

EL LIMÓN Y SUS COMPONENTES BIOACTIVOS

Ángel García Lidón / José Antonio del Río Conesa / Ignacio Porras Castillo
María Dolores Fuster Soler / Ana Ortuño Tomás



EL LIMÓN
Y SUS COMPONENTES BIOACTIVOS

EL LIMÓN Y SUS COMPONENTES BIOACTIVOS

Ángel García Lidón¹
José Antonio del Río Conesa²
Ignacio Porrás Castillo¹
María Dolores Fuster Soler¹
Ana Ortuño Tomás²

¹ Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA).
Departamento de Especies Leñosas. Equipo de Citricultura.
Estación Sericícola, 30150 La Alberca, Murcia.

² Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal), Facultad de Biología,
Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia.



Región de Murcia
Consejería de Agricultura,
Agua y Medio Ambiente

© Comunidad Autónoma de la Región de Murcia
Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente
I.S.B.N.: 84-688-2698-7
Depósito Legal: MU-1640-2003
Fotocomposición: CompoRapid, S.L.
Impresión: Pictografía, S.L.

AGRADECIMIENTOS

La investigación mostrada en este libro ha sido subvencionada por los siguientes proyectos:

- *AGR/7/FS/02* concedido por la *Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua, de la Región de Murcia*.
- *RTA 01-030* concedido por el *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)*.

El cultivo del limonero es de los más importantes de la Región de Murcia, es fuente de gran riqueza, identifica a nuestra tierra y tiene un alto valor paisajístico y medioambiental. La magnífica aclimatación a nuestra zona, la gran experiencia de nuestros agricultores, la expansión del cultivo a las nuevas zonas regables y la garra del sector comercial, ha hecho del limón de Murcia un sinónimo de calidad y una fuente de salud.

La importancia socioeconómica del cultivo justifica cualquier publicación que aborde diversos aspectos del mismo. Este libro es parte de los resultados de la colaboración de un grupo de especialistas que desde hace más de 10 años llevan a cabo el Equipo de Citricultura del actual IMIDA con el Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Murcia. La calidad profesional de todos ellos garantiza el alto nivel científico de la publicación.

En el libro se aborda por una parte temas de componente agronómico (variedades, patrones, floración, maduración y calidad del fruto, etc) y por otra aporta interesantes datos de los componentes bioquímicos del limón y su poder antioxidante.

Aunque en el libro hay una gran componente bibliográfica, no es un libro academicista, ya que se observa el gran dominio tanto de la capacidad de observación de campo de los autores cuyo fruto ha sido la selección de las variedades autóctonas de Fino y Verna, que son actualmente las cultivadas en nuestros huertos, junto con el dominio de las técnicas instrumentales de laboratorio en la caracterización y cuantificación de flavonoides. En este libro son expuestos de una forma ordenada y sencilla, numerosos datos, que han sido publicados ya por los autores en los últimos quince años en numerosas revistas tanto españolas como extranjeras, que en general no están al alcance del público. La abundante bibliografía permite a los que tengan una mayor inquietud intelectual o pretendan profundizar en algún aspecto, acceder a los trabajos originales.

En lo posible ha sido eliminado todo lenguaje demasiado técnico y científico, sin caer en la vulgaridad, buscando el equilibrio entre la sencillez y el rigor científico, conectando con los técnicos, agricultores y el sector del comercio, ofreciendo respuestas concretas eliminando esas situaciones tan frecuentes de divorcio entre técnicos y científicos del mundo cotidiano.

La obra presentada constituye un importante hito al describir la situación actual del sector del limón en España y ayuda desde un punto de vista muy práctico a tener una visión global de un producto que es actualmente el más típico de la Región de Murcia.

Este libro se enmarca dentro de los Libros Técnicos que edita la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, mostrando su apoyo incondicional a todo aquello que repercuta en una mayor tecnificación del sector productivo de la región.

Como se desprende de la lectura del libro, la difusión del limón como fuente de salud, tanto como fruta fresca como en zumo, requiere acciones adecuadas de promoción que posibiliten la apertura de nuevos mercados y consoliden los actuales.

