo habitualmente más abundante en la piel de frutas como uvas y manzanas. Cabe mencionar que uno de los hallazgos más importantes de este estudio fue que las frutas con mayor contenido de taninos condensados fueron las bayas salvajes del bosque, seguidas de los arándanos. En el grupo de cereales y leguminosas, el sorgo y el cacao fueron los alimentos con mayor concentración de taninos, mientras que el grupo de las nueces lo encabezan las avellanas y las nueces pecaneras. Por último, en las especias, la que mayor contenido de taninos condensados exhibió fue la canela (Prior y Gu, 2005). Los detalles y cantidades de taninos presentes en estos alimentos se muestran en el Cuadro 2. No obstante, como se mencionó anteriormente, los taninos condensados se encuentran también en otros productos alimenticios, solo que, en menores concentraciones, como por ejemplo en manzanas, duraznos, mangos, frijoles pintos, pistachos y bebidas como el vino tinto.

Cuadro 2. Contenido de taninos condensados poliméricos en algunos alimentos en algunos alimentos (USDA, 2004).

Producto alimenticio	Taninos condensados (mg/100g de producto)
Frutas	
Bayas	255 ± 8.39
Arándanos	233 ± 49.08
Cereales y leguminosas	
Sorgo	2927 ± 335.38
Cacao	1568.49 ± 334
Nueces	
Avellana	322.44 ± 102.48
Nuez pecanera	223.01 ± 59.01
Especias	
Canela	2508.78

Por otro lado, Aguilar y col. (2012), reportaron producción de taninos condensados reactivos con formaldehído en medio ácido en extractos liofilizados y corteza de 11 especies maderables se muestran en el siguiente cuadro 3.

Cuadro 3. Porcentaje de taninos condensados reactivos con formaldehído en medio ácido en los extractos liofilizados y la corteza de las especies estudiadas.

Especie	Porcentaje de taninos condensados reactivos	
	En el extracto liofilizado ($\pm 0.1\%$ m/m)	En la corteza ($\pm 0.01\%$ m/m)
Guanacaste (<i>Enterolobium cyclocarpum</i>)	7.2	0.69
Alcornoque (<i>Licania arborea</i>)	61.9	2.90
Jobo (<i>Spondias mombin</i>)	66.1	2.10
Pochote (<i>Pachira quinata</i>)	72.8	10.92
Níspero (<i>Manilkara chicle</i>)	50.5	2.00
Almendro (<i>Andira inermis</i>)	6.2	0.34
Roble (<i>Tabebuia rosea</i>)	24.3	1.10
Cedro (<i>Cedrela odorata</i>)	72.7	3.64
Cenízaro (<i>Samanea saman</i>)	6.1	0.41
Pino (<i>Pinus caribaea</i>)	70.7	13.67
Ciprés (<i>Cupressus lusitanica</i>)	0.3	0.03

2.3.2 FACTORES QUE AFECTAN LA CONCENTRACIÓN DE TANINOS

La estructura química de los taninos varía cualitativa y cuantitativamente en vegetales y frutas. Aunque algunos taninos son comunes en el reino vegetal, unos

son característicos de alguna fruta y otros de algún vegetal en específico; por ejemplo, los taninos condensados abundan en las uvas, sin embargo, en ciertas variedades de *V. vinifera* predominan los taninos condensados acilados (Cheynier, 2005). Otros factores que afectan la presencia de taninos en vegetales son las condiciones ambientales (Torchio y col. 2010), genéticas o estado de maduración del fruto o la planta (Bindon y Kenedy, 2011). Por ejemplo, por cuestiones genéticas, la uva contiene tanto taninos hidrolizables como condensados, estos últimos predominan especialmente en semilla, posiblemente por la mayor expresión de genes de biosíntesis en semilla (Schofield y col. 2001)

La maduración también influye en el tipo y concentración de taninos. Por ejemplo, en la cáscara de uvas, los taninos condensados se presentan en mayor grado de polimerización conforme el estado de maduración avanza (Kennedy y col. 2001); otro factor importante es la parte del fruto, así, la mayor proporción de taninos condensados en manzana se encuentra en la cáscara (Prior y Gu, 2005).

Los vegetales y frutos tienen la capacidad de acumular taninos en la totalidad de la planta de la que provienen: semillas, frutos, madera, raíz, hojas. En condiciones normales, los taninos vegetales representan del 2 al 7 % del peso fresco de la planta. Esta cantidad representa la suma de todos los tipos de taninos presentes en el vegetal. No obstante, las concentraciones pueden aumentar debido al estrés producido por el ataque de patógenos (Haslam, 2007).

2.4 TANINOS CONDESADOS O PROANTOCIANIDINAS

También denominadas leucoantocianinas, son moléculas oligoméricas o poliméricas de unidades flavan-3-ol o catequinas, unidas a través de enlaces C-4 a C-8, o menos frecuentemente, C-4 a C-6, son más resistentes al ataque microbiano en comparación con los taninos hidrolizables y en su mayoría constituyen potentes antioxidantes (García y col. 1997; Kinsella y col. 1993). Se conocen también como no hidrolizables, ya que se hidrolizan con dificultad y por el contrario, el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular (flobáfenos). Este tipo de taninos se producen en el metabolismo normal de los vegetales por lo que se consideran fisiológicos y se encuentran

ampliamente repartidos en el reino vegetal. Normalmente se encuentran en las vacuolas de las células y en las paredes celulares de las plantas (Márquez-Lara y Suárez-Londoño, 2008).

Los taninos no hidrolizables están formados por flavan 3,4-dioles (leucoantocianina y proantocianina). La catequina es un flavan-3-ol con dos grupos hidroxilo en el anillo lateral. Las catequinas incluyen ésteres de ácido gálico con los restos ácidos unidos a los grupos hidroxilo. Los flavan-3,4-dioles también se denominan como leucoantocianidinas.

Una de las principales características de los taninos condensados es su capacidad de dar reacciones de condensación con formaldehído en medio ácido o básico (Kusak y col. 1998), dando como resultado un producto sólido polimérico con propiedades adhesivas (Taiwo, 1997; Wang y col. 1995). Los taninos condensados forman compuestos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas que pueden ser reversibles, con la formación de enlaces hidrofóbicos y/o de hidrogeno, o irreversibles a través de la oxidación de los grupos fenólicos con una quinona reactiva (Carrulla y Lascano 1994).

Los flavan-3-oles también se denominan catequinas y constituyen la base de los principales grupos de taninos condensados. (Escribano Bailón 1993). En la Figura 1. Se muestran los flavan-3-oles más comunes.

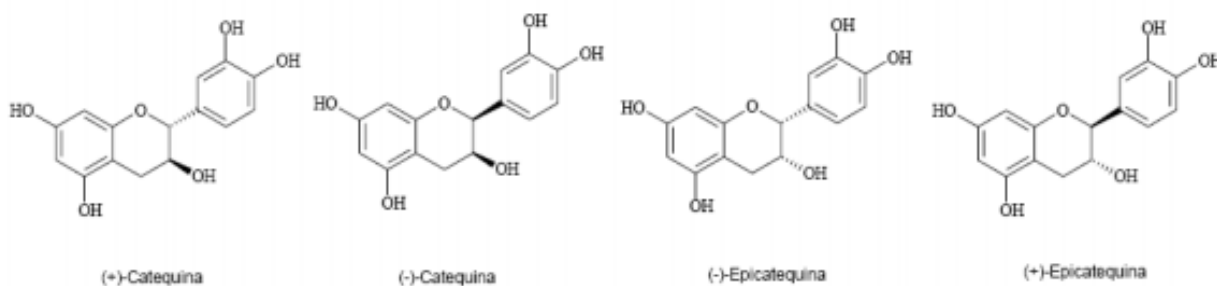


Figura 1. Estructura de los compuestos flavan-3-oles más comunes. Adaptado de García Ramirez (2005).

Los Taninos condensados presentan un peso molecular comprendido entre 500 y 3.000 Daltons (Bate-Smith 1975, Hagerman y Butler 1981, Haslam 1996). Luego de una hidrólisis ácida, estos compuestos forman antocianidinas, razón por la cual suele asignársele el nombre de proantocianidinas (Figura 3). Los taninos condensados cuya hidrólisis da origen a cianidinas denominados procianidinas. En cambio, los taninos condensados cuya hidrólisis produce delfinidina, son conocidos como prodelfinidinas (Figura 2). Estos dos tipos de taninos condensados son los más comunes en especies de la familia de las leguminosas (Aoki y col. 2000).

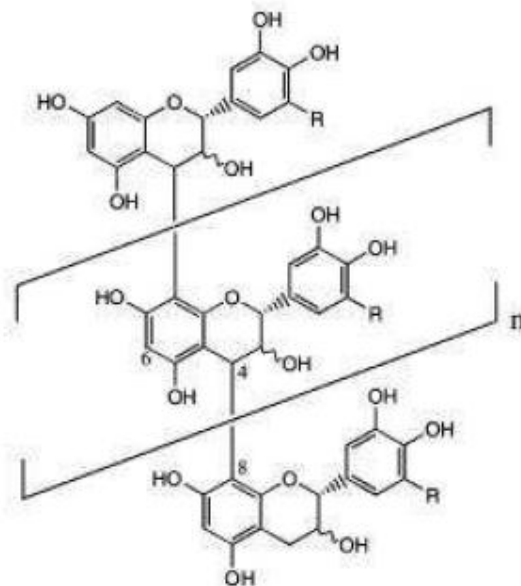


Figura 2. Modelo de la estructura de los taninos condensados. Si R= H u OH la estructura representa procianidinas o prodelfinidinas respectivamente. Adaptado de Schofield y col. (2001).

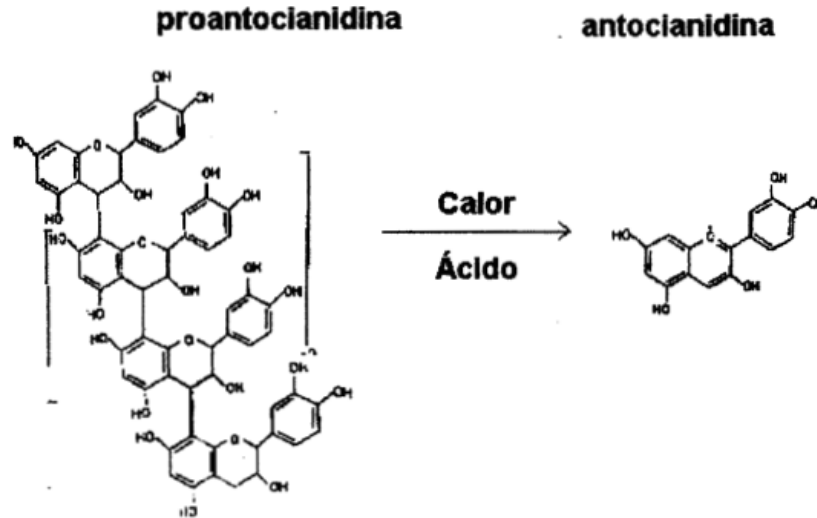


Figura 3. Despolimerización de taninos condensados (Proantocianidina).
(Escárcega C., 2001).

2.4.1 BIOSÍNTESIS DE TANINOS CONDENSADOS

La primera etapa de la biosíntesis de los taninos condensados comienza con la acción de las enzimas fenilalanina amonio-liasa (PAL) y chalcona sintasa (CHS), finalizando con la producción de leucoantocianidinas en un paso metabólico catalizado por la dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) (Figura 4). Posteriormente, la biosíntesis de taninos condensados puede continuar por dos vías alternativas. Una de ellas, denominada “vía de las catequinas”, implica la producción de unidades de flavan-3-ol en un proceso regulado por la enzima leucoantocianidina reductasa (LAR). Las unidades formadas (catequinas) son transportadas a la vacuola, donde son utilizadas para formar los polímeros. La otra vía, denominada “vía de las epicatequinas” comienza con la formación de antocianidinas a partir de las leucoantocianidinas en un proceso catalizado por la acción de la enzima antocianina sintasa (ANS). Este metabolito intermediario puede ser utilizado para la síntesis de antocianinas a través de la acción de las enzimas glutathion S-transferasa (GST) y glicosiltransferasas (GS). Otro camino que pueden tomar las antocianidinas es a través de la vía de las epicatequinas, donde son utilizadas, a través de la acción de la enzima antocianidina reductasa (ANR), para la formación de las unidades de flavan-3-ol (epicatequinas).

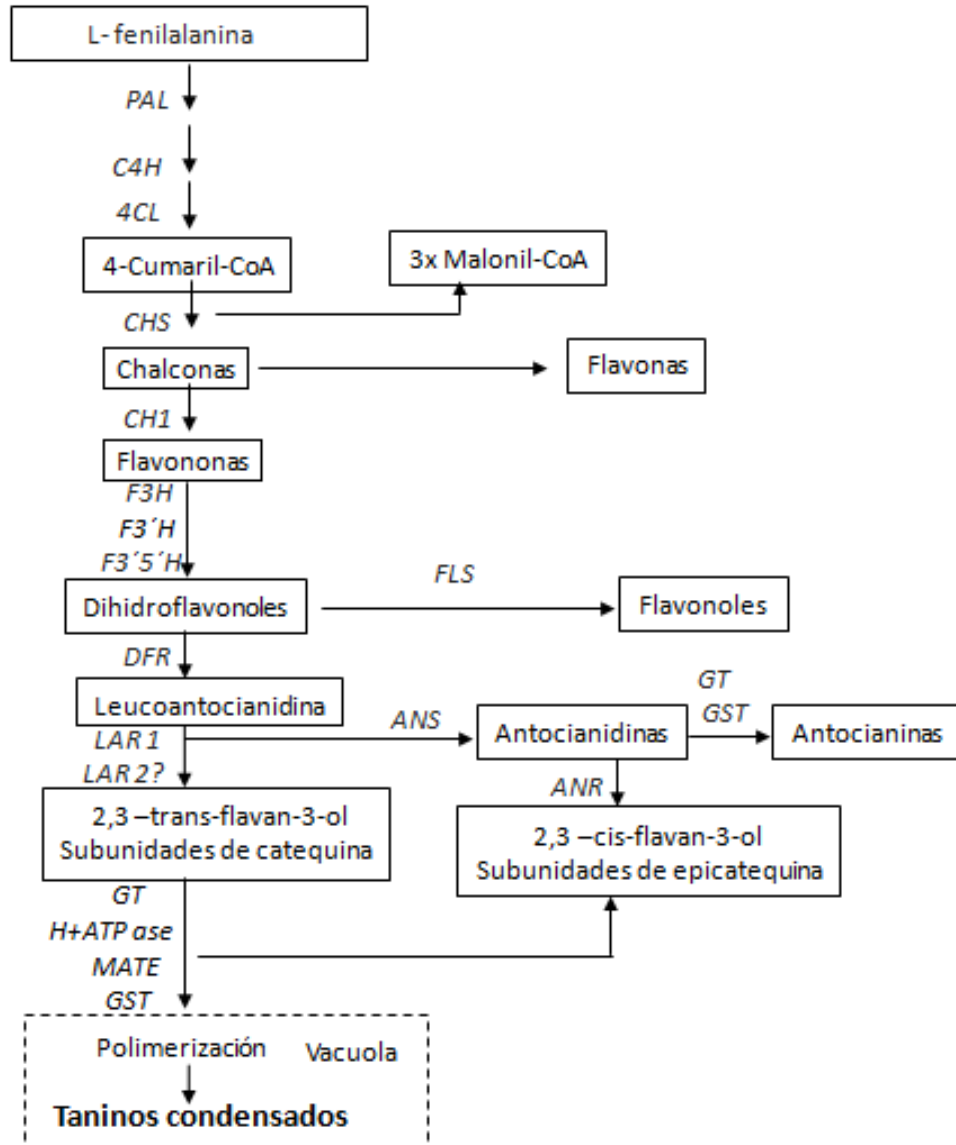


Figura 4. Biosíntesis de taninos condensados y antocianinas, mostrando las enzimas e intermediarios implicados. *4CL*: 4-cumarato CoA ligasa, *ANR*: antocianidina reductasa, *ANS*: antocianina sintasa, *C4H*: cinamato 4-hidroxilasa, *CH1*: chalcona isomerasa, *CHS*: chalcona sintasa, *DFR*: dihidroflavanol reductasa, *F3H*: flavanona-3-hidroxilasa, *F3'H*: flavonoide 3'-hidroxilasa, *F3'5'H*: flavonoide 3'-5'-hidroxilasa, *FLS*: flavonol sintasa, *GST*: glutation Stransferasa, *GT*: glicotransferasas, *LAR*: leucoantocianidina reductasa, *MATE*: familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (del inglés "multidrug and toxic compound extrusion"), *PAL*: fenilalanina amonio-liasa. El signo de pregunta indica la actividad putativa de la proteína codificada por *LAR2*.