Antonio Cerdá Cerdá
Consejero de Agricultura, Agua y Medio Ambiente

SUMARIO

1. Introducción	11
1.1. Situación actual y perspectivas para el 2006-2007	13
2. Variedades de limonero	19
2.1. Origen de la especie	21
2.2. Hábitat de cultivo	21
2.3. Mejora genética y selección varietal	22
2.4. Variedades de limonero en el mundo	23
2.4.1. Descripción de las principales variedades	23
2.4.1.1. Eureka	23
2.4.1.2. Lisbon	25
2.4.1.3. Femminello	26
2.4.1.4. Verna	27
2.4.1.5. Fino	29
2.4.1.6. Génova	31
2.4.2. Otras variedades de interés en distintas zonas citrícolas ..	31
2.5. Programas de selección clonal de limonero realizados en el mundo	32
2.5.1. Clones de Eureka	33
2.5.2. Clones de Lisbon	34
2.5.3. Clones de Femminello	34
2.6. Programa de selección clonal de limonero en España	35
3. Patrones de limonero	37
3.1. El injerto	39
3.1.1. Historia de los patrones en España	39
3.1.2. Interacciones entre el injerto y el patrón de los agrios ..	40
3.1.3. Influencia del patrón sobre la variedad injertada	41
3.1.3.1. Vigor	41
3.1.3.2. Productividad	41
3.1.3.3. Calidad de fruta	42
3.2. Características de los principales portainjertos	42
3.2.1. Naranja amargo	42
3.2.2. <i>Citrus macrophylla</i>	43
3.2.3. Citranges Troyer y Carrizo	43

3.2.4. Mandarino Cleopatra	43
3.2.5. Limón rugoso	44
3.2.6. Citrumelo	44
3.2.7. <i>Citrus volkameriana</i>	45
3.3. Patrones de limonero utilizados en España	45
4. Fructificación	47
4.1. Floración y desarrollo del fruto	49
4.2. Relaciones intensidad de floración-productividad. Los fenómenos de competencia de frutos	52
4.3. Factores que afectan al cuajado	52
4.4. Factores que determinan el tamaño final del fruto	55
4.4.1. Influencia del número de frutos	55
4.4.2. Influencia del número de flores	56
4.5. Tipos de floraciones en limonero	57
5. Maduración	61
5.1. Evolución de la maduración	63
5.1.1. Características físicas	63
5.1.2. Composición química	66
5.1.2.1. Azúcares	66
5.1.2.2. Ácidos orgánicos	68
5.1.2.3. Vitamina C	70
5.1.2.4. Aminoácidos	70
5.1.2.5. Compuestos fenólicos	72
6. Componentes bioactivos del limón	73
6.1. Alimentos funcionales	75
6.2. Vitamina C	78
6.2.1. Vitamina C en el limón	86
6.3. Flavonoides: Grupos y Estructuras	88
6.3.1. Conceptos generales sobre su biosíntesis	96
6.3.2. Funciones fisiológicas en las plantas y aplicaciones	100
6.3.2.1. Papel antioxidante de los flavonoides	102
6.3.2.1.1. Mecanismo de acción de los antioxidantes fenólicos	105
6.3.2.2. Papel protector de los fenoles sobre el ácido indol-3-acético (AIA)	109
6.3.2.3. Aplicaciones farmacológicas	110
6.4. Flavonoides mayoritarios en <i>Citrus limon</i>	111
6.4.1. Niveles en hojas, tallos y flores	111
6.4.2. Niveles y distribución en el fruto	112
6.5. Actividad antioxidante en el zumo de <i>Citrus limon</i> (Fino y Verna)	115
7. Bibliografía	117

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS PARA EL 2006-07

El limonero (*Citrus limon* (L.) Burm. f) es la tercera especie de cítricos en importancia en el mundo después del naranjo y mandarino, con una producción total de más de 4.400.000 tm en la campaña 2000/2001, destacando Argentina con 1.180.000 tm, España con 961.000 tm, Estados Unidos 907.000 tm, Italia 537.000 tm, Turquía 500.000 tm, Grecia con 145.000 tm y Sudáfrica con 106.000 tm.

España es actualmente el principal país productor de limones de la Cuenca Mediterránea con una producción de 961.000 tm superando a Italia (537.000 tm) y a Turquía (500.000 tm). Es también el principal país exportador de fruto fresco del mundo. Por regiones, el aforo para la campaña 2001-02 es: Región de Murcia 434.000 tm, Comunidad Valenciana 361.000 tm, Andalucía 164.000 tm y otras regiones 11.000 tm.

Las variedades autóctonas de la Región de Murcia “Fino” y “Verna” representan más del 95% del total de la superficie de cultivo en España. La superficie de cultivo y producción de limón “Fino” va en aumento (Tablas 1.1 y 1.2), debido principalmente a las buenas cotizaciones que ha tenido en los últimos años el limón temprano (septiembre-octubre-noviembre) así como su mayor productividad, lo que ha inducido a los agricultores a realizar plantaciones de las nuevas selecciones que permiten recolecciones más tempranas y productivas. En la Tabla 1.2 se puede observar la evolución de la producción de limones. En la variedad “Verna” se ha producido una disminución debido al envejecimiento de los árboles, ya que no se han realizado apenas plantaciones en la últimas décadas, no obstante, se observa un incremento en los últimos años de las plantaciones de esta variedad (Tabla 1.3).

Las viejas plantaciones de limonero en España se realizaron con las varie-

dades población y a partir de los años 80 se empezaron a multiplicar y plantar los nuevos clones libres de virus, de los que se estima que hay más de 10.000 ha de superficie cultivada.

En las últimas campañas se ha producido un aumento de la superficie dedicada al cultivo del limonero, pasando de las 41.864 ha en la campaña 1996-97 a las 46.540 ha de la campaña 2001-2002 (Tabla 1.1). En los últimos cinco años los mayores incrementos se han producido en limón “Fino”, con algo más de 7.000 ha, mientras que la variedad “Verna” ha disminuido en unas 2.500 ha, correspondiendo gran parte de esta superficie al arranque o abandono de plantaciones antiguas y marginales.

TABLA 1.1.
*EVOLUCIÓN DE LA SUPERFICIE EN PRODUCCIÓN DE LIMÓN
EN ESPAÑA (HA)*

	1996/97	1997/98	1998/99	1999/2000	2000/2001	2001/2002
“Fino”	18.121	17.089	19.724	21.022	23.450	25.540
“Verna”	23.743	24.462	23.473	22.633	21.800	21.000
TOTAL	41.864	41.551	43.197	43.655	45.250	46.540

En la actualidad la producción de limón en España se distribuye en aproximadamente un 60% para limón “Fino” y un 40% para “Verna”. Es de destacar un notable incremento en “Fino” que ha pasado de 374.435 tm en la campaña 1996/97 a las 585.000 tm de la campaña de 2001/02, con un incremento del 56% en relación a la producción de hace 5 años (Tabla 1.2), en gran parte debido a la entrada en producción de las nuevas plantaciones de “Fino”/*C. macrophylla*. Por otra parte se observa una estabilización de la producción del “Verna” en torno a 400.000 tm.

TABLA 1.2.
EVOLUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LIMÓN EN ESPAÑA (TM)

	1996/97	1997/98	1998/99	1999/2000	2000/2001	2001/2002
“Fino”	374.435	476.580	441.200	505.728	532.441	585.000
“Verna”	338.765	426.220	436.795	390.036	403.026	385.000
TOTAL	713.200	902.800	877.995	895.764	935.467	970.000

Del total de la producción de “Fino” las plantaciones tradicionales repre-

sentan actualmente el 55%, correspondiendo el 45% restante a las nuevas selecciones (Tabla 1.4).

TABLA 1.3.
*NÚMERO DE PLANTONES DE LIMONERO COMERCIALIZADOS
POR LOS VIVEROS AUTORIZADOS DE CÍTRICOS EN ESPAÑA*

	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	TOTAL
“Verna”	35.986	40.405	69.223	154.233	126.261	155.840	135.917	718.565
“Fino”	81.080	153.321	295.429	381.605	313.966	360.677	313.625	1.897.703
“Eureka”	102.156	88.090	121.884	77.830	96.200	87.553	87.316	661.029
Otros	142	-	-	-	-	-	-	142
Total	219.364	281.816	486.536	613.668	537.127	604.070	536.858	3.279.439

PLANTONES DE LIMONERO

1972 a 1994 = 3.768.891

1994 a 2000 = 3.279.439

TOTAL 7.048.330

En cuanto al “Verna”, el 97% de la producción corresponde a cultivares antiguos y tradicionales (Tabla 1.5), mientras que las nuevas selecciones de “Verna” 50, “Verna” 51 y “Verna” 62, todavía han sido poco plantadas y gran parte de las nuevas plantaciones realizadas no han entrado en producción.

TABLA 1.4.
*DISTRIBUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN ACTUAL (EN TM) DE TIPOS
DE LIMÓN “FINO” Y HORIZONTE 2006-07 (CON ENTRADA EN
PRODUCCIÓN DE LAS NUEVAS PLANTACIONES Y CON LA
HIPÓTESIS DE QUE NO SE REALICEN NUEVAS).*

	Producción 2001-2002	Horizonte 2006-2007
“Fino” tradicional		
Cosecha	270.000	208.000
Segundos	30.000	25.000
Rodrejos	20.000	17.000
TOTAL “Fino” tradicional	320.000	250.000
“Fino” 49		
Cosecha	214.500	340.000
Segundos	23.500	40.000
Rodrejos	12.000	20.000
TOTAL “Fino” 49	250.000	400.000

“Fino” 95		
Cosecha	12.500	37.500
Segundos	1.500	4.500
Rodrejos	1.000	3.000
TOTAL “Fino” 95	15.000	45.000
Cosecha	497.000	585.500
Segundos	55.000	69.500
Rodrejos	33.000	40.000
TOTAL = F. tradicional + F-49 + F-95	585.000	695.000

En el horizonte del 2006-07, se prevén notables incrementos en la producción de limón “Fino” (Tabla 1.4), que llegarán posiblemente a 700.000 tm, mientras que en “Verna” habrá una ligera bajada de la producción. La previsión de la producción a cinco años vista, con la hipótesis de que no se realizasen nuevas plantaciones, es de más de 1.000.000 tm (Tabla 1.6).

La distribución de la producción actual y la previsión en el horizonte del 2006-07 por tipos de limón y según floraciones puede apreciarse en las Tablas 1.4 y 1.5.