Las unidades de flavan-3-ol son las precursoras de los taninos condensados. Por ello son consideradas las “unidades de inicio” a partir de las cuales se formarán los taninos condensados en un proceso de polimerización por el cual se van adicionando unidades a través de enlaces carbono-carbono (Stafford 1989, Tanner y Kristiansen 1993, Singh y col. 1997, Schofield y col. 2001, Paolocci y col. 2005, Paolocci y col. 2007, Tian y col. 2008). La biosíntesis de las unidades de flavan-3-ol ocurre en el citosol de la célula, donde son posteriormente glicosidadas. En relación a ello, se ha observado que el gen *UGT72L1* de *M. truncatula* codifica una proteína denominada *epicatequina glucosiltransferasa (UDP)* la cual es específica de las unidades (-) epicatequinas y produce su glicosidación (Pang y col. 2008). Las unidades glicosiladas son transportadas hacia el interior de las vacuolas por la acción de la enzima codificada por el gen *TT12* perteneciente a la familia *MATE* (familia de extrusión de multifármacos y tóxicos, del inglés *multidrug and toxic compound extrusion*) que se encuentra ubicada en la membrana vacuolar (Zhao y Dixon 2009). Dentro de la vacuola se produce la polimerización a través de la unión de las unidades de catequinas y/o epicatequinas en un proceso que no ha sido completamente dilucidado aún (Zhao y col. 2010).

La estructura de los taninos condensados formados resulta variable, dependiendo de la estereoquímica y del patrón de hidroxilación de la subunidad de flavan-3-ol iniciadora y las subunidades de extensión que componen el polímero (Aoki y col. 2000).

Se ha propuesto que la hidroxilación del anillo B de los dihidroflavonoles intermediarios (Figura 6) sería el determinante del tipo de unidad de flavan-3-ol formada (Robbins y col. 2005). Esta hidroxilación se encontraría mediada por las enzimas *flavonoide 3' hidroxilasa (F3'H)* y *flavonoide 3'5' hidroxilasa (F3'5'H)*. Una versión simplificada de los caminos biosintéticos que pueden tomar estos compuestos puede observarse en la Figura 5.

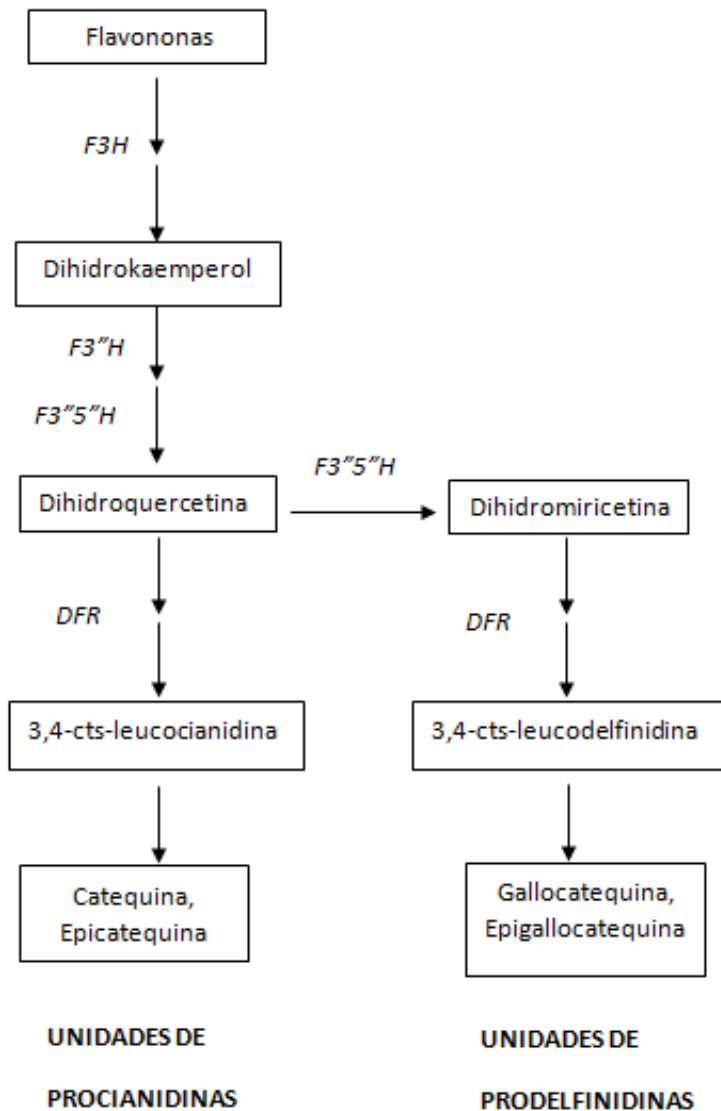


Figura 5. Esquema simplificado de las vías de hidroxilación que pueden tomar los precursores de las unidades de flavan 3-ol que forman los taninos condensados. Adaptado de Robbins y col. (2005).

2.4.2 APLICACIONES DE TANINOS CONDENSADOS

Los taninos condensados han sido más estudiados respecto a su actividad antioxidante, además de que se ha reportado que poseen beneficios a la salud por su actividad antibacterial o bacteriostático (Okuda, 2005), anticarcinogénica (Chung y col. 1998b), inhibidora de la peroxidación lipídica (Okuda, 2005), y de la

agregación plaquetaria relacionada a la formación de trombos en sistema circulatorio (Fine, 2000). In vivo se ha observado el efecto bacteriostático sobre el jugo de arándano, atribuido a los taninos condensados presentes. El jugo de arándano no solo mantiene saludable el tracto urinario por la acidificación del medio, sino además las proantocianidinas presentes en el jugo exhiben actividad antibacterial, impidiendo la adhesión de *E. coli* a superficies celulares del tracto urinario (Prior y Gu, 2005).

El estudio de la actividad antioxidante de taninos condensados in vitro e in vivo, demuestra que son secuestradores efectivos de radicales libres, que inhiben la oxidación de tejidos mejor que la vitamina C, vitamina E y β -caroteno (Fine, 2000). In vitro, se ha demostrado que los taninos condensados tienen una preferencia por neutralizar el radical libre hidroxilo. Así mismo, se demostró que tienen la capacidad de actuar como inhibidores no competitivos de la enzima xantina oxidasa, una de las mayores generadoras de radicales libres en el metabolismo celular (Fine, 2000).

Por último, la actividad antioxidante de taninos condensados tiene la capacidad de evitar la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y por ello inhibe la formación de trombosis en personas con padecimientos cardiacos como la aterosclerosis. Otros estudios sugieren que la administración de extracto de semilla de uva tiene efecto hipocolesterolemizante en modelos animales, específicamente disminuye las concentraciones de LDL en plasma y aumenta las lipoproteínas de alta densidad (HDL) conocidas como «colesterol bueno» (Fine, 2000).

La actividad antioxidante de los taninos que exhiben in vivo e in vitro, se podría recomendar en la dieta por su capacidad antioxidante y traer beneficios en la salud. Algunos de estos beneficios pueden ser la inhibición de la oxidación lipídica, así como su efecto anti-carcinogénico, que va muy ligado a prevenir daños al ADN causado por radicales libres, y el posterior desarrollo de células mutantes o cancerígenas (Chung y col. 1998b; Fine, 2000; Okuda, 2005). Sin embargo, se debe mencionar que las intervenciones que observaron estos resultados tan

provechosos sobre la salud han sido en modelos animales y no en intervenciones clínicas con seres humanos. Por otra parte, las dosis suministradas son más altas que las que se pueden obtener directamente de fuentes vegetales presentes en la dieta de un individuo promedio.

2.4.3 BIODEGRADACIÓN DE TANINOS

En estudios de degradación de taninos se han encontrado microorganismos resistentes, tal es el caso de *Aspergillus niger*, se ha reportado que puede tolerar hasta 100 g/L de ácido tánico (Aguilar, 2000; Ramírez, 2000). Pero no hay datos de su tolerancia a los taninos condensados, aunque se sabe que puede degradarlos en menor grado que los hidrolizables, tanto en ambientes aerobios como anaerobios (Lewis y Starkey, 1968, Bhat y col. 1998). Se sabe que para la biodegradación de los taninos hidrolizables se sintetizan enzimas llamadas tanasas (tanin-acil-hidrolasa, EC3.1.1.20). El mecanismo de acción es la hidrólisis de los enlaces éster del ácido gálico, que en los taninos hidrolizables puede ser de dos tipos: esterasa, cuando la hidrólisis se da entre una molécula de ácido gálico y glucosa, o bien entre un grupo metilo y una molécula de ácido gálico; depsidasa, cuando la hidrólisis se da entre dos moléculas de ácido gálico y la enzima actúa despolimerizando la molécula, como ocurre en el ácido tánico (Beverini y Metche, 1990).

Se han encontrado diversos microorganismos (cuadro 4) que producen tanasas. Estas enzimas son inducibles, porque su biosíntesis requiere de la presencia de algún derivado de los taninos para producir la enzima, aunque se ignora la estructura química de las moléculas inductoras (Bajpai y Patil, 1996).

Cuadro 4. Microorganismos productores de tanasas.

Microorganismo	Referencia
Bacteria	
<i>Achromobacter sp.</i>	(Lewis y Starkey 1969)
<i>Bacillus pumilis</i>	(Deschamps y col. 1983)
<i>B. polymyxa</i>	(Deschamps y col. 1983)
<i>Corynebacterium spp.</i>	(Deschamps y col. 1983)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Deschamps y col. 1983)
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	(Deschamps 1989)
<i>Selenomonas ruminantium</i>	(Skene y Brooker 1995)
Hongos	
<i>Aspergillus niger</i>	(Knudson 1913; Haslam y Stangroom 1966; Barthomeuf y col. 1994; Lekha y Lonsane 1994; Bajpai y Patil 1996; Bradoo y col. 1996)
<i>Aspergillus oryzae</i>	(Iibuchi y col. 1967; Doi y col. 1973; Beverini y Metche 1990; Bajpai y Patil 1996; Bradoo y col. 1996)
<i>Aspergillus flavus</i>	(Yamada y col. 1968)
<i>Aspergillus japonicus</i>	(Ganga y col. 1977; Bradoo y col. 1996)
<i>Aspergillus aureus</i>	(Bajpai y Patil 1996)
<i>Aspergillus awamori</i>	(Bradoo y col. 1996)
<i>Aspergillus fischerii</i>	(Bajpai y Patil 1996)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	(Bajpai y Patil 1996)
<i>Aspergillus terreus</i>	(Bajpai y Patil 1996)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	(Rajakumar y Nandy 1983; Bajpai y Patil 1996; Bradoo y col. 1996)
<i>Penicillium notatum</i>	(Ganga y col. 1977)
<i>Penicillium islandicum</i>	(Ganga y col. 1977)
<i>Penicillium digitatum</i>	(Bradoo y col. 1996)
<i>Penicillium carylophilum</i>	(Bradoo y col. 1996)
<i>Penicillium charlesi</i>	(Bradoo y col. 1996)
<i>Penicillium citrinium</i>	(Bradoo y col. 1996)
<i>Cryphonectria parasítica</i>	(Farias y col. 1992)
<i>Fusarium solani</i>	(Bajpai y Patil 1996; Bradoo y col. 1996)
<i>Fusarium oxysporium</i>	(Bradoo y col. 1996)
<i>Rhizopus oryzae</i>	(Hadi y col. 1994)
<i>Trichoderma viride</i>	(Bajpai y Patil 1996; Bradoo y col. 1996)
<i>Trichoderma hamatum</i>	(Bradoo y col. 1996)
<i>Trichoderma harzianum</i>	(Bradoo y col. 1996)
<i>Helicostylum sp.</i>	(Bradoo y col. 1996)
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	(Bradoo y col. 1996)
Levadura	
<i>Candida sp.</i>	(Aoki y col. 1976)
<i>Pichia spp.</i>	(Deschamps 1989)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	(Deschamps 1989)

Fuente: Bhat y col. (1998).

La producción de taninas varían, depende del tipo de microorganismo, medio de cultivo (sólido o líquido) y las condiciones de este. (Lekha y Lonsane, 1994 y 1997; Lane y col. 1997; Bajpai y Patil, 1996; Bradoo y col. 1997; Deschamps y col. 1980; Hadi y col. 1994; Chatterjee y col. 1996; Bhat y col. 1997).

Los taninos condensados son polímeros de catequina, y tan solo unos pocos microorganismos han sido reportados capaces de degradarlos, principalmente bacterias (Field y Lettinga, 1992) y algunos hongos (Bhat y col., 1998). Sin embargo, los mecanismos involucrados en la degradación de los taninos condensados no son claros y resultan confusos, especialmente en el caso de los hongos

Grant (1976) reportó una cepa de *Penicillium adametzi* Zaleski que se aisló del enriquecimiento cultivos con taninos condensados como fuente de carbono. Los taninos condensados de bajo peso molecular fueron extraídos y purificados de la corteza de *Pinus radiata*, se usaron como sustratos para mediciones cuantitativas del crecimiento de este hongo en condiciones de cultivo definidas. Galiotou-Panayatou y col. (1988) aislaron una nueva enzima de *Calvatea gigantea* que hidroliza la catequina, el componente básico del tanino condensado. Esta enzima ha sido purificada y caracterizada. La enzima tenía un pH óptimo de 8 y una temperatura óptima de 35 °C. Sambandam (1993) aisló la enzima catequina-2,3-dioxigenasa de *Chaetomium cupreurn*, que escindió catequina, liberando ácido protocatecúico, catecol y ácido fluoroglucinol carboxílico. La enzima estaba activa en el rango de pH de 2 a 8, con pH óptimo a 2.8 y 7.0. La enzima era estable hasta 50 °C y tenía una masa molecular de 40,000 daltons. La catequina oxigenasa era una glicoproteína que presentaba dos puntos isoeléctricos. Se han reportaron varias levaduras que podrían degradar los taninos condensados (taninos de zarzo) (Otuk y Deschamps 1983; Vennat y col. 1986). (Otuk y Deschamps 1983). Aislaron la cepa de *Candida guilliermondii*, *C. tropicalis* y *Torulopsis candida*. La degradación se determinó mediante la estimación de los grupos leucoantocianidina y flavan-3-ol después del tratamiento con las levaduras. Una cepa de *C. guilliermondii* degradó las estructuras de flavan-3-ol pero no afectó

a los componentes de la leucoantocianidina. La mayoría de las levaduras fueron degradadores eficientes de los taninos de quebracho y redujeron el contenido de taninos de los extractos de corteza de madera de pino y gaboon en un 70 a 80% en cinco días.

2.5 ACIDOS HIDROXICINAMICOS Y BENZOICOS

Los ácidos fenólicos presentan un grupo funcional carboxilo y se dividen en dos clases: los ácidos hidroxibenzóicos y los hidroxicinámicos. (Figura 6). Consisten en benceno como enlace de base a un grupo carboxílico (ácidos benzoicos) o al ácido propenóico (ácidos cinámicos). Ambas estructuras se pueden encontrar con hidroxilación en diferentes niveles (Clifford 2000a, Tomas-Barberan y Clifford 2000). Los ácidos hidroxibenzóicos son componentes de estructuras complejas de taninos hidrolizables y son menos abundantes en los vegetales consumidos por los seres humanos, Manach (2004). La concentración de ácido hidroxibenzóico en las frutas y verduras es generalmente baja (Tomas-Barberan y Clifford 2000; Fernandez de Simon y col. 1992; Shahidi y Naczk 2003) a excepción de ciertas frutas rojas, rábano negro, cebolla y piel de patatas (Herrmann, 1989; Törrönen y col. 1997; Lewis y col. 1998). Los principales ácidos hidroxibenzóicos son gálico, elágico, ácidos protocatecúicos y 4-hidrobencóicos.

Manach (2004) menciona que los ácidos hidroxicinámicos están presentes en varios alimentos y bebidas de origen vegetal, tales como el café, yerba mate, manzana, ciruela y otras frutas, las crucíferas, cereales, entre otros. Algunos ejemplos de estos compuestos son el ácido cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico que en la mayoría de los alimentos se esterifica con el ácido, ácido tartárico o hidratos de carbono y derivados, Clifford (1999b). Estos ácidos hidroxicinámicos también se encuentran en forma libre en los alimentos como el tomate y la cerveza. (Crozier y col. 2009, Lafay y col. 2008, Karakaya y col. 2004).