TABLA 1.5.
*DISTRIBUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN (EN TM) ACTUAL Y
HORIZONTE 2006-07 DE LIMÓN “VERNA” (CON ENTRADA EN
PRODUCCIÓN DE LAS NUEVAS PLANTACIONES Y CON LA
HIPÓTESIS DE QUE NO SE REALICEN NUEVAS)*

	Producción 2001-2002	Horizonte 2006-2007
“Verna” tradicional		
Cosecha	298.000	279.000
Segundos	39.000	36.000
Rodrejos	38.000	35.000
TOTAL “Verna” tradicional	375.000	350.000
Nuevas selecciones, 50, 51 y 62		
Cosecha	8.000	16.000
Segundo	1.000	2.000
Rodrejos	1.000	2.000
TOTAL nuevas selecciones	10.000	20.000
Cosecha	306.000	295.000
Segundos	40.000	38.000
Rodrejos	39.000	37.000
TOTAL= “Verna” tradicional + nuevas selecciones	385.000	370.000

El limón contiene un gran número de componentes químicos naturales como son ácido cítrico, ácido ascórbico, minerales y flavonoides. Aunque las propiedades saludables, siempre han recaído en su contenido en vitamina C, aportaciones recientes han puesto de manifiesto que éstas también se deben a los flavonoides. En este sentido son numerosos los trabajos de investigación en los que se establece que los flavonoides realizan una gran variedad de acciones biológicas entre las que se incluyen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, antivirales, antimutagénicas y anticarcinogénicas. Por todo ello, aunque las nuevas variedades de cítricos han sido seleccionadas y desarrolladas fundamentalmente para la producción de su consumo en fresco, dadas las peculiares características del metabolismo secundario del género *Citrus* por su contenido en flavonoides, su aprovechamiento industrial en el campo agroalimentario y farmacológico se está desarrollando enormemente.

TABLA 1.6.
PRODUCCIÓN (EN TM) ACTUAL Y HORIZONTE 2006-07 DE LIMONERO “FINO” Y “VERNA” (CON ENTRADA EN PRODUCCIÓN DE LAS NUEVAS PLANTACIONES Y CON LA HIPÓTESIS DE QUE NO SE REALICEN NUEVAS).

	Producción 2001-2002	Horizonte 2006-2007	Variación
“Fino”			
“Fino” Tradicional	320.000	250.000	- 70.000
“Fino” 49	250.000	400.000	+ 150.000
“Fino” 95	15.000	45.000	+ 30.000
TOTAL “Fino”	585.000	695.000	+ 110.000
“Verna”			
“Verna” Tradicional	375.000	350.000	- 25.000
“Verna” Nuevas selecciones	10.000	20.000	+ 10.000
TOTAL “Verna”	385.000	370.000	- 15.000
TOTAL “Fino” + “Verna”	970.000	1.065.000	+ 95.000

2. VARIEDADES DE LIMONERO

2.1. ORIGEN DE LA ESPECIE

El limonero parece ser originario de la zona este de la región del Himalaya en la India y áreas adyacentes, de donde es también el cidro (*C. medica* L.), ya que allí se encuentran abundantes híbridos naturales entre cidro y limonero; sin embargo, el limón tipo mediterráneo es una planta rara en dicha región. Su cultivo fue introducido en China en tiempo de la dinastía Sung (760-1297 d. C.) y en la cuenca mediterránea, los árabes lo difundieron por los años 1000-1200 d. C.). Linneo consideraba el limonero una variedad de cidro y para algunos especialistas es meramente un cultígeno aparecido en la Costa del Golfo de Omán o en Italia.

Esta especie fue descrita por primera vez con detalle por Ibn-Jami, físico de la corte de Saladino (1171-1193), en un tratado médico sobre los usos del limón.

2.2. HÁBITAT DE CULTIVO

El limonero es una planta algo más resistente al frío y al calor que el cidro, sin embargo, es mucho más sensible que la mayoría de los otros cítricos cultivados, por lo que requiere para vegetar bien climas tipo semitropical o tropical. En los climas tropicales el limonero crece y fructifica con normalidad, sin embargo, los frutos que produce no tienen buena calidad comercial, por ser demasiado gruesos y con bajísima acidez, por ello en dichas zonas se prefiere el cultivo de la lima (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swing).

El clima más adecuado para el cultivo del limonero es el de tipo mediterráneo, por ello las principales zonas productoras del mundo están locali-

zadas en las zonas costeras del sur de California, Sicilia, Levante y sur de España, noroeste de Argentina, sur de Grecia, sur de Turquía, etc.

La importancia del limonero es menor que la del naranjo, como consecuencia de una menor demanda de consumo y por tener unas exigencias mayores en cuanto a clima y suelo para poder satisfacer unos niveles de calidad y productividad adecuados, ocurriendo muy a menudo que en zonas donde vegeta óptimamente, produce unos frutos de pésima calidad.

2.3. MEJORA GENÉTICA Y SELECCIÓN VARIETAL

Ante la inexistencia de líneas nucelares de nuestras variedades autóctonas de limonero, el Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero autorizó a los Viveros a utilizar material extranjero de limonero libre de virus, importándose principalmente material nucelar de las variedades “Eureka” y “Lisbon”.

Hasta el año 1973 en que se inician las primeras selecciones de nuestras variedades autóctonas de limonero “Verna” y “Fino”, dentro del Plan Nacional Coordinado de Investigación sobre Cítricos, realizándose unas prospecciones de material genético de interés, los únicos trabajos de mejora llevados a cabo fueron efectuados por agricultores, técnicos directores de explotaciones y pequeños viveristas. Dichos trabajos de selección, aunque han contribuido a la obtención de dos variedades de calidad aceptable, “Verna” y “Fino”, no tenían las características suficientes para ser competitivos en los mercados europeos.

La Citricultura en aquellos años precisaba disponer de una amplia gama de clones seleccionados que presentasen inalteradas o mejorasen las características agronómicas de los cultivares de donde procedían.

Los métodos de propagación utilizados antiguamente en limonero fueron la siembra de semillas (árboles pepiteros), el enraizamiento de estacas y posteriormente el injerto, existiendo aún por distintos puntos de la geografía española árboles de limonero procedentes de semilla. El sistema de propagación por semillas, con una baja poliembrionía, la mutación espontánea y las introducciones de material vegetal de otros países, han contribuido a la variabilidad genética existente. Con la multiplicación vegetativa por estaca, el injerto y las líneas nucelares en los casos en que se da poliembrionía, se

ha fijado el material vegetal para propagar sin preocuparse mucho de su calidad, perpetuándose así formas no adecuadas o bien mutaciones regresivas como: “fruto corrugado”, “fruto piriforme”, “árboles de sombra”, “trompeteros”, “moriscos”, etc.

Si se analizan los calendarios de recolección de las distintas variedades existentes en los países productores de limón, observamos que las producciones son muy escasas en los meses de junio, julio, agosto y septiembre, precisamente cuando la demanda de consumo es más elevada. Con nuestras variedades “Verna” y “Fino” podemos cubrir el ciclo anual de producción. La variedad “Verna” tiene una gran capacidad de conservación de los frutos en árbol y algunas líneas de “Fino” permiten recolectar frutos muy tempranos (septiembre-octubre). También hay que tener en cuenta que muchas variedades se adaptan con dificultad frente a las condiciones ecológicas, especialmente en los que respecta a la climatología.

Es necesario por tanto realizar como primer método de mejora, la selección de campo del propio material autóctono que poseemos y vigilar con atención la posible aparición de mutaciones gemarias favorables que aparezcan espontáneamente.

2.4. VARIEDADES DE LIMONERO EN EL MUNDO

El número de variedades de limonero cultivadas en el mundo es bastante reducido en comparación con naranjos o mandarinos; además muchas variedades locales de distintos países son muy parecidas. En este apartado estudiaremos por orden de importancia a nivel mundial, los principales cultivares de limonero: “Eureka”, “Lisbon”, “Femminello”, “Verna”, “Fino” y “Génova”.

2.4.1. Descripción de las principales variedades

2.4.1.1. “Eureka”

Fue obtenida en Los Angeles, California en el año 1838, de una siembra de semillas de frutos, tal vez de la variedad “Lunario” procedentes de Italia. Varios años más tarde, hacia 1877, Andrew Boyle y C.R. Workman adquirieron algunas de estas plantas y seleccionaron algunos tipos interesantes. Workman dio unas varetas de una de estas plantas a Thomas A. Garey, que



Foto 1. Limón "Eureka".

era el mayor viveristas de Los Angeles y le introdujo y propagó con el nombre de "Garey's Eureka".

Es la variedad más importante de California (alrededor del 75 por 100 del total de las plantaciones) y la primera variedad del mundo, se cultiva en California, Australia, Sudáfrica, Argentina e Israel. Es reflorecente, con mayor o menor intensidad según la climatología del lugar en donde se encuentra.

El fruto (Foto 1) es de tamaño mediano, de forma elíptica u oblonga, a veces obovoide, ordinariamente con cuello pequeño en la base, mamelón apical delgado y de longitud variable, frecuentemente circundado por surco areolar. El número de semillas es variable con los clones y condiciones de cultivo y ambientales. El color del fruto es amarillo en la madurez. Corteza adherente de espesor medio y de superficie finamente punteada, ligeramente rugosa, con glándulas esenciales hundidas. Gajos alrededor de 10, eje central pequeño y normalmente sólido, pulpa de color verde amarillento, tierna y jugosa, sabor muy ácido. Producción distribuida a lo largo de todo el año, pero principalmente al final de invierno, primavera y principios de verano.