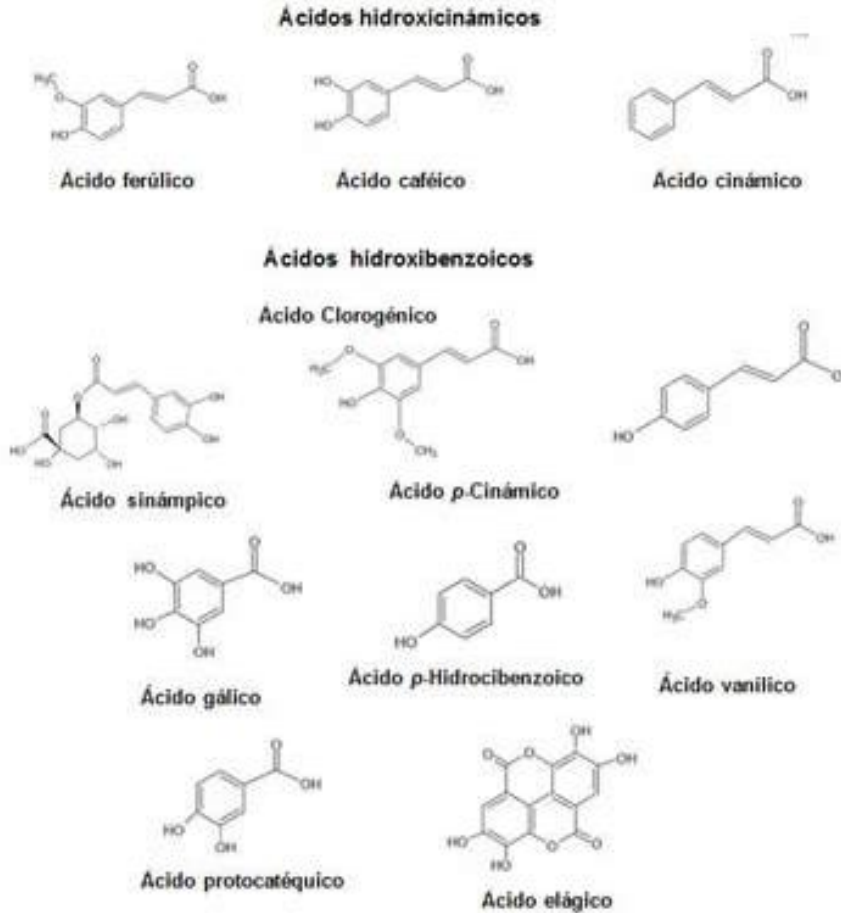


Figura 6. Estructuras químicas de ácidos fenólicos, derivados de ácidos cinámicos y benzoicos. (Gómez y col. 2012).

2.5.1 UBICACIÓN Y FUNCIONES EN LAS PLANTAS.

Aunque aún se desconoce una gran cantidad de ácidos fenólicos en las plantas, se han relacionado con diversas funciones, que incluyen la absorción de nutrientes, la síntesis de proteínas, la actividad enzimática, la fotosíntesis, los componentes estructurales y la alelopatía (Wu y col. 1999, Wu y col. 2000, Einhellig y col. 1986). Los derivados del ácido cinámico y benzoico existen virtualmente en todos los alimentos vegetales (por ejemplo, frutas, verduras y granos) y se dispersan físicamente a través de la planta en semillas, hojas, raíces y tallos (Macheix y col. 1990, Shahidi y Naczk, 1995).

Solo una fracción menor existe como "ácidos libres". En cambio, la mayoría están unidas mediante enlaces éster, éter o acetal a componentes estructurales de la

planta (celulosa, proteínas, lignina) (Andreasen y col. 2000, Hartley y col. 1976, Brett y col.1996a, Brett y col.1996b, Lam y col. 2001), o a polifenoles más grandes (flavonoides) o moléculas orgánicas más pequeñas (p. Ej., Glucosa), ácidos quínico, maléico o tartárico) u otros productos naturales (p. ej., terpenos) (Klick y Herrmann, 1988; Winter y Herrmann, 1986). Estos enlaces dan lugar a una amplia gama de derivados. Es esta diversidad la que es uno de los principales factores en la complejidad del análisis de los ácidos fenólicos.

La diversidad de estos componentes no es exclusiva de sus roles o sus características estructurales. Los ácidos fenólicos no se distribuyen homogéneamente por los tejidos de las plantas (Sikorska y col. 2000). Además, existe una gran variabilidad encontrada durante varias etapas de maduración (Ellnain-Wojtaszek y col. 2001). Se sabe que las condiciones de crecimiento, como la temperatura, también afectan el contenido de ácido fenólico (Zheng y Wang, 2001).

2.5.2 APLICACIÓN DE LOS ÁCIDOS FENÓLICOS EN ALIMENTOS.

La aplicación de estos compuestos ha generado un gran interés en el área de calidad de los alimentos (Herrmann, 1989, Tomás-Barberán y Espín, 2001). Los ácidos fenólicos se han asociado con el color, las cualidades sensoriales y las propiedades nutricionales y antioxidantes de los alimentos (Maga, 1978). Un impulso para las investigaciones analíticas ha sido el papel que estos fenólicos tienen en las propiedades organolépticas (sabor, astringencia y dureza) de los alimentos (Clifford, 1999a, Tan, 2000, Peleg y col. 1991, Brenes-Balbuena y col. 1992, Naim y col. 1992). Además, la industria alimentaria ha investigado el contenido y el perfil de los ácidos fenólicos, su efecto sobre la maduración de las frutas, la prevención del pardeamiento enzimático y su papel como conservantes de los alimentos (Shahidi y Naczk, 1995, Tomás-Barberán y Espín, 2001, Fernández y col. 1998). Su papel en los procesos oxidativos en los alimentos complica aún más su análisis (Robards y col. 1999). Los derivados del ácido hidroxicinámico, ácido *p*-cumárico, ferúlico, caféico y clorogénico presentes en frutas, verduras, te, etc., poseen actividad antimicrobiana Gutiérrez, (2000).

Los fenólicos se comportan como antioxidantes, debido a la reactividad del resto fenol (sustituyente hidroxilo en el anillo aromático). Aunque existen varios mecanismos, se cree que el modo predominante de actividad antioxidante es la eliminación de radicales mediante la donación de átomos de hidrógeno.

Otros antioxidantes establecen que los mecanismos de extinción de radicales son a través de la donación de electrones y la extinción de oxígeno singlete (Shahidi y Wanasundara 1992). Los sustituyentes en el anillo aromático afectan la estabilización y, por lo tanto, afectan la capacidad de eliminación de radicales de estos ácidos fenólicos. Los diferentes ácidos tienen, por lo tanto, una actividad antioxidante diferente (Chalas y col. 2001, Rice-Evance y col. 1996). Se ha informado sobre el comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos libres, esterificados, glucosilados y no glucosilados (Williamson y col. 1999).

2.5.3 APLICACIÓN DE LOS ACIDOS FENOLICOS EN LA SALUD HUMANA

Recientemente se vincula el consumo de frutas y verduras que tienen alto contenido de antioxidantes con la prevención de enfermedades oxidativas como la enfermedad coronaria, el accidente cerebrovascular y el cáncer (Jacob y Buri, 1996, Block y col. 1992). Ciertos alimentos incluso se clasifican como alimentos funcionales, debido a sus efectos protectores saludables establecidos (Stacewicz-Sapuntzakis y col. 2001, Oomah, 2001). Por lo general, cuando se habla de compuestos fenólicos en alimentos vegetales, los flavonoides son la clase predominante descrita (Bors y col. 1996), ya que representan aproximadamente dos tercios de los fenoles en la dieta (Scalbert y Williamson, 2000).

Sin embargo, los ácidos fenólicos representan casi la totalidad del tercio restante, y existen una mayor conciencia e interés en el comportamiento antioxidante y los beneficios potenciales para la salud asociados con estos ácidos fenólicos simples. Su papel como antioxidantes dietéticos ha recibido la mayor atención en la literatura (Rice-Evance y col. 1996, Rice-Evance y col. 1997, Laranjinha, 2002, Lodovici y col. 2001). Debido a su presencia en alimentos de origen vegetal, los humanos consumen ácidos fenólicos a diario. El rango de consumo estimado es

de 25 mg/g por día, dependiendo de la dieta (frutas, verduras, granos, té, cafés, especias) (Clifford, 1999b).

Aunque la naturaleza exacta de los efectos antioxidantes o protectores in vivo no está bien establecida, existen algunas investigaciones preliminares (Nardini y col. 1997, Rechner y col. 2001). Se ha escrito mucho más sobre el comportamiento antioxidante in vitro y químico de compuestos fenólicos (Rice-Evance y col. 1996, Lodovici, y col. 2001, Laranjinha y col. 1994, Morton y col. 2000). Solo se han explorado los destinos metabólicos del ácido caféico, ferúlico, clorogénico y sinápico. El ácido clorogénico es muy probablemente metabolizado por la microflora colónica (Plumb y col. 1999, Azuma y col. 2000). Bourne y col. (1998) informan que solo el 11-25 % del ácido ferúlico ingerido se excreta en la orina como ácido ferúlico libre o como conjugado glucurónido. Ciertos metabolitos excretados comunes y recurrentes reportados son ácido hipúrico (Clifford y col. 2000b) y ácido ferúlico e isoferúlico (Andreasen y col. 2001), así como glucurónidos y conjugados de sulfato de los ácidos fenólicos (Azuma y col. 2000).

Más allá del comportamiento antioxidante protector, se han reportado otras actividades biológicas de ácidos fenólicos. Se sabe que el ácido caféico, uno de los ácidos cinámicos naturales más prominentes, bloquea selectivamente la biosíntesis de leucotrienos, componentes implicados en enfermedades de inmunorregulación, asma y reacciones alérgicas (Koshihara y col. 1984). Otros estudios han informado que el ácido caféico y algunos de sus ésteres pueden poseer actividad antitumoral contra la carcinogénesis del colon (Rao y col. 1993, Olthof y col. 2001). Investigaciones recientes de Maggi-Capyeron y col. (2001) han vinculado una serie de ácidos fenólicos (Clifford, 1999a, Rice-Evance y Packer, 1998, Robards y Antolovich, 1997, Haslam, 1935, Wu y col. 2000) con la inhibición de la actividad transcripcional AP-1. AP-1 es una proteína activadora implicada en los procesos que controlan la inflamación, la diferenciación celular y la proliferación. Se ha demostrado que los derivados del ácido caféico (por ejemplo, ácidos dicafeoilquínico y dicafeolitátrico) son inhibidores potentes y selectivos de la integrasa del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Esta enzima

cataliza la integración del ADN viral en la cromatina del huésped. Por lo tanto, estos derivados de hidroxicinamato se están investigando actualmente para su potencial terapia antiviral (King y col. 1999).

2.6 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

La fermentación en estado sólido de forma general, se puede definir como el crecimiento de microorganismos en un material sólido con ausencia (o cerca de la ausencia) de agua libre (Pandey y col. 2008). El material sólido, sirve como soporte y fuente de nutrientes (Rodríguez y col. 2006; Höltter y col. 2005) además de poseer cierto grado de humedad para soportar el crecimiento y metabolismo del microorganismo (Pandey, 2002; Raghavarao y Ranganathan, 2003).

Algunos de los procesos más importantes en la fermentación sólida son el compostaje, ensilaje, producción de enzimas, sabores, ácidos orgánicos, producción de alimentos, combustibles, producción de metabolitos secundarios, producción de hongos comestibles, producción de alimentos para animales, la degradación de tintas de la industria papelera entre otros (Robinson y col. 2003; Rodríguez y col. 2006; Carabajal y col. 2012). La fermentación sólida tiene unas ventajas, dentro de la que se destacan la alta productividad volumétrica, menor generación de efluentes y residuos, aprovechamiento de numerosos desperdicios agroindustriales, menores costos de energía en los procesos (Pandey y col. 2008; Rodríguez y col. 2006; Robinson y col. 2003).

2.6.1 ASPECTOS IMPORTANTES DE LA FERMENTACIÓN SÓLIDA

Hay varios factores importantes para el buen desarrollo de la fermentación sólida. Incluye la selección de microorganismos y sustrato, el control de los parámetros que influyen en el proceso y también la purificación del producto final. Los hongos y las levaduras se han denominado microorganismos adecuados para la fermentación sólida de acuerdo con el concepto teórico de la actividad del agua, donde las bacterias se han considerado inadecuadas. Sin embargo, la disponibilidad de varios artículos de investigación (Gupta y col. 2008; Mukherjee y col. 2008; Chinn y col. 2007) demuestra que los cultivos bacterianos también

pueden manipularse y manejarse bien para el proceso de fermentación sólida incluso para la enzima tanasa recientemente producida (Sabu y col. 2006).

El establecimiento de relaciones entre la fisiología de los microorganismos y los factores físico-químicos es el objetivo para el desarrollo de modelos adecuados. Estos factores incluyen temperatura, pH, aireación, actividad del agua y humedad, propiedades del reactor, naturaleza del sustrato sólido empleado, etc. Entre varios factores críticos, la humedad y la naturaleza del sustrato sólido empleado son el factor más importante que afecta los procesos de fermentación sólida. La selección de humedad depende del microorganismo empleado y también de la naturaleza del sustrato. Los hongos necesitan humedad más baja, 40-60 % de humedad podría ser suficiente, pero la selección del sustrato depende de varios factores relacionados principalmente con el costo y la disponibilidad y, por lo tanto, puede implicar la selección de varios residuos agroindustriales (Singhania y col. 2009).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Centro de Innovación y Desarrollo Tecnológico perteneciente a la empresa GreenCorp Biorganix de México, Así como en los laboratorios del Departamento de Investigación en Alimentos (DIA), de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, ubicados todos en la Ciudad de Saltillo, Coahuila, México.

3.1 REACTIVOS

Cloruro de potasio (KCl), Sulfato de magnesio ($MgSO_4$), Ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido gálico (Sigma-Aldrich®), Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®), carbonato sódico 0,01 M, catequina (Sigma-Aldrich®), Reactivo Férrico, HCl/Butanol (1:9), Agua destilada, agar papa y dextrosa (APD), 5 % hipoclorito de sodio, etanol-agua 50 %, etanol, dextrosa y fenol 5 %.

3.2. OBTENCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO

Se utilizó la cepa de *Aspergillus niger* proporcionada por el Centro de Investigación de Microbiología Aplicada (CEMAP) perteneciente de la empresa GreenCorp Biorganix de México. Se evaluaron las características morfológicas macroscópicas y microscópicas del hongo para confirmar su pureza. Para la evaluación de características macroscópicas: En un matraz Erlenmeyer se preparó agar papa dextrosa (APD), se calentó hasta ebullición durante 1 minuto y se esterilizó a 121 °C (15 psi) durante 15 min, en condiciones asépticas, se vació el medio de cultivo en cajas petri estériles y se almacenaron a 4 °C. La cepa de *Aspergillus* se sembró en APD, se incubó en una incubadora marca Scorpion científico, modelo A-50985 a 28 °C durante tres días y se hizo la respectiva evaluación como se muestra en la figura 7. Para la evaluación de características microscópicas, se colocó una porción de muestra de la cepa del hongo y una gota de reactivo de azul de metileno entre porta y cubreobjetos, se observó en un microscopio marca Zeiss modelo Primo Star marca con los objetivos 10 x y 40 x. En unos tubos con tapa de 1 cm se prepararon con APD en el cual se sembró la cepa de *Aspergillus niger*, se incubaron a una temperatura de 28 °C durante 3 días, posteriormente se conservaron en refrigeración a una temperatura de -4°C.



Figura 7. Conservación del microorganismo en tubos inclinados con agar papa dextrosa (APD).

3.3. OBTENCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL SOPORTE DE CÁSCARA DE NARANJA

Las frutas de naranjas variedad valencia (*Citrus sinensis*) se obtuvieron en la central de abastos de la ciudad de Saltillo, Coahuila, México. Las frutas se lavaron con 5 % de hipoclorito de sodio, se pelaron, se retiró la cascara, se cortaron en cuadros pequeños y se deshidrataron en una estufa marca Luzeren[®] de secado a 60 °C por un tiempo de 48 horas, luego se procedió a pulverizar en una licuadora doméstica, marca Oster, modelo M6798-13 y se pasó a través de un tamiz No. 40 (420 μ m) para obtener el polvo de cáscara de naranja. Posteriormente se almacenaron en frascos de vidrios de, se esterilizaron a 121 °C (15 psi) durante 15 min y se guardaron en frascos de vidrio para los experimentos posteriores como se muestra en la figura 8.



Figura 8. Acondicionamiento y conservación de la cascara de naranja.

3.4. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL DE LA CEPA *Aspergillus niger* UTILIZANDO CÁSCARA DE NARANJA

Se preparó el medio de cultivo APD previamente esterilizado, se vació en 3 cajas Petri con 15 g de soporte cascara de naranja, se esperó a que se solidificara y se sembró la cepa de *Aspergillus niger*, se incubó en una incubadora marca Scorpion científico, modelo A-50985 en una incubadora marca Scorpion científico, modelo A-50985 a 50 °C, y se evaluó el crecimiento radial ancho y largo con ayuda de una regla geométrica a 24, 48, 72 y 94 h, como se muestra en la figura 9.



Figura 9. Evaluación del crecimiento radial de la cepa de *Aspergillus niger* en cascara de naranja.

3.5. PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Las cepas conservadas en tubos con agar APD se activaron en cajas Petri con medio APD (30 ml) a 28 °C durante cinco días. Las nuevas esporas se recogieron usando una solución estéril de agua destilada y se contaron en una cámara Neubauer utilizando un microscopio marca Scorpio Scientific con objetivo a 40 x, como se muestra en la figura 10.