Árbol de vigor y tamaño medio, porte extendido y abierto, poco espinoso, de vegetación más pobre que el “Lisbon”. Muy productivo y con tendencia a fructificar al final de largas ramas, muy precoz. El árbol es sensible al frío, al *Prays citri* Mill, y al ácaro de las maravillas (*Aceria sheldoni* Ewing). Exigente en cuidados culturales. Poco longevo.

2.4.1.2. “Lisbon”

Parece ser de origen portugués, derivado tal vez de unas plantas de semilla del limón “Gallego”. Selecciones de esta variedad existentes en Argelia, Marruecos y Portugal son difíciles de distinguir del limonero “Lisbon”.

Las primeras referencias de “Lisbon” en California aparecen en 1853 en un catálogo de “Warren and Sons Nursery y Garden” en Sacramento. En 1843 está en la lista de variedades de un vivero de “Nonantum Vale” cerca de Boston. Esta variedad fue introducida con anterioridad en Australia, alrededor del año 1824.

El gran vigor, la rusticidad y la alta productividad de “Lisbon”, hacen que sea una de las variedades más populares. “Eureka” es el único rival de



Foto 2. Limón “Lisbon”.

“Lisbon” sobre todo cuando se trata de zonas costeras. Debido a su mayor producción está desplazando al “Eureka” en California.

El fruto (Foto 2) es de tamaño medio, elíptico u oblongo, base con un ligero cuello, ápice más apuntado que en el “Eureka” y de una forma más gradual, más liso y menos acostillado que “Eureka”, el mamelón y el surco areolar más prominente y de forma irregular, normalmente asurcado en uno de los lados. El número de semillas es variable, pero normalmente más que el “Eureka”. Fruto de color amarillo en la madurez. Corteza de espesor medio superficie finamente punteada, poco rugosa y muy adherente. Número de gajos 10, eje central pequeño y sólido. Pulpa color pálido-verdoso-amarillento, de fina granulometría, tierna y jugosa, sabor muy ácido. Recolecciones principalmente en invierno y comienzo de primavera.

Árbol vigoroso, con marcada tendencia a la verticalidad, espinoso, densamente foliado y productivo. Es una de las variedades más vigorosas y más resistentes a las condiciones climáticas adversas, frío o calor, vientos fuertes, etc. Poco exigente en cuidados culturales.

2.4.1.3. “Femminello”

Es la variedad italiana más antigua y de mayor importancia en Italia con cerca de un 60% de la producción en dicho país. Se caracteriza por una marcada refluorescencia.

El fruto es de tamaño medio, corto y elíptico, redondeado en la base y con un cuello muy débil, mamelón pequeño y obtuso, pocas semillas, algunas de ellas rudimentarias. Fruto de color amarillo en la madurez. Corteza de espesor medio, ligeramente lisa, superficie finamente punteada con glándulas hundidas, fuertemente adherida. Gajos alrededor de 10. Eje de mediano tamaño y sólido. Pulpa tierna, jugosa y muy ácida. Cosecha distribuida a lo largo de todo el año, pero con más intensidad a final de invierno y en primavera. Los frutos de las diferentes recolecciones se denominan: “Primofiori” (recolección de septiembre a noviembre); “Limoni” (diciembre a mayo), “Bianchetti” (abril a junio) y “Verdelli” (de junio a septiembre).

El árbol es de vigor y tamaño normal y casi sin espinas; hojas de tamaño medio; muy productivo. Especialmente adaptado a los tratamientos de forzado.

2.4.1.4. “Verna”

Su origen es desconocido, probablemente procede de introducciones de limones italianos tipo “Monachello” en la huerta de Murcia.

Es la segunda variedad en importancia en España y la quinta del mundo después de “Eureka”, “Lisbon”, “Femminello” y “Fino”. También se cultiva en Argelia y Marruecos. Es reflorecente, con mayor o menor intensidad según la climatología del lugar donde se encuentra y las técnicas culturales. La floración principal que da lugar a los frutos llamados de “cosecha” (Foto 3), es muy dilatada, pues se extiende desde marzo a mayo, dependiendo de la climatología, localización y estado fisiológico de los árboles. El inicio de la floración, que se produce en el mes de marzo es muy lento, debido a que las temperaturas aún bajas de dicha época retrasan la evolución de los botones florales. Con el aumento de la temperatura de abril-mayo, dicha evolución es más rápida, dándose entonces el periodo de máxima floración. En cualquiera de los casos, desde la aparición de las primeras flores hasta las últimas pueden transcurrir de uno a dos meses, por lo que el desarrollo de los frutos a que dan origen unas y otras es muy desigual. Los frutos de “cosecha” se recolectan de forma escalonada iniciándose ésta en febrero y finalizando en julio.



Foto 3. Limón “Verna”.

En agosto-septiembre tiene lugar otra floración, cuyos frutos de denominan “rodrejos” y se recolectan en el verano del año siguiente. Dichos frutos tienen la piel más fina y más lisa que las de “cosecha”, son más redondeados y tienen una coloración verde-pálida. Esta segunda floración se puede inducir mediante la técnica del forzado.

Los frutos llamados “segundos” o “sanjuaneros”, proceden de una floración que aparece entre la primavera y la de verano. Son más rugosos y tienen poca conservación en el árbol, siendo poco estimados en el mercado.

Es relativamente frecuente en esta variedad la aparición de un elevado número de flores con aborto del pistilo o incompletas (flores estaminadas). Parece que este fenómeno está ligado a caracteres genéticos, o se debe a complejas causas fisiológicas que derivan en la estaminación de la flor. Entre dichas causas sobresale la competencia nutritiva entre yemas y flores en la fase de evolución y formación de los órganos sexuales. Acciones concomitantes serían los factores climáticos, que estimulando la planta a una floración simultánea, provocarían un aumento de la alteración.

Las hojas son agudas en el ápice y de menor tamaño que en el “Fino”. Los frutos son de forma oval, alargados, con cuello en la base, mamelón apical grande, alargado y puntiagudo, con o sin cerco areolar. El tamaño de los frutos es variable dependiendo de la zona, climatología y cultivo. El número medio de gajos es de 8 a 9. El color de los frutos es amarillo intenso en la madurez. La finura de la piel depende de los factores ambientales y de la cantidad de cosecha. La corteza es muy adherente, el eje central mediano y sólido, la pulpa es jugosa y la acidez poco elevada. El número de semillas es escaso. El fruto tiene gran resistencia al transporte y posibilidad de conservación en el árbol durante mucho tiempo.

El árbol es vigoroso, grande y productivo, con pocas espinas y de menor tamaño que en la variedad “Fino”. Su reflorescencia natural posibilita la obtención de cosechas en verano cuando la oferta de limones es muy limitada.

Injertado sobre naranjo amargo presenta una hipertrofia en la variedad a nivel de injerto (miriñaque) (Foto 5 A) que hace que se acorte la vida productiva. El acusado escalonamiento de la floración favorece los ataques del microlepidóptero *Prays citri* Mill., cuyas larvas destruyen los capullos florales, flores y frutos pequeños, ocasionando mermas de cosecha. El árbol es exigente en cuidados de cultivo, siendo precisas podas mas frecuentes que en la variedad “Fino”.

2.4.1.5. “Fino”

Probablemente deriva de limones tipo “Comunes” procedentes de la Vega Alta del Segura.

Es la primera variedad en importancia en España. Florece con intensidad una sola vez al año, normalmente entre la primera decena de abril y primeros de mayo. Vemos pues que se inicia la floración después que la del limonero “Verna” y durante un periodo más reducido. Aunque también existe una segunda floración de verano (“redrojos”), ésta es muy escasa. Los frutos de esta floración son mucho más gruesos que los de cosecha normal.

La recolección de frutos de “cosecha” (Foto 4) se inicia a primeros de octubre y se prolonga hasta el mes de febrero. Los primeros frutos alcanzan altas cotizaciones en los mercados internacionales debido a la falta de producción en estas fechas en los países competidores, de ahí el interés de obtener producciones precoces de esta variedad. Debido a tener una floración mas corta que la variedad “Verna” es menos propensa a los ataques de *Prays citri* Mill. Las plantaciones en general no presentan problemas de producción.



Foto 4. Limón “Fino”.



Foto 5. Miriñaque característico de limón “Verna” (A) y “Fino” (B), injertados sobre naranjo amargo.

Las hojas son más largas y anchas que las del limonero “Verna”. Los frutos están mejor conformados en general que los del “Verna”. Tienen la piel más lisa y fina. Su forma varía de esférica a ovalada (alargada) y su mamelón es puntiagudo y pequeño. En la inserción del fruto al pedúnculo, la base no presenta cuello. El tamaño del fruto es mediano. La corteza es delgada. El número de gajos varía de 8 a 12 y sus paredes son muy delgadas. La pulpa, de color amarillo pálido es muy jugosa. La acidez del zumo es muy elevada. Tiene mayor número de semillas que el “Verna”. Debido a su alto contenido en zumo y elevada acidez, esta variedad es muy apreciada para la industria de los derivados de agrios. El fruto tiene menor conservación en el árbol que el “Verna” y es menos resistente al transporte, lo que ha motivado una menor extensión de cultivo que el “Verna”. Sin embargo, la modernización de los sistemas frigoríficos, manipulación y transporte está haciendo que esta variedad tenga cada vez mayor demanda en el mercado, por lo que su superficie cultivada está teniendo un continuo aumento.

El árbol es de mediano a grande, algo más vigoroso que el “Verna”. Muy propenso a la producción de brotes fuertes con espinas robustas y muy productivo. Aunque es más sensible al frío que el “Verna”, se recupera más rápidamente del daño de heladas. En general es un árbol muy rústico que resiste la humedad y la clorosis más que el “Verna”. Injertado sobre naranjo amargo no presenta problemas de formación de miriñaque (Foto 5 B).