Figura 10. Preparación del inóculo y conteo en cámara de Neubauer.

3.6. EVALUACIÓN DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN

Se evaluaron las condiciones de fermentación de acuerdo como se muestran en la cuadro 5. Se utilizó un diseño exploratorio Box Hunter y Hunter, en el cual se evaluaron 3 factores independientes: inóculo (esporas/g), KCl (g/l) y MgSO₄ (g/l) a

dos niveles uno mínimo (-1) y máximo (+1) con un total de 8 tratamientos por triplicado. Todos los experimentos se manejaron a una temperatura de 28 °C.

Cuadro 5. Matriz condensada de tratamientos a través de un diseño exploratorio Box Hunter & Hunter.

Tratamientos	Inoculo (esp/g)	KCl (g/l)	MgSO₄ (g/l)
1	1 x 10 ⁶	0.76	0.76
2	1 x 10 ⁶	0.76	1.56
3	1 x 10 ⁸	0.76	1.56
4	1 x 10 ⁸	0.76	0.76
5	1 x 10 ⁶	1.56	1.56
6	1 x 10 ⁶	1.56	0.76
7	1 x 10 ⁸	1.56	0.76
8	1 x 10 ⁸	1.56	1.56

Niveles			
Factores	+1	-1	
Inoculo (esp/g)	1 x 10 ⁸	1 x 10 ⁶	
KCl (g/l)	1.56	0.76	
MgSO ₄ (g/l)	1.56	0.76	

Se inocularon 1 ml de concentración de esporas 1 x 10⁸ y 1 x 10⁶ en condiciones asépticas a 9 g de cascara de naranja y 3 ml de medio comprendido como se muestra en el cuadro anterior, estos dos últimos esterilizados previamente a 120 °C (15 psi) durante 15 min, se homogenizó con un asa aséptica, posteriormente se incubó en una incubadora marca Scorpion científico, modelo A-50985 a 28 °C durante 12 días, como se muestra en la figura 11.



Figura 11. Esquema del proceso de fermentación sólida.

3.7. RECUPERACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS OBTENIDOS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación se adicionaron 10 ml de etanol-agua al 50 % a cada reactor. Adicionado el solvente, se mezcló y se obtuvieron los extractos de fermentación de forma manual con la ayuda del embolo de la jeringa haciendo presión, se pasará a través de un papel filtro para eliminar residuos sólidos que no son de interés como se muestra en la figura 12. Todos los extractos se almacenaron en tubos Eppendorf® con capacidad de 1.5 ml en condiciones de refrigeración.



Figura 12. Recuperación de los compuestos bioactivos.

3.8. DETERMINACIÓN DE AZUCARES TOTALES POR MICROPLACA

Los azúcares totales se midieron por el método de Dubois y col. (1956). Se usó dextrosa como estándar, se mezclaron 250 µl de muestra diluida (1:1000) con 250 µl de fenol al 5 %, se agitó en un vortex y se dejó en baño de agua con hielo por 5 min, luego se colocó 1 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado por la pared del tubo, se agitó en un vortex y se llevó a ebullición por 5 minutos, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después de 5 minutos las muestras se midieron en un espectrofotómetro UV/VIS Epoch BioTek a 480 nm (Figura 13). Todas las muestras se realizaron por triplicado.

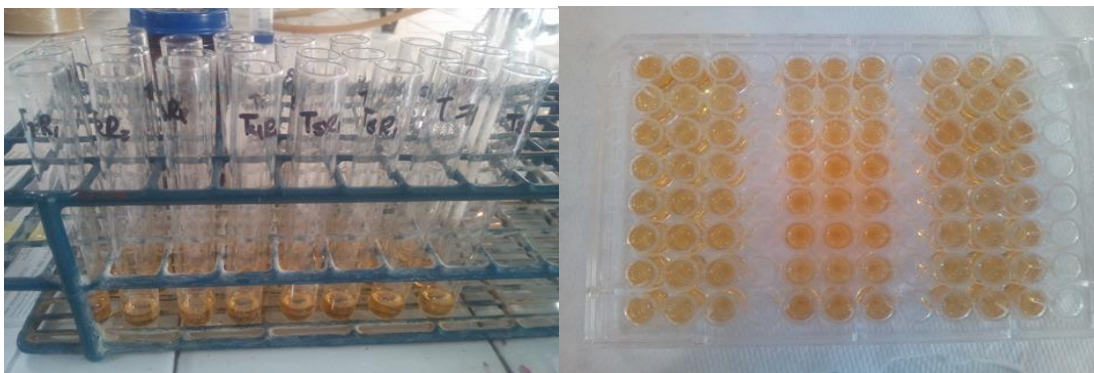


Figura 13. Determinación de azúcares totales por microplaca.

3.9. DETERMINACIÓN DE TANINOS HIDROLIZABLES POR MICROPLACA

Los taninos hidrolizables se midieron por el método de Makkar y col. (1993). Se usó ácido gálico (Sigma-Aldrich®) como estándar 0-1000 ppm, se mezclaron 800 µL de muestra con 800 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®), cinco minutos después, se agregaron 800 µL de carbonato de sodio al 0.01 M, finalmente, la solución se diluyó con 5ml de agua destilada. Después de 1 minuto, las muestras se midieron en un espectrofotómetro UV/VIS EPOCH BioTek a 790 nm. Todas las muestras se realizaron por triplicado, como se muestra en la figura 14.

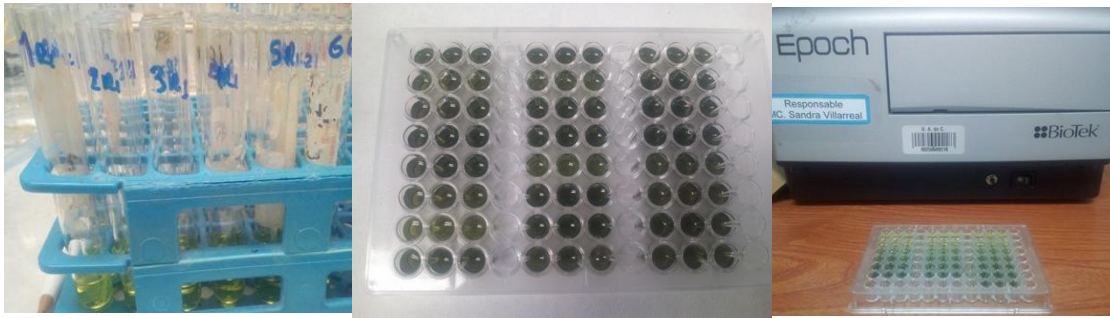


Figura 14. Determinación de taninos hidrolizables por microplaca.

3.10. DETERMINACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS POR MICROPLACA.

Los taninos condensados se midieron por el método reportado por Ventura y col. (2014). Se usó catequina como estándar 0-750 (ppm), en tubos de ensaye (16 x 150) se colocaron 0.5 mL de la muestra o el estándar, sobre este, se agregaron 3 mL de HCl/Butanol (1:9) y 0.1 mL de reactivo férrico. Los tubos se taparon, dentro de los tapones se colocaron empaques, para evitar la evaporación del butanol. Todos los tubos fueron calentados por 1 hora en un baño metabólico a 100 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se dejaron enfriar y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro espectrofotómetro UV/VIS Epoch BioTek a 460 nm. Todas las muestras se realizaron por triplicado, como se muestra en la figura 15.

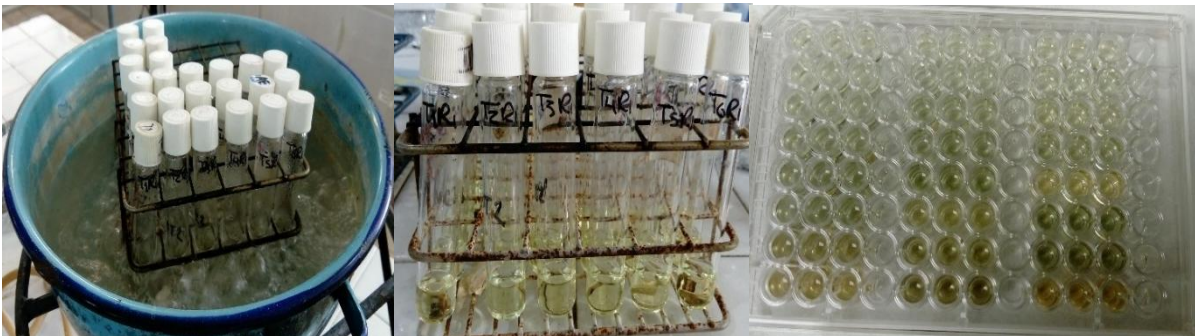


Figura 15. Determinación de taninos condensados por microplaca.

3.11. ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN DE FASE INVERSA IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY ESPECTROMETRÍA DE MASAS (RP-HPLC-ESI-MS)

El análisis de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa fue realizado en un sistema de HPLC Varian incluyendo un automuestreador, (VarianProStar 410, USA), una bomba ternaria (VarianProStar 230I, USA) y un detector de PDA (VarianProStar 330, USA). Acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones de cromatografía líquida (Varian 500-MS IT MassSpectrometer, USA) equipado con una fuente de ionización por electrospray. 5 ml de la muestra fueron inyectados en una columna ACE® Super C18 (150 mm x 2.1 mm, 3µm, Grace, USA). La temperatura fue mantenida a 30 °C, como se muestra en la figura 16. Los eluentes utilizados fueron ácido fórmico (0.2 %, v/v; solvente A) y acetonitrilo (solvente B). Se aplicó el siguiente gradiente: inicial, 3 % B; 0–5 min, 9 % B lineales; 5–15 min, 16 % B lineales; 15–45 min, 50% B lineal. La columna posteriormente fue lavada y reacondicionada. La tasa de flujo fue mantenida a 0.2 ml/min y la elusión fue monitoreada a 245, 280, 320 y 550 nm. El efluente completo fue inyectado en la fuente del espectrómetro de masas sin ser dividido. Todos los experimentos de MS se llevaron a cabo en modo negativo [M-H]⁻¹. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador y helio como gas amortiguador. Los parámetros de la fuente de iones fueron: voltaje de pulverización 5,0 kV y voltaje capilar y temperatura fueron 90,0 V y 350 °C, respectivamente. Los resultados fueron recolectados y procesados usando MS Workstation software (V 6.9). La muestra fue analizada primero en modo de exploración completa adquirida en el rango m/z 50-2000.



Figura 16. Equipo de HPLC y muestras de cascara de naranja obtenidos por fermentación sólida.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO.

Para la evaluación de características microscópicas, se colocó una porción de muestra de la cepa del hongo y una gota de reactivo de azul de metileno entre porta y cubreobjetos luego se observó en un microscopio con los objetivos 10x y 40x. En el cual se observaron conidióforos lisos, hialinos, vesículas esféricas, cabezuelas conodiales radiadas, biseradas. Las metulas son de mayor tamaño que las fialades. Como se muestra en la figura 17.

En comparación con otros autores se demostró que es una cepa de *Aspergillus niger* de acuerdo con la descripción de características microscópicas: conidióforos lisos de pared gruesa, hialinos o pigmentados. Vesículas subsféricas de 50 a 100 μm de diámetro, ligeramente pigmentadas de amarillo o café claro. Cabezuelas radiadas, biseriadas. Las metulas son del doble del tamaño que las fialides. Conidias cafés, ornamentadas con verrugas y crestas, esféricas de 3.5 - 5 μm de diámetro (Arenas, 2011. Bonifaz, 2012. Larone, 2011) como se muestra en la figura 18.

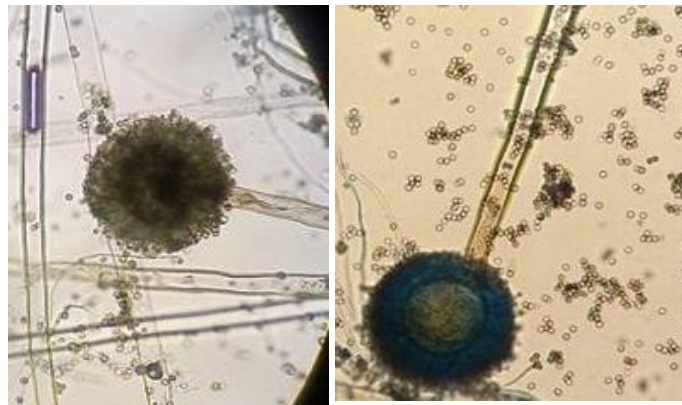


Figura 17. Características microscópicas observadas a partir de cultivo de *Aspergillus niger* con Azul de metileno, observado en un microscopio con objetivo de 40 x.



Figura 18. Cabezas aspergilares de *A. niger* (Tangarife, 2011).

En este estudio las características macroscópicas se realizó a simple vista, observando color y forma de crecimiento de los micelios, al principio se observaron colonias de inicio blanco algodonosa, luego toma un color amarillo verdoso claro que con el tiempo se cubre de cabezuelas de color negro. El reverso es color blanco amarillento como se muestra en la figura 19. En comparación con otros autores la cepa de *Aspergillus niger* es muy similar ya que presenta colonias de crecimiento rápido, maduran en 3 días, son de color blanco-amarillento y con abundantes puntos negros. El reverso suele ser incoloro, blanco o crema (Larone, 2011. Arenas, 2011).

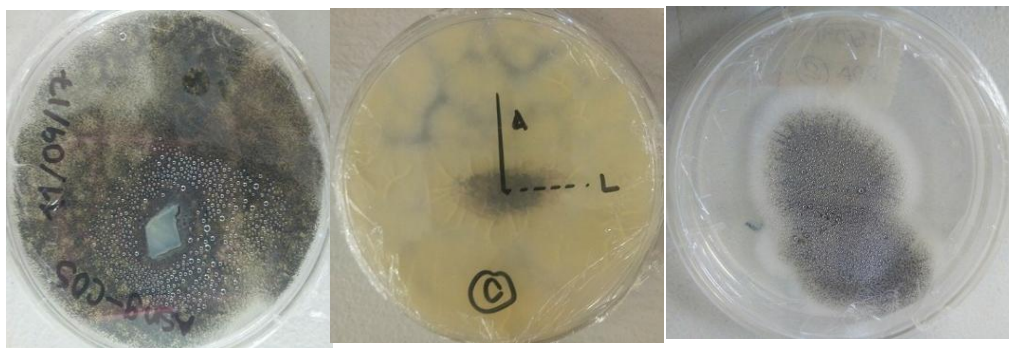


Figura 19. Crecimiento radial de *Aspergillus niger* en APD.

4.2 CONTENIDO DE AZUCARES TOTALES

El contenido de azúcares totales se determinó aplicando el método Dubois (1956) utilizando dextrosa como estándar. En la figura 20 se observa la curva patrón construida para cuantificar los azúcares totales.

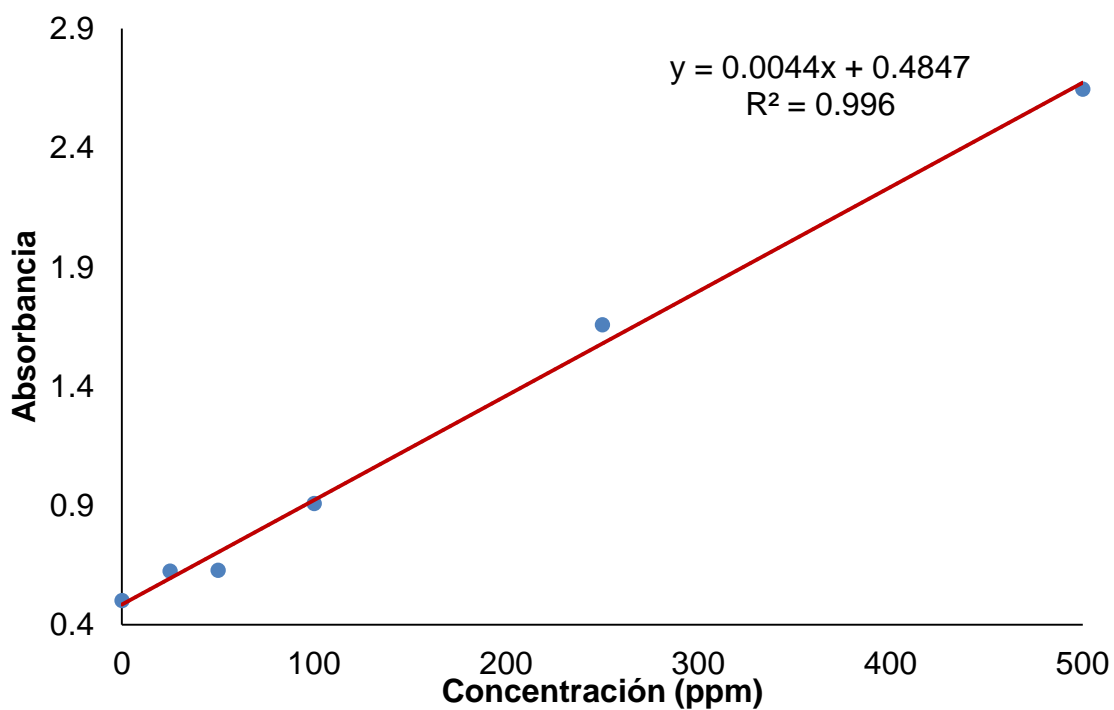


Figura 20. Curva estándar de dextrosa para cuantificar los azúcares totales.