2.4.1.6. “Génova”

“Genoa” o “Génova”, es una variedad californiana muy difícil de distinguir de “Eureka”, muy cultivada en Argentina. Fue introducida en California desde Génova en 1875 por José Rubio, de Los Angeles.

2.4.2. Otras variedades de interés en distintas zonas citrícolas

“Real”, variedad actualmente en regresión que tiene cierto interés en la zona de Málaga. Su origen es desconocido. Los frutos de esta variedad son muy gruesos, oblongos, con relación diámetro/altura (D/H) oscilando entre 0,9 y 0,7. La corteza es muy gruesa y el número medio de gajos es de 10. El contenido en zumo es de un 32 por 100. La acidez es de tipo medio y el número medio de semillas es de unas 33 por fruto.

Las variedades “Comunes”, forman un grupo de características similares al “Fino” pero inferiores a éste en calidad de fruto.

“Monachello”, variedad italiana de fruto de tamaño medio a pequeño, parecido al “Verna”, con pocas semillas y bajo en acidez. La fructificación se realiza en las partes interiores del árbol. Moderadamente productivo pero muy inferior al “Femminello”. Resistente al “mal seco”. Tal vez sea un híbrido entre cidro y limonero.

“Interdonato”, variedad de origen italiano cultivada en Italia y Turquía, de fruto, oblongo-cilíndrico, con surco areolar pronunciado y mamelón puntiagudo. Pocas semillas. Corteza delgada, muy lisa y muy adherente. Número de gajos de 8 a 9, eje medio pequeño y sólido. Pulpa de color verde amarillento, contenido medio de zumo, pero algo amargo. Arbol vigoroso, a menudo espinoso, vegetación densa, hojas grandes y parecidas al cidro. Es resistente al “mal seco”. Esta variedad se originó en 1875 en una propiedad del Coronel Interdonato en Nizza, Sicilia. También posible híbrido entre cidro y limonero.

“Laphytos” variedad griega similar a “Lisbon”, que se recolecta de noviembre a marzo.

“Villafranca”, fue introducido en Florida por H.S.Sanford alrededor de 1875. Variedad de características intermedias entre “Lisbon” y “Eureka”.

2.5. PROGRAMAS DE SELECCIÓN CLONAL DE LIMONERO REALIZADOS EN EL MUNDO

El trabajo de selección en el limonero es más complicado que en el naranjo, ya que en la mayoría de los casos las diferencias varietales son muy escasas; siendo con frecuencia la variabilidad existente entre los distintos tipos de frutos de una misma variedad mayor que la que hay entre frutos de variedades distintas.

La detección de posibles mutaciones gemarias y la diferenciación de clones dentro de una misma variedad es un trabajo complejo que se dificulta por la influencia del medio ambiente.

Al realizar la selección en campo, la tipificación que se haga debe ser provisional, ya que las diferencias existentes pueden ser debidas a la influencia ambiental ó al estado sanitario. Hay que realizar previamente el saneamiento por alguna de las técnicas utilizadas actualmente y cultivar después

todos los clones individualizados y saneados en un mismo ambiente ecológico, sobre uno o dos patrones como máximo, con la finalidad de analizar sus características diferenciales, tipificando así el material obtenido. Cuando la diferenciación no es posible por métodos morfológicos o histológicos, hay que recurrir a caracteres bioquímicos, como son el análisis de aceites esenciales, flavonoides, proteínas ó recurrir a marcadores basados en el ADN.

Por último, hay que estudiar el comportamiento de los distintos clones en diferentes ecologías sobre los patrones elegidos, determinando el grado de plasticidad obtenido y al mismo tiempo los lugares más idóneos para su cultivo. Los criterios de selección son cada vez más exigentes, ya que las características que se desean mejorar van alcanzando niveles más altos. En líneas generales los principales aspectos a tener en cuenta en la selección son: rápida entrada en producción; ausencia de vecería; productividad; longevidad de la planta; conservación del fruto en árbol; recolección temprana o tardía; resistencia a enfermedades, vientos o bajas temperaturas; aspecto externo del fruto; espesor de la corteza; contenido en zumo; porcentaje de acidez y número de semillas.

En el mundo se han realizado importantes trabajos de selección clonal en limonero, fundamentalmente en dos países: Estados Unidos e Italia. En este último el principal criterio de selección utilizado ha sido la resistencia al “mal seco”

En Estados Unidos los trabajos de selección clonal se han realizado principalmente sobre las variedades “Lisbon” y “Eureka”, y en Italia sobre “Femminello”. A continuación reseñamos los principales clones seleccionados de estas variedades, con breves anotaciones en alguno de ellos.

2.5.1. Clones de “Eureka”

“Allen”, “Cascade”, “Cook”, “Meek”, “Wheatley” o “Thornton”, “Leding”, “Ross