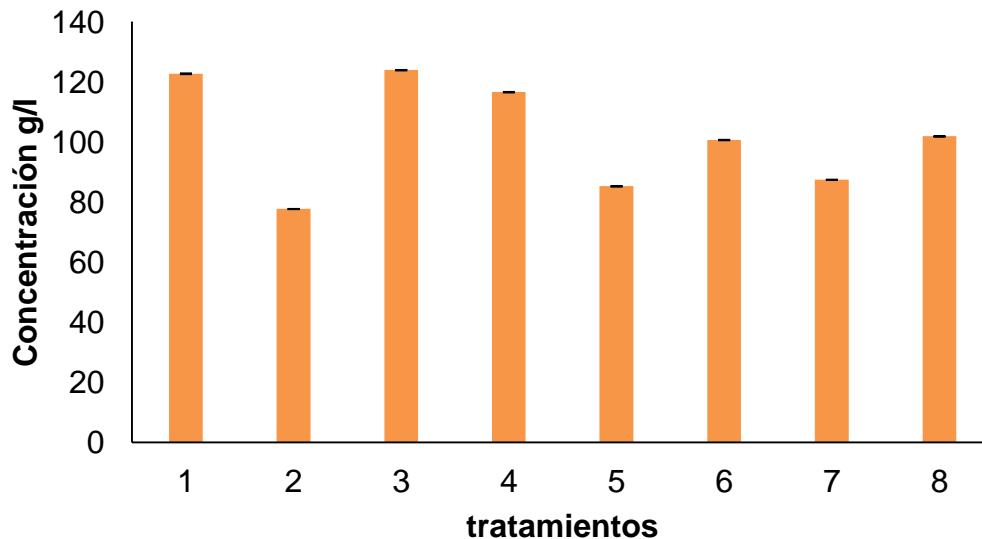


Figura 21. Concentración de azúcares totales en cada tratamiento.

La figura 21 muestra el contenido de azúcares totales de los tratamientos obtenidos a partir del extracto de la cáscara de naranja obtenido de la fermentación sólida. El tratamiento 3, 1 y 4 presentan una concentración de 123.88, 122.69 y 116.55 g/L respectivamente. En contraste el tratamiento 2 presentó la menor concentración de 77.69 g/L. Existen pocos trabajos sobre pruebas de análisis de azúcares totales en extracto de cáscara de naranja obtenido por fermentación sólida, pero hay reportes similares. Harvey y Rygg, (1936) reportó que el contenido de azúcares totales presentes en la cáscara de naranja varía entre 29 y 44 %. López-Hernández (2014) reportó 0.032 g equivalentes de glucosa/g en cascara de naranja (*citrus sinensis*) aplicando el método de Dubois et al., (1956), homogenizando la muestra con etanol al 80% (v/v) y en refrigeración durante 24h. Además, Rodríguez (2016) reportó 491.4 ± 32 mg az/g m.s. en cáscara de naranja (*citrus sinensis*) aplicando un tratamiento de hidrólisis (tratamiento hidrotérmico a 120 °C). Por otra parte Trejo y col. (2016) reportaron 8.1 g/L en cascara de naranja (*Citrus sinensis*) aplicando un tratamiento de hidrólisis acida de H₂SO₄ concentración 0.3 N a una temperatura de 30 °C y 150 rpm. La glucosa, la fructosa y la sacarosa son los principales azúcares, aunque la xilosa también se puede encontrar en pequeñas cantidades en la cáscara de naranja.

4.3. CUANTIFICACIÓN DE TANINOS HIDROLIZABLES

En la figura 22 se presenta la curva estándar de ácido gálico el cual se utilizó para la cuantificación de compuestos fenólicos hidrolizables, presentes en los extractos de cada tratamiento. En la figura 23 se presenta la cantidad de taninos hidrolizables de los tratamientos obtenidos de la matriz experimental.

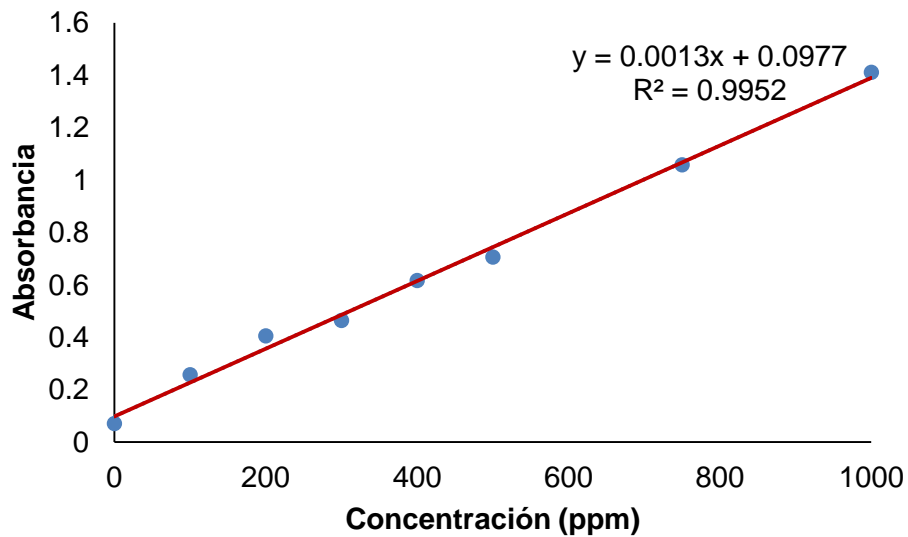


Figura 22. Curva estándar para cuantificar los taninos hidrolizables.

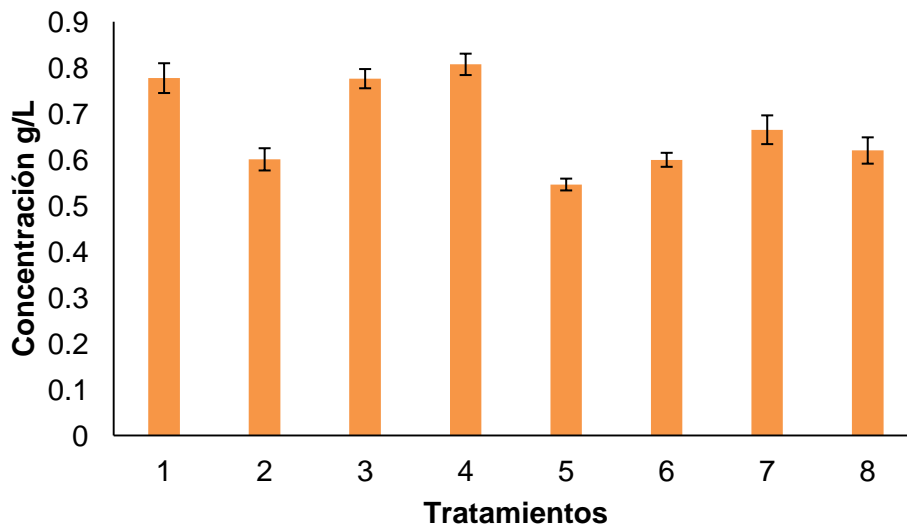


Figura 23. Concentración de taninos hidrolizables en cada tratamiento.

Se observa que en los tratamientos 4, 1 y 3 se obtuvieron una concentración de 0.80, 0.77 y 0.77 g/L respectivamente. En contraste el tratamiento 5 presentó la concentración más baja de 0.54 g/L. Existen pocos trabajos sobre pruebas de análisis de taninos hidrolizables en extracto de cáscara de naranja obtenido por fermentación sólida, pero hay reportes similares. En otro trabajo, por ejemplo, Wang y col. (2008) reportaron 35.5 mgGAE/gbs en la cáscara de naranja valencia utilizando metanol como disolvente, estos resultados varían debido a que se utilizaron distintos métodos de extracción.

Los estudios de Xu y col. 2007 reportaron un contenido fenólico de 47 mg GAE/g bs en cáscaras de toronja utilizando metanol al 80 %, una temperatura de 120 °C durante 90 min. Por otra parte, Li y col. (2006b) realizaron una extracción con etanol al 72 % y reportaron en la cáscara de toronja un contenido fenólico de 8.08 mgGAE/gbs.

4.4. CUANTIFICACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS

La Figura 24 muestra la curva de calibración estándar utilizando catequina como patrón para determinar el contenido de taninos condensados.

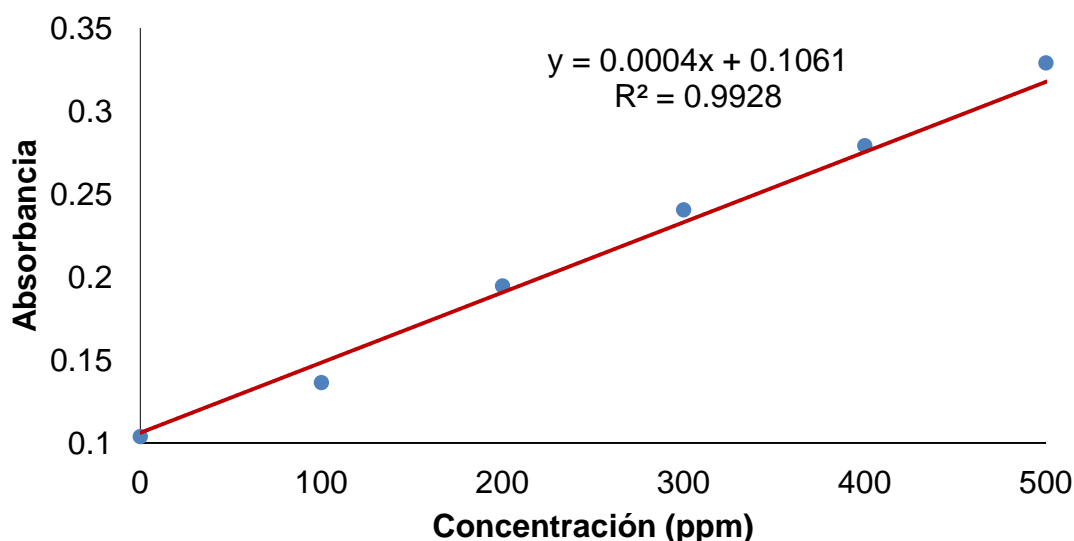


Figura 24. Curva estándar para la determinación de taninos condensados.

La figura 25 muestra el contenido de taninos condensados obtenidos en el proceso de fermentación. Los tratamientos 4 y 7 se obtuvieron las concentraciones más elevadas de de 127.52 y 124.75 g/L respectivamente. En contraste, los tratamientos 2 y 3 presentaron la concentración más baja de 90.86 y 95.02 g/L respectivamente. No se ha reportado el contenido de taninos condensados en cáscara de naranja, pero hay trabajos similares realizados. La USDA en 2004 y Prior y Gu en 2005 reportaron que las frutas con mayor contenido de taninos condensados fueron las bayas salvajes del bosque con 2.55 ± 0.0839 mg/g de producto, seguidas de los arándanos con 2.33 ± 0.49 mg/g de producto En el grupo de cereales y leguminosas, el sorgo con 29.27 ± 3.3538 mg/g de producto y el cacao con 15.6849 ± 3.34 mg/g de producto fueron los alimentos con mayor concentración de taninos, mientras que el grupo de las nueces lo encabezan las avellanas con 3.2244 ± 1.0248 mg/g de producto y las nueces pecaneras con 2.2301 ± 0.5901 mg/g de producto. Por último, en las especias, la que mayor contenido de taninos condensados fue la canela con 25.087 mg/g de producto. También han revelado que la presencia de proantocianidinas (taninos condensados) variaba según la parte del fruto que se analizaba, siendo habitualmente más abundante en la piel de frutas como ejemplo: la manzana con cascara presentó mayor contenido de taninos con 1.30 mg/g que aquellas sin cáscara con 1 mg/g (Prior y Gu, 2005).

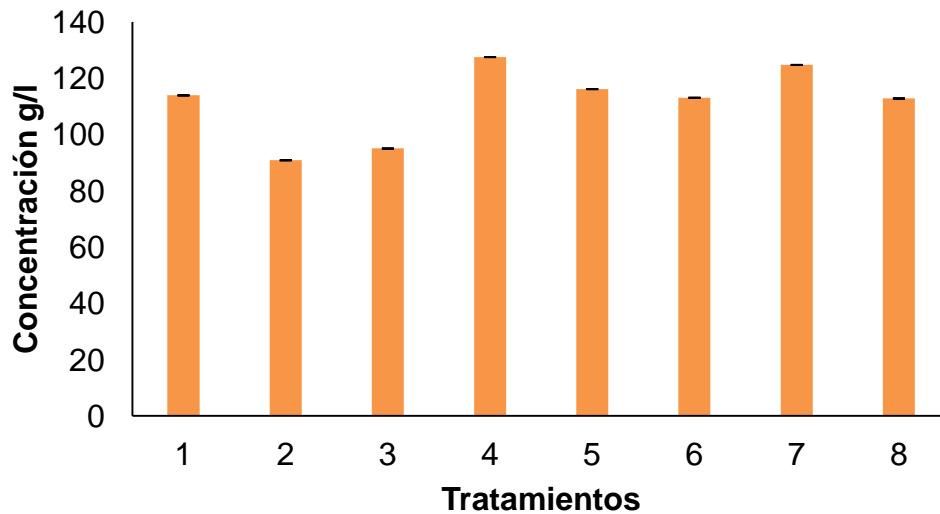


Figura 25. Concentración de taninos condensados en cada tratamiento.

La naturaleza química de los taninos condensados ha permitido un mayor monitoreo de su presencia en alimentos, puesto que para su determinación todos pueden ser degradados a antocianidinas (flavonoides) de fácil identificación por técnicas cromatográficas.

4.5. EFECTO DE LOS FACTORES INDEPENDIENTES SOBRE LA LIBERACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS.

En la Figura 26. Se muestra la cantidad de taninos condensados obtenidos a partir del proceso de fermentación en estado sólido. Se muestra que en el tratamiento 4 se obtuvo la mayor cantidad de taninos condensados 198.37 mg/g sin diferencia estadística con el tratamiento 7 194.05 mg/g.

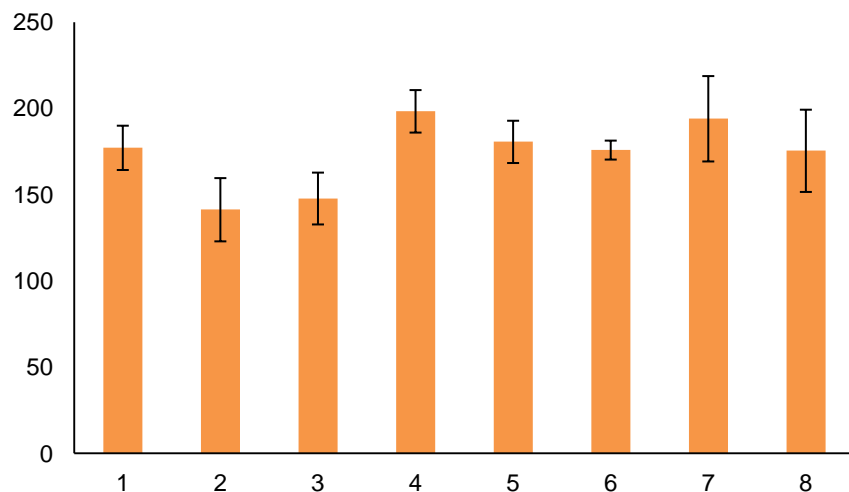


Figura 26. Cantidad de taninos condensados a partir de la fermentación en estado sólido.

En la figura 27 se muestra el efecto estimado estandarizado de los factores independientes sobre la liberación de taninos condensados. La línea punteada delimita el efecto con valor del 95 % de confianza de acuerdo al valor de $p=0.5$. Se observó que solo el $MgSO_4$ sobrepasó esta línea, lo que significa que afecta de manera directa en el proceso de fermentación para la liberación de taninos condensados. El efecto negativo de este factor indica que al disminuir los valores de los intervalos tienden a mejorar la respuesta. El resto de los factores independientes no afectan de manera directa en el proceso de fermentación lo que indica que para futuros trabajos estos niveles se mantendrán al mínimo para disminuir de manera significativa los costos en el proceso de fermentación.

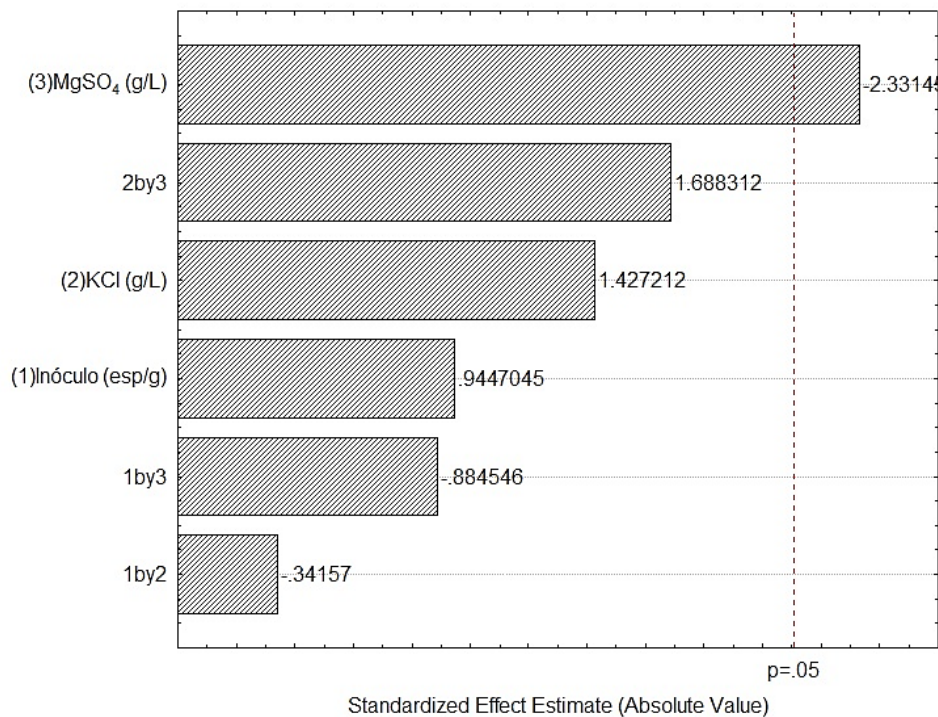


Figura 27. Diagrama de Pareto de los factores evaluados en el diseño experimental.

En la figura 28, se muestra el Diagrama de Contorno del efecto del MgSO₄ y KCl sobre la cantidad de taninos condensados obtenidos. En color verde oscuro se muestran los valores mínimos que se pueden obtener, en contraste el color rojo oscuro se muestran los valores máximos. En el diagrama se muestra una tendencia hacia valores bajos de MgSO₄ y sin diferencia entre los valores de KCl para encontrar una máxima respuesta.

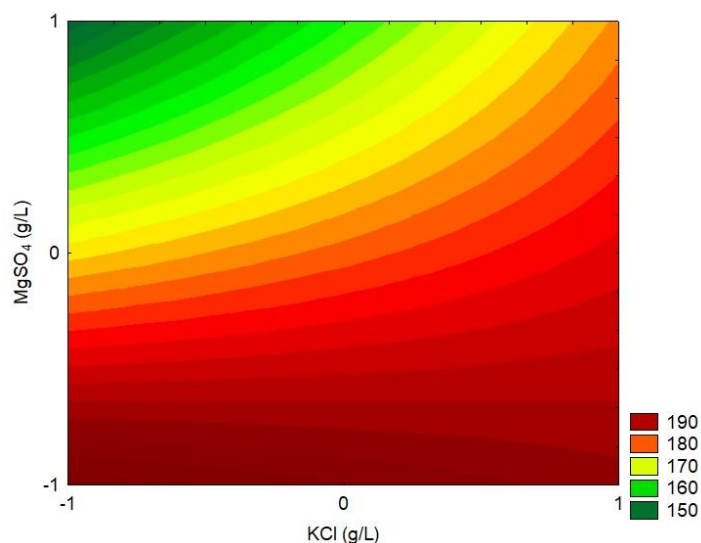


Figura 28. Efecto del MgSO₄ y KCl sobre el efecto de liberación de taninos condensados.

En la figura 29, se muestra el Diagrama de Contorno del efecto del MgSO_4 e inóculo sobre la cantidad de taninos condensados obtenidos. En color verde oscuro se muestran los valores mínimos que se pueden obtener, en contraste el color rojo oscuro se muestran los valores máximos. En el diagrama se muestra una tendencia hacia valores altos de inóculo y valores bajos de MgSO_4 para encontrar una máxima respuesta.

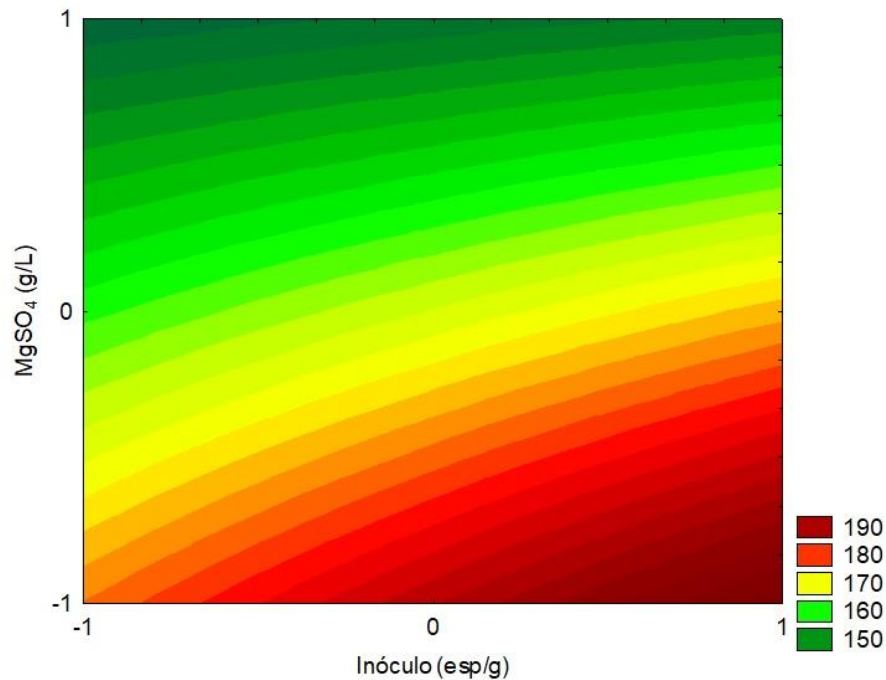


Figura 29. Efecto del MgSO_4 e inóculo sobre el efecto de liberación de taninos condensados.

En la figura 30, se muestra el Diagrama de Contorno del efecto del KCl e inóculo sobre la cantidad de taninos condensados obtenidos. En color verde oscuro se muestran los valores mínimos que se pueden obtener, en contraste el color rojo oscuro se muestran los valores máximos. En el diagrama se muestra una tendencia hacia valores bajos de KCl y valores altos de inóculo para encontrar una máxima respuesta.

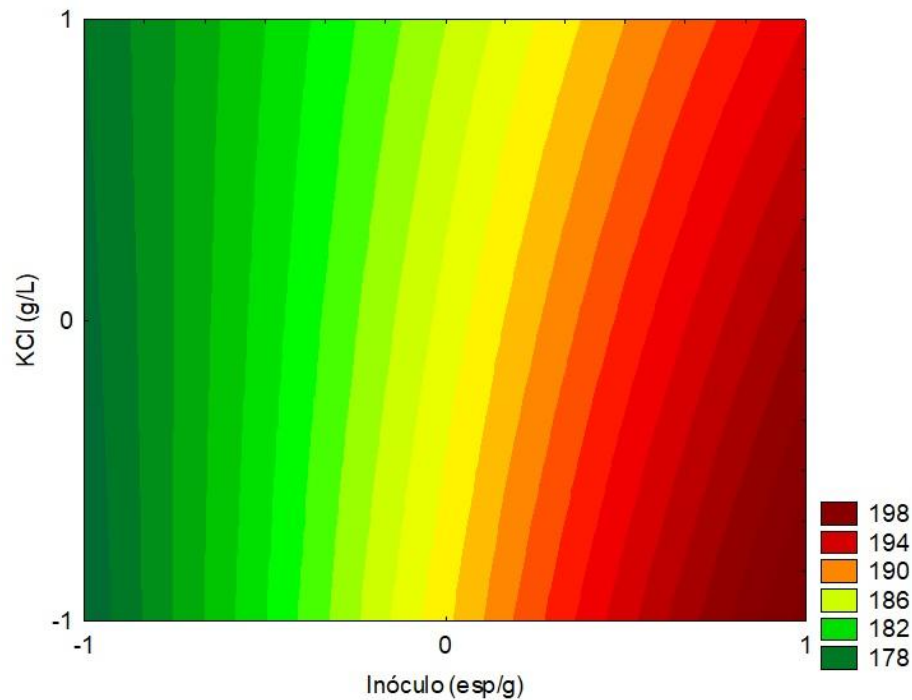


Figura 30. Efecto del KCl e inóculo sobre el efecto de liberación de taninos condensados.

4.6 IDENTIFICACIÓN POR CLAR DE COMPUESTOS DE LA CASCARA DE NARANJA POR EXTRACCIÓN ASISTIDA POR FERMENTACIÓN SOLIDA

De acuerdo con los resultados que se muestran en el cuadro 6 obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución, se observó que en todos los tratamientos presentaron en común los siguientes compuestos: escopoletina, ácido ferúlico, ácido glicólico *p*-cumaroil, (-) –epicatequina, cirsimaritina, ácido 5-*O*-galoilquínico, ácido ferúlico 4-*O*-glucósido, ácido 3-feruloilquínico, ácido 5-5-Dihydrodiferúlico, luteolin 7-*O*-(2-*apiosil*-glucósido), apigenina 6,8-di-*C*-glucósido, quercetina 3-*O*-xylosil-glucurónido, Isoramnetina 3-*O*-glucósido7-*O*-ramnosido. En los tratamientos dos, seis, siete y ocho se identificó la 1, 2, 2' triferuloilgentiobiosa, en los tratamientos tres y siete (-)-Epicatequina-(2a-7)-(4a-8), epicatequina 3-*O*-galactósido, en los tratamientos dos y tres apigenina arabinósido-glucósido, en el tratamiento tres se identificó vitisina A, en el tratamiento cuatro se encontró

petunidina 3-O-(6''-p-cumaroil-glucósido), y la (-)-epicatequina 3-O-galato se encontró en el tratamiento siete.

Cuadro 6. Compuestos polifenólicos identificados por Cromatografía líquida de alta resolución HPLC

Compuesto	masa	Tiempo de retención (min)	Tratamiento
Escopoletina	190.9	3.233	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Ácido ferúlico	192.9	3.968	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.
p-Cumaroil ácido glicólico	221.9	24.313	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.
(-) –Epicatequina	288.9	37.778	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.
Cirsimaritina	313	15.22	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.
Ácido 5-O-galoilquínico	342.9	40.983	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.
Ácido ferúlico 4-O-glucósido	354.9	30.383	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Feruloil glucosa			
Ácido 3-feruloilquínico	366.9	27.14	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Ácido 5-5' dehidroferúlico	384.9	21.955	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Ácido 5-8' dehidroferúlico			
(-)-Epicatequina 3-O-galato	442.9	38.819	7
Vitisina A	560.9	31.446	3
Apigenina arabinósido-glucósido	563	29.801	2, 3.
Luteolina 7-O-(2-aposil-glucósido)	32.5	579	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Apigenina 6,8-di-C-glucósido	593	25.24	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Delfinidina 3-O-sambubiósido	596	25.56	1
Quercetina 3-O-xilosil-glucurónido	609	33.891	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Isoramnetina 3-O-glucósido7-O-ramnósido	623	26.292	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Petunidina 3-O-(6"-p-cumaroil-glucósido)	624	47.822	4
(-) - Epicatequina- (2a-7) (4a-8) - epicatequina 3-O-galactósido	706.9	33.287	3,7
1,2,2'-triferuloilgentiobiosa	868.8	28.87	2, 6, 7, 8

En comparación con lo reportado a la literatura por Manthey y Grohmann (1996) por medio de extracción por solventes orgánicos, metanol–DMSO (1:1 v/v) en cascara de naranja (*Citrus sinensis*) identificaron los siguientes compuestos: naringina, hesperidina, sinensetina, nobiletina, nobiletina/Tetrametil escutelareina, tangeretina/5-hidroxi-3, 7, 8, 3', 4'-Pentametoxiflavona. Chen y col (2012) con disolventes n-hexano, acetato de etilo y n-butanol identificaron en cáscara de naranja dulce hesperidina, hesperitina, nobiletina y tangeretina. Wang y col. en 2008, realizaron la extracción con metanol a 85 °C durante 12 horas, reportaron en cáscara de naranja los siguientes compuestos flavonones: naringina hesperidina neohesperidina. Flavona: diosmina, luteolina, sinensetina. Flavonol: rutina, quercetina, kaempferol.

En otro estudio por M. Escobar (2010) realizaron una extracción con 80 % de etanol a temperatura 25 °C, de los extractos de cáscaras de toronja y naranja agria se identificaron los siguientes compuestos: naringina, quercetina, y luteolin-7-glucósido. Tenorio Domínguez, 2016 reportaron la obtención de los extractos ricos en flavonoides por el método de soxhlet en cáscaras de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) en cuatro tipo de disolventes orgánicos, éter etílico, acetato de etilo y agua, en el los extractos metanólico, acetatato de etilo y acusoso se identificaron los siguientes compuestos: naringina, hesperidina, neohesperidina, rutina, quercetina, kaempferol, luteolina y en el éter de etílico: rutina, quercetina, kaempferol, luteolina. Estas diferencias se pueden deber a las diferentes características genotípicas y fenotípicas de cada fruta.

5. CONCLUSIÓN

En este trabajo se identificó y se caracterizó la cepa de *Aspergillus niger* para su uso en el proceso de fermentación en estado sólido.

Se obtuvieron los compuestos bioactivos de la cáscara de naranja mediante el empleo de un diseño experimental exploratorio Box Hunter y Hunter en donde se evaluaron 3 variables independientes: inóculo (esporas/g), KCl (g/l) y MgSO₄ (g/l) a dos niveles uno mínimo (-1) y máximo (+1) a una temperatura de 28 °C. Se obtuvo mayor contenido de taninos condensados en todos los tratamientos que taninos hidrolizables. El valor más alto en taninos condensados (127.52 g/l) se obtuvo con el tratamiento cuatro con una cantidad de inóculo de 1×10^8 (esporas/g), 0.76 (g/l) de KCl y MgSO₄.

Se identificaron y cuantificaron los principales compuestos bioactivos presentes en la cáscara de naranja *Citrus sinensis* a partir de la extracción asistida por fermentación en estado sólido. Los compuestos mayoritarios detectados por medio de la técnica cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) fueron: Escopoletina, ácido ferúlico, ácido glicólico *p*-cumaroil, (-) -epicatequina, cirsimarina, ácido 5-O-galoilquínico, ácido ferúlico 4-O-glucósido, ácido 3-feruloilquínico, ácido 5-5-Dehidroferúlico, luteolin 7-O-(2-apiosil-glucósido), apigenina 6,8-di-C-glucósido, quercetina 3-O-xylosil-glucurónido, Isoramnetina 3-O-glucósido 7-O-ramnosido. La utilización de cáscara de naranja representa una alternativa biotecnológica para la producción de biocompuestos, que son considerados como antioxidantes naturales o como aditivos alimentarios y poseen diversas propiedades benéficas para la salud del ser humano, tales como actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas, protección contra enfermedades del corazón.

Empleando la extracción asistida por fermentación sólida se obtienen una variedad de compuestos que aún no están escritos en la literatura y algunas que no se encontraron en este trabajo esto debido a los diferentes métodos de extracción utilizados. Los efectos de la variedad y del medio ambiente en la producción de

metabolitos secundarios en los cítricos y el contenido de flavonoides en las frutas depende principalmente de las características genéticas (Cano y Arnao 2004) También dependiendo del estado de madurez del fruto, en función del origen geográfico, entre otros factores.

6. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

Es necesario hacer más estudios sobre la identificación de todos los compuestos encontrados en la cáscara de naranja.

Estudiar sobre la composición, propiedades y obtención de compuestos de la cáscara de naranja que permitan su amplia utilización en la industria alimentaria y/o farmacéutica.

Estudiar el efecto del estado de madurez de la naranja (frutos maduros e inmaduros), en la identificación de otros compuestos.

Utilizar un sistema de fermentación en estado líquido para la obtención de compuestos polifenólicos.

Evaluar otras cepas fúngicas que tengan la capacidad de utilizar compuestos polifenólicos como fuente de carbono y energía.

Elucidar, evaluar y purificar las enzimas involucradas en la liberación de flavonoides.

Realizar un estudio técnico-económico de todo el bioproceso de liberación de flavonoides para uso en la industria alimentaria.

7. REFERENCIAS

- Aguilar-López J., Jaén-Jiménez J., Vargas-Abarca A.S., Jiménez-Bonilla P., Vega-Guzmán I., Herrera-Núñez J., Borbón-Alpizar, H., Soto-Fallas R. 2012. Extraction and evaluation of condensed tannins from bark of eleven species of trees from Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*. 25(4): 15-22.
- Aguilar, C.N. Inducción y represión de la síntesis de la tanasa de *Aspergillus niger* Aa20 en cultivos en medios líquido y sólido. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F. (2000).
- Anagnostopoulou, M.A., Kefalas, P., Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N., Boskou, D. 2006. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chem*. 94(1): 19–25.
- Andreasen M.F., Kroon P.A.; Williamson G., Garcia-Conesa M.T. 2001. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radic. Biol. Med*. 31: 304-314.
- Andreasen M.F., Christensen L.P., Meyer A.S., Hansen A. 2000. Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in (*Secale cereale* L.) varieties. *J. Agric. Food Chem*. 48: 2837-2842.
- Aoki K, Shinke R & Nishira H (1976) Purification and some properties of the yeast tannase. *Agric. Biol. Chem*. 40: 79-85.
- Aoki T., Akashi T., Ayabe S.I. 2000. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *J. Plant Res*. 113:475-488.
- Arenas R. 2011. *Micología médica ilustrada*. Capítulo 23 Aspergilosis. Cuarta Edición McGrawHill: México, DF. pág. 269 – 279.
- Azuma K., Ippoushi K., Nakayam M., Ito H., Higashio H., Terao J. 2000. Adsorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J. Agric. Food Chem*. 48:5496- 5500.
- Bajpai B., Patil S. 1996. Tannin acyl hydrolase activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*. *W. J. Microbiol. Biotechnol*. 12: 217–220.
- Barthomeuf C., Regeat F., Pourrat H. 1994. Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. *J. Ferment Technol*. 77: 320–323.
- Barrios-González J., Fernández F.J., Tomasini A., Mejía A. 2005. Secondary metabolites production by solid-state fermentation. *Malays J Microbiol*. 1(1):1–6.

- Bate-Smith E.C. 1975. Phytochemistry of proanthocyanidins. *Phytochemistry*, 14: 1107- 1113.
- Beverini M., Metche M. 1990. Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*. *Sci. des Aliments*. 10: 807–816.
- Bhat T.K., Singh B. Sharma O.P. 1998. Microbial degradation of tannins-A current perspective. *Biodegradation*. 9(5): 343-357.
- Bhat T.K., Makkar H.P.P., Singh B. 1997. Preliminary studies on tannin degradation by *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. *Lett. Appl. Microbiol*. 25: 22-23.
- Bindon K.A., Kennedy J. 2011. Ripening-induced changes in grape skin proanthocyanidins modify their interaction with cell walls. *J. Agric. Food Chem*. 6:2696-707.
- Block G., Patterson B., Subar A. 1992. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*. 18:1-29.
- Bonifaz A. 2012. *Micología Médica Básica*. Capítulo 5: Hongos contaminantes. Capítulo 27 Aspergilosis. 4 Edición, McGrawHill: México. Pp 67-600.
- Bors W., Heller W., Michel C., Stettmaier K. 1996. Flavanoids and polyphenols: chemistry and biology. In *handbook of antioxidants*. Packer, L., Cadenas, E., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, USA. Pp. 409-466.
- Bourne L.C., Rice-Evans C. 1998. Bioavailability of ferulic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 253:222-227.
- Bradoo S., Gupta R., Saxena R.K. 1996. Screening of extracellular tannase-producing fungi: development of a rapid and simple plate assay. *J. Gen. Appl. Microb*. 42: 325–330.
- Brenes-Balbuena, M., García-García, P., Garrido-Fernández A. 1992. Phenolic compounds related to the black color formed during the processing of ripe olives. *J. Agric. Food Chem*. 40: 1192-1196.
- Brett C., Waldron K. 1996a. Cell wall architecture and the skeletal role of the cell wall. In *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. Great Britain. Pp. 44-74.
- Brett C., Waldron K. 1996b. The molecular components of the wall. In *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*; Brett, C., Waldron, K., Eds.; Chapman and Hall: Great Britain. Chapter 2. Pp 4-43.

Cancalon P.F. 1994. Changes in the saccharide composition of citrus juice and anatomical fractions during fruit maturation. Proc. Fla. State Hort. Soc. 107: 253-256.

Cano, A., Arnao, M.B. 2004. Actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica y contenido en vitamina C en zumos de naranja comerciales: relación con sus características organolépticas. Ciencia y Tecnología Alimentaria, Vol. 4, No. 3, 185-189.

Cano E., Cano T., Quezada O., Quiñonez B., Saravia J. 2002. Extracción y caracterización de taninos en corteza de tres especies forestales cultivadas en Guatemala, Pino ocote (*Pinus oocarpa* Schiede), Encino negro (*Quercus brachystachys* Benth) y Aliso común (*Alnus jorulensis* HBK). Una alternativa de desarrollo agroindustrial para el uso de taninos naturales. Guatemala: Carolina Academia Coactemalensis inter Caeteras Orbis Conspicua. Pp. 5-6.

Carabajal M., Levin L., Albertó E., Lechner B. 2012. Effect of co-cultivation of two *Pleurotus* species on lignocellulolytic enzyme production and mushroom fructification. Int. Biodeterior. Biodegradation. 66:71-76.

Carulla J., Lascano C. 1994. Presencia de taninos en las especies forrajeras: Implicaciones alimenticias. En: seminario sobre agroforestería, alternativa nutritiva para rumiantes en el trópico. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Bogotá. Pp, 190-204.

Cavia-Saiz, M.; Busto, M.D.; Pilar-Izquierdo, M.C.; Ortega, N.; PérezMateos, M.; Muñiz, P. 2010. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. Sci. Food Agric. 90: 1238-1244.

Chalas J., Claise C., Edeas M., Messaoudi C., Vergnes L., Abella A., Lindenbaum A. 2001. Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. Biomed Pharmacother. 55: 54-60.

Chatterjee R., Dutta A., Banerjee R., Bhattacharyya B.C. 1996. Production of tannase by solid-state fermentation. Bioprocess Eng. 14(3):159162.

Chen Z.T., Chu H.L., Chyau C.C., Chu C.C., Duh P.D. 2012. Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. Food Chem. 135:2119–2127.

Cheynier V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. Am. J. Clin. Nutr. 81: 223s-229s.

Chinn M.S., Nokes S.E., Strobel H.J. 2007. Influence of process conditions on end product formation from *Clostridium thermocellum* 27405 in solid substrate cultivation on paper pulp sludge. *Bioresour. Technol.* 98: 2184–2193.

Choi S.Y., Ko H.C., Ko S.Y., Hwang J.H., Park J.G., Kang S.H., Han S.H., Yun S.H., Kim S.J. 2007. Correlation between flavonoid content and the no production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 772-778.

Chung K.T., Wong T.Y., Wei C.J., Huang Y.W. Lin Y. 1998a. Tannins and Human Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38(6):421-464.

Chung K.T., Wei C., Johnson M. 1998b. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Food Sci Technol.* 9:168- 175.

Clifford M.N. 2000a. Chlorogenic acids and other cinnamates— nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric.* 80:1033–1043.

Clifford M.N., Copeland E.L.; Bloxside J.P., Mitchell L.A. 2000b. Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica*, 30: 317-326.

Clifford, M. N. 1999a. Appendix 1. A Nomenclature for Phenols with Special Reference to Tea. Washington, DC, 11/, CRC Press LLC. Boca Raton, Florida, Vol. 41, Supplement 5, pp 393- 397.

Clifford, M. N. 1999b. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 79: 362-372.

Clifford, M. N. 1992. Sensory and Dietary properties of phenols. *Proceedings Proceedings of the 16th international conference of grape polyphenol.* 16(11):18-23.

Córdova B.,R. 1989. Conservación y curtido de pieles. Facultad de Zootecnia de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Serie manuales para educación continua.

Cortazar E., Bartolomé L., Delgado A., Etxebarria N, Fernández L.A, Usobiaga A., Zuloaga, O. 2005. Optimisation of microwave-assisted extraction for the determination of nonylphenols and phthalate esters in sediment samples and comparison with pressurised solvent extraction. *Anal Chim Acta.* 534(2): 247–254.

Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 26:1001-1043.

Davies F.S., Albrigo L.G. 1994. Citrus. Crop Production Science in Horticulture. CAB International, Gran Bretaña, pp. 52-82, 202-224.

Del Río, J.A., Arcas, M.C., Benavente-García, O., Sabater, F., Ortuño, A., 1998. Changes of polymethoxylated flavones levels during development of *Citrus aurantium* (cv. Sevillano) fruits. *Planta Med.* 64: 575-576.

Deschamps A.M. 1989. Microbial degradation of tannins and related compounds. In: Lewis NG and Paice MG (Eds) *Plant Cell Wall Polymers Biogenesis and Biodegradation* (pp. 559–566). American Chemical Society, Washington, DC

Deschamps A.M., Leulliette, L. 1984. *Int. Biodeterioration.* 20(4): 237-241.

Deschamps A.M., Otuk G., Lebeault J.M. 1983. Production of tannase and degradation of chestnut tannins by bacteria. *J. Ferment Technol.* 61: 55-59.

Deschamps A.M., Mahoudeau G., Conti M. Lebeault, J.M. 1980. Bacteria degrading tannic acid and related compounds. *J. Ferment. Technol.* 58(2): 93-97.

Díaz S., Espinosa S., Brignole E.A. 2005. Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids. Optimal process and solvent cycle design. *J. Supercrit. Fluids* 35: 49-61.

Doi S., Shinmyo A., Enatsu T., Terui G. 1973. Growth associated production of tannase by a strain of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.* 61: 768–774.

Einhellig F.A. 1986. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In *The Science of Allelopathy*. Putnam A.R., Tang, C.S., Eds. John Wiley and Sons: New York, USA. Pp 171- 189.

Ellnain-Wojtaszek M., Kurczynski Z., Kasprzak J. 2001. Analysis of the content of flavonoids, phenolic acids as well as free radicals from *Ginkgo biloba* L. leaves during the vegetative cycle. *Acta Pol. Pharm.* 58: 205-209.

Escárcega C. 2001. Biodegradación de taninos de curtidurías mediante cultivos de *Aspergillus niger*. (Tesis de posgrado). Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México

Escobar-Blanco M. 2010. Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México. (Tesis de posgrado). Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

Escribano- Bailón M.T. 1993. Estudio de composición flavanica de la semilla de uva. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

Fálder, R.A., 2003. Enciclopedia de los alimentos: frutas. I. cítricos. Distribución y Consumo 69, 115-140.

Farias G.M., Elkins J.R., Griffin G.J. 1992. Tannase activity associated with growth of *Cryphonectria parasitica* on American and Chinese chestnut extracts and properties of the enzyme. Eur. J. Forest Pathol. 22: 392–402.

Fernández-Zurbano P., Ferreira V., Escudero A., Cacho J. 1998. Role of hydroxycinnamic acids and flavanols in the oxidation and browning of white wines. J. Agric. Food Chem. 46:4937- 4944.

Fernandez de Simon B., Perz-Ilzarbe J., Hernandez T., Gomez-Cordovés C., Estrella I. 1992. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. J Agric Food Chem. 40:1531–1535.

Field, J.A. and Lettinga, G. (1992). Biodegradation of tannins. In: Metal ions in biological systems. Sigel, H. ed. Volume 28. Marcel Dekker Inc. New York. pp: 61-97.

Fine, A. 2000. Oligomeric proanthocyanidin complexes: History, structure, and phytopharmaceutical applications. Altern.native Med.icine Rev.iew.s 55:144-151.

Galiotou-Panayatou, M., y Macris, B. J. (1986). Degradation of condensed tannins by *Calvatia gigantea* Appl. Microbiol. Biotechnol. 23, 502-506.

Galiotou-Panayatou, M., Rodis,P., Macris, B. J., y Stathakos, D. (1988). Purification of a novel enzyme involved in catechin degradation by *Calvatia gigantea* Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 543-545.

Ganga P.S., Nandy S.C., Santappa M. 1977. Effect of environmental factors on the production of fungal tannase. Leather Sci. 24: 8-16.

García, M.C.,; Cadahía, E., & Conde, E. 1997. Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components, Curitiba, Brasil.

García Ramirez, B. (2005) Absorción in vivo de Oligómeros de Epicatequina, Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona. pp. 251.

Gómez G., Martínez A., Rodríguez H, Aguilar N. 2012. Fuentes y beneficios de los antioxidantes fenólicos. Cienciacierta. 8:31.

Grant W.D. 1976. Microbial Degradation of Condensed Tannins. Science. 193: 1137-1139.

- Gupta S., Kapoor M., Sharma K.K., Nair L.M., Kuhad R.C. 2008. Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. *Bioresour. Technol.* 99:937-945.
- Gutiérrez J.B. 2000. *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos* Ediciones Diaz de Santos. Madrid, España.
- Hadi T.A., Banerjee R., Bhattacharya B.C. 1994. Optimization of tannase biosynthesis by a newly isolated *R. oryzae*. *Bioprocess Engg.* 11: 239–242.
- Hagerman A.E., Butler L.G. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 256: 4494-4497.
- Hartley R.D., Jones E.C. 1976. Carbohydrates and carbohydrate esters of ferulic acid released from cell walls of *Lolium multiflorum* by treatment with cellulolytic enzymes. *Phytochemistry.* 15:305-307.
- Harvey E.M., Rygg G.L.J. 1936. Physiological changes in the rind of California oranges during growth and storage. *J. Agric. Food Chem.* 52:723-46.
- Haslam E. 2007. Vegetable tannins-lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry.* 68: 2713-2721.
- Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59: 205-215.
- Haslam E. 1993. *Shikimic acid: metabolism and metabolites.* John Wiley & Sons: New York. p 331.
- Haslam E., Stangroom J.E. 1966. The esterase and deposite activities of the tannase. *Biochem. J.* 99: 28–31.
- Herrmann K. 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28: 315-347.
- Hölter U., Lenz J. 2005. Solid-state fermentation – Are there any biotechnological advantages. *Curr Opin Microbiol.* 8:301-306.
- Huang Y.S., Ho S.C. 2010. Polymethoxy flavones are responsible for the antiinflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chem.* 119, 868–873.
- libuchi S., Minoda Y., Yamada K. 1972. Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase of *A. oryzae*. No.7. *Agric. Biol. Chem.* 37: 1553–1562.

Isaza M. Hipólito J. 2007. Taninos o Polifenoles vegetales. *Scientia Et Technica*. 13:13-18.

Jacob R.A.; Burri B.J. Oxidative damage and defense. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996, 63.

Kang H.J., Chawla S.P., Jo C., Kwon J.H., Byun M.W. 2006, Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresour Technol.* 97: 614-620.

Karakaya S . 2004. Bioavailability of phenolic compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004, 44, 453.

Kennedy J., Hayasaka Y., Vidal S., Waters E., Jones G. 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J Agric. Food. Chem.* 11:5348-5355.

Kim S. 2009. Environment-friendly adhesives for surface bonding of wood-based flooring using natural tannin to reduce formaldehyde and TVOC emission. Seoul: Department of Architecture, College of Engineering, Soongsil University (eds.), 745.

King P.J., Ma G., Miao W., Jia Q., McDoughall B.R.; Reinecke M.G., Cornell C., Kuan J., Kim T.R., Robinson Jr., W.E. 1999. Structure-activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. *J. Med. Chem.* 42: 497-509.

Kinsella J.E., Frankel E., German B., Kanner J. 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Ttechnol.* 47: 85-89.

Klick S., Herrmann K. 1988. Glucosides and glucose esters of hydroxybenzoic acids in plants. *Phytochemistry.* 27: 2177- 2180.

Knudson L. 1913. Tannic acid fermentation. *J. Biol. Chem.* 14: 159–202.

Koshihara Y., Neichi T., Murota S.I., Lao A.N., Fujimoto Y., Tatsuno T. 1984. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 792:92-97.

Kusak S., Hiltz J., Waitkus P. 1998. Impact performance of phenolic compositescomposites following thermal exposure. *J. Appl. Polym. Sci.* 67: 349-361.

- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A. 2008. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem. Rev.*7:301–311
- Lam T.B.T., Kadoya K., Iiyama K. 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the α -position, in grass cell walls. *Phytochemistry*. 57: 987- 992.
- Lane R.W., Yamakoshi J., Kikuchi M., Mizusawa K., Henderson L. Smith, M. 1997. Safety evaluation of tannase enzyme preparation derived from *Aspergillus oryzae*. *Food Chem. Toxicol.* 35: 207-212.
- Laranjinha J. 2002. Caffeic acid and related antioxidant compounds: Biochemical and cellular effects. In *Handbook of Antioxidants*; Packer, L., Cardenas, E., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York. Pp 279-302.
- Laranjinha J.A.N., Almeida L.M., Madeira V.M.C. 1994. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low-density lipoprotein peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 48: 487-494.
- Larone D. 2011. *Medically important fungi: A Guide to Identification*. Cap. Hyaline hyphomycetes. ASM Press: Washington, DC. USA. Pp. 282-485p.
- Lekha P.K., Lonsane B.K. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.* 44: 215–260.
- Lekha P.K., Lonsane B.K. 1994. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKZI 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Process Biochem.* 29:497-503.
- Lewis C.E., Walker J.R.L., Lancaster J.E., Sutton K.H. 1998. Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *J Sci Food Agric.* 77:45–57.
- Lewis J.A., Starkey R.L. 1969. Decomposition of plant tannins by some soil microorganisms. *Soil Sci.* 107: 235–241.
- Lewis Jack A; Starkey, Robert L. 1968 Vegetable tannins, their decomposition and effects on decomposition of some organic compounds. *Soil Sci.* 106: 241-247
- Li, S., Lo, C. Y., & Ho, C. T. (2006a). Hydroxylated polymethoxy-flavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12):4176–4185

Li, B.B., Smith, B., Hossain, Md.M., 2006b, Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48: 182-188

libuchi S, Minoda Y & Yamada K (1967) Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms. Part II. A new method determining the enzyme activity using the change of ultra violet absorption. *Agric. Biol. Chem.* 31: 513–518.

Ligor M., Buszewski B. 2003. Study of VOC distribution in citrus fruits by chromatographic analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 376: 668-672.

Lodovici M., Guglielmi F., Meoni M., Dolara P. 2001. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 39:1205-1210.

Londoño-Londoño J., Rodrigues da Lima, V., Lara O., Gil A., Pasa T.B.C., Arango G.J., Ramírez P.J.R. 2010. Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chem.* 119: 81–87.

López-Hernández V. 2014. Fortificación de cáscara de naranja (*C. sinensis* Var. Valencia) por impregnación con miel. Tesis de maestría. Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.

Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Billot, J. 1990. *Fruit Phenolics*. Publisher : CRC Press, Inc.. Florida,USA
Maga J.A. 1978. Simple phenol and phenolic compounds in food flavor. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 10: 323-372.

Maggi-Capeyron M.F., Ceballos P., Cristol J.P., Delbosc S., Le Doucen C., Pons M., Leger C.L., Descomps B. 2001. Wine phenolic antioxidants inhibit ap-1 transcriptional activity. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5646-5652.

Manach, C.; Scalbert, A .; Morand, C .; Rémésy, C .; Jimenez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(5):727-47.

Manthey J., Grohmann K. 1996. Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 44: 811-814.

Markom M., Hasan M., Daud W.R.W., Singh H., Jahim J.M. 2007. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: effects of solvents and extraction methods. *Sep Purif Technol.* 52:487–496.

- Márquez-Lara D., Suárez-Londoño A. 2008. El uso de taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes. *Revista de Medicina Veterinaria*. 16: 87-109.
- Martínez-Valverde I., Jesús P.M., Ros, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de Nutrición*. 50(1): 5-18.
- Martins S., Aguilar C.N., de la Garza-Rodriguez I., Mussatto S.I., Teixeira J.A. 2010. Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from *Larrea tridentata* by microwave-assisted extraction. *J Chem Technol Biotechnol*. 85(8): 1142–7.
- Morton L.W., Croft K.D., Puddey I.B., Byrne L. 2000. Phenolic acids protect low-density lipoproteins from peroxynitrite-mediated modification in Vitro. *Redox Rep*. 5:124-125.
- Mukherjee A.K., Adhikari H., Rai S.K. 2008. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrical* grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochem. Eng. J*. 39: 353–361.
- Naim M., Zehavi U., Nagy S., Rouseff R.L. 1992. Hydroxycinnamic acids as off-flavor precursors in citrus fruits and their products. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health*; American Chemical Society: Washington, DC. Chapter 14, pp 180-191.
- Nardini M., Natella F., Gentili V., Felice M.D., Scaccini C. 1997. Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense systems in rat: an in vivo study. *Arch. Biochem. Biophys*. 342:157-160.
- Nigam Poonam Singh nee (2009). Production of bioactive secondary metabolites. In Nigam PS, Pandey A, (eds). *Biotechnology for agro-industrial residues utilization*. (pp. 129-145). first ed. Netherlands: Editorial Springer
- Nogata Y., Sakamoto K., Shiratsuchi H., Ishii T., Yano M., Ohta H. 2006. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 70: 178-192.
- Okuda, T. 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*. 66:2012-2031.
- Olthof M.R.; Hollman P.C.H., Katan M. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Hum. Nutr. Metabol*. 131: 66-71.

Oomah B.D. 2001. Flaxseed as a functional food source. *J. Sci. Food Agric.* 81:889-894.

Otuk G., Deschamps A.M. 1983. Degradation of condensed tannin by several types of yeasts. *Mycopathologia.* 83: 107–111.

Padilla-Camberos, E., Lazcano-Díaz, E., Flores-Fernández, J.M., Owolabi, M.S., Allen, K., Villanueva-Rodríguez, S. 2014. Evaluation of the inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes, the antioxidant activity, and the polyphenolic content of *Citrus limetta* peel extract. *Sci. Word J.* Pp. 4.

Pandey A. 2002. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 3636:1-4.

Padey A., Soccol C., Larroche C. 2008. Current Developments in Solid-state Fermentations (Editors). *Asiatech Publishers, INC (Springer), New Delhi,* Pp. 3-12.

Pang Y., Peel G.J., Sharma S.B., Tang Y., Dixon R.A. 2008. A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 105: 14210-14225.

Paolocci F., Robbins M.P., Madeo L., Arcioni S., Martens S., Damiani F. 2007. Ectopic expression of a basic Helix-Loop-Helix gene transactivates parallel pathways of proanthocyanidin biosynthesis. Structure, expression analysis, and genetic control of leucoanthocyanidin 4-reductase and anthocyanidin reductase genes in *Lotus corniculatus*. *Plant Physiology.* 143:504-516.

Paolocci F., Bovone T., Tosti N., Arcioni S., Damiani F. 2005. Light and exogenous transcription factor qualitatively and quantitatively affect the biosynthetic pathway of condensed tannins in *Lotus corniculatus* leaves. *J. Exp.Bot.* 56:1093-1103.

Peleg H., Naim M., Rouseff R.L., Zehavi U. 1991. Distribution of bound and free phenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). *J. Sci. Food Agric.* 57: 417- 426.

Plumb G.W., Barcia-Conesa M.T., Kroon Paul A., Rhodes M., Ridley S., Williamson G. 1999. Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *J. Sci. Food Agric.* 79: 390-392.

Porter, L.J.1989. Tannins. *Meth Plant Biochem* 1.Pp:389-419

Prior, R.L., Gu, L. 2005. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry.* 66:2264- 2280.

Rajakumar G.S., Nandy S.C. 1983. Isolation, purification, and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 525–527.

Raghavarao K. Ranganathan T.V. 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* 13:121-135.

Ramírez-Coronel M.A. 2000. Purificación y caracterización de una tanasa de *Aspergillus niger* Aa20, producida por fermentación en medio sólido. Tesis de Maestría, UAM-I., México, D.F.

Ramos-Novelo, J.A. FIRA, 2003. Riesgos y oportunidades de la red de valor naranja. Un enfoque competitivo. *Boletín Informativo* No. 319. Volumen XXXIV. 160 pp.

Rao C.V., Desai D., Simi B., Kulharni N., Amin S., Reddy B.S. 1993. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane induced biochemical changes and aberrant crypt foci, formation in rat colon. *Cancer Res.* 53:4182-4188.

Rechner A.R., Spencer J.P.E., Kuhnle G., Hahn U., RiceEvans C. 2001. A. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radical Biol. Med.* 30:1213- 1222.

Reed, J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci* 73:1516-1528

Reed J. 2010. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 73:1516-1528.

Rezzadori K., Benedetti S., Amante E.R. 2012. Proposals for the residues recovery: orange waste as raw material for new products. *Food Bioprod. Process.* 90(4): 606-614.

Rice-Evans C.A., Packer L., *Flavonoids in Health and Disease*, Packer, Lester and Fuchs, Jürgen Marcel Dekker: New York, 1998.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2:152-159.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 933-956.

Robbins, M.P., Bavage, A.D., Allison, G., Davies, T., Hauck, B., Morris, P. (2005.) A comparison of two strategies to modify the hydroxylation of condensed tannin polymers in *Lotus corniculatus* L. *Phytochemistry.*, 66: 991-999.

- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitiang P., Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66: 400-436.
- Robards K., Antolovich M. 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review. *Analyst.* 122: 11R-34R.
- Robinson T., Nigam P. 2003. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13(2-3): 197-203.
- Rodrigo M.J., Marcos J.F., Zacarías L. 2004. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6724-6731.
- Rodríguez. 2016. Pretratamiento de hidrólisis hidrotérmica para la degradación de los carbohidratos complejos de residuos de frutas para la obtención de bioetanol (Tesis de maestría). Universidad de Oviedo, Oviedo, España.
- Rodríguez C., Sanroman A. 2006. Application of solid state fermentation to food industry. A review. *J. Food Eng.* 76: 291-302.
- Rosales, M., Galindo A., González R.F. 2002. Taninos condensados en la corteza de *Pinus chihuahuana* y *Pinus durangensis*. *Información Tecnológica* 13(1): 39-42.
- Sabu A., Augur C., Swati C., Pandey A. 2006. Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation. *Process Biochem.* 41:575–580.
- Sambandam T., Mahadevan A. 1993 Degradation of catechin and purification and partial characterization of catechin oxygenase from *Chaetomium cupreum*; *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9 37-44
- Sarría, C. A. 2005. Flavonoides: compuestos bioactivos de los alimentos. *Bol.étin Pediatrico de la Arg. Sociedad ArgonesaRioj Sor.* 34:88-92.
- Scalbert A., Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130:2073S-2085S.
- Schofield P., Mbugua D.M., Pell A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Sci. Technol.* 91:21-40.
- Shahidi F., Naczk M. 2003. Phenolics in food and nutraceuticals. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Shahidi F., Naczek M. 1995. Food phenolics: Sources, chemistry, effects, and application. Technomic Publishing Company, Inc.: Lancaster, PA.

Shahidi F., Wanasundara P.K. 1992. Phenolic antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 32:67.

Sikorska M., Matlawska I., Glowniak K., Zgorka G. 2000. Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids in *Asclepias syriaca* L. Acta Pol. Pharm. 57: 69-72.

Singhania R.R., Patel A.K., Soccol C.R., Pandey A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. Biochem. Eng.J. 44: 13–18.

Singh S., McCallum J., Gruber M.Y., Towers G.H.N., Muir A.D., Bohm B.A., Koupai-Abyazani M.R., Glass A.D.M. 1997. Biosynthesis of flavan-3-ols by leaf extracts of *Onobrychis viciifolia*. Phytochemistry. 44:425-432.

Skene I.K., Brooker J.D. 1995. Characterization of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. Anaerobe. 1: 321–327.

Soto, R. (2001). Aislamiento, purificación, caracterización y modificación química de los taninos aislados de la corteza de *Pinus radiata* D. Don para su aplicación en la industria de las resinas y adhesivos para madera (Tesis doctoral). Escuela de Graduados, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Soto, R.; Freer, J.; Reyes, N. & Baeza, J. (2001). Extraction of polyflavonoids from *Pinus radiata* D. Don bark. Evaluation of effects of solvent composition and of the height on tree bark. Bol. Soc. Chil. Quím. 46: 41-49.

Stacewicz-Sapuntzakis M., Bowen P.E., Hussain E.A., Damayanti-Wood B., Farnsworth N.R. 2001. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 41:251-286.

Stafford, H.A. 1989. The enzymology of proanthocyanidin biosynthesis, in: Hemingway, R.W., Karchesy, J.J. (Eds.), Plenum Press, New York. pp. 47-70.

Taiwo, E.A. 1997. Bonding characteristics of adhesive/particle joint. Wood Sci. Technol. 31: 303-309.

Tan, S. C. Determinants of eating quality in fruits and vegetables. Proc. Nutr. Soc. Aust. 2000, 24

Tanner G.J., Kristiansen K.N. 1993. Synthesis of 3,4-cis-[3H]leucocyanidin and enzymatic reduction to catechin. Anal. Biochem. 209:274-277.

- Tenorio-Domínguez M. 2016. Flavonoids extracted from orange peelings tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) and their application as a natural antioxidant in sachá inchi (*Plukenetia volubilis*) vegetable oil. *Scientia Agropecuaria*. 7(4):419-431.
- Tian L., Pang Y., Dixon R. 2008. Biosynthesis and genetic engineering of proanthocyanidins and (iso)flavonoids. *Phytochem. Rev.* 7:445-465.
- Tomás-Barberán F.A., Espín J.C. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 81: 853-876.
- Tomas-Barberan F.A., Clifford M.N. 2000. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 80:1024–1032.
- Torchio, F., Cagnasso, E., Gerbi, V., Rolle, L. 2010. Mechanical properties, phenolic composition and extractability indices of Barbera grapes of different soluble solids contents from several growing areas. *Analitical Chimica Acta.* 660: 1-2:183-189.
- Törrönen R., Häkkinen S., Kärenlampi S., Mykkänen H. 1997. Flavonoids and phenolic acids in selected berries. *Cancer Lett.* 114:191–192.
- Trejo A., Bravo J., Venegas J., Jiménez D. 2016. Hidrólisis ácida de *Citrus sinensis* para la obtención de azúcares fermentables. *Revista de Tecnología e Innovación.* 3(7):46-50.
- Vázquez-Flores A.A., Álvarez-Parrilla E., López Díaz J.A., Wall-Medrano A., De la Rosa L.A. 2012. Hydrolyzable and condensed tannins: chemistry, advantages and disadvantages of their intake. *Tecnociencia Chihuahua.* 6:84-93.
- Vennat B., Pourrat A., Pourrat H. 1986. Production of a depolymerized tannin extract using a strain of *Saccharomyces rouxii*. *J. Ferment Technol.* 64: 227–232.
- Wang, L., Wang, J., Lianying, F., Zheng, Z., Zhi, D., Wang, S., Li, S., Ho, Ch., Zhao, H. 2014. Anticancer activities of citrus peel polymethoxyflavones related to angiogenesis and others. *BioMed Res. Int.* ID 453972, Pp. 10.
- Wang L, Weller C.L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol.* 17(6): 300–312

- Wang, X.M.; Riedl, B.; Christiansen, A.W. & Geimer, R. L. (1995). The effects of Temperature and Humidity on phenol-formaldehyde resin bonding. *Wood Sci. Technol.* 29: 253-266.
- Wang Y.C., Chuang Y.C., Hsu H.W. 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chem.* 106: 277-284.
- Williamson G., Plumb G.W., Garcia-Conesa M.T. 1999. Glycosylation, esterification and polymerization of flavonoids and hydroxycinnamates: Effects on antioxidant properties. In *Plant polyphenols 2. Chemistry, biology, pharmacology, Ecology*. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. Pp 483-494.
- Winter M., Herrmann K. 1986. Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 34: 616-620.
- Wu H., Haig T., Prately J.; Lemerle D., An M. 2000. Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Variation of phenolic acids in root tissues. *J. Agric. Food Chem.* 48:5321-5325.
- Wu H., Haig T., Prately J., Lemerle D., An M. 1999. Simultaneous determination of phenolic acids and 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one in wheat (*Triticum aestivum* L.) by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 864:315-321.
- Xi, W.; Zhang, Y.; Sun, Y.; Shen, Y.; Ye, X.; Zhou, Z. 2014. Phenolic composition of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) pulps and their antioxidant properties. *Industrial Crops and Products* 52: 466-474.
- Xu, G.H., Ye, X., Chen, J., Liu, D.H. 2007. Effect of heat treatment on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Citrus Peel Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 330-335.
- Yamada H, Adachi O, Watanabe M & Sato N (1968) Studies of fungal tannase. Part I. Formation, purification and catalytic properties of tannase of *Aspergillus flavus*. *Agric. Biol. Chem.* 32: 1070–1078
- Zhao, J., Pang, Y., Dixon, R.A. (2010.) The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant Physiology*. 153: 437-443.
- Zhao J., Dixon R.A. 2009. The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plants Sci.* 15:72-80.
- Zheng W., Wang S.Y. 2001. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4977-4982.

Compuestos fenolicos: taninos en linea
<https://botplusweb.portalfarma.com/Documentos/panorama%20documentos%20multimedia/PAM235%20PLANTAS%20MEDICINALES%20CON%20TANINOS.PDF>

Portal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México. (2009) [http:// www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx).

Tangarife, V. (2011) Aspergillus spp. de Universidad de Antioquia, en línea
en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100812>

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, (2004). USDA database for the Proanthocyanidins Content of Selected foods de
<https://data.nal.usda.gov/dataset/usda-database-proanthocyanidin-content-selected-foods-2004/resource/355e4917-52f6-4107-ba55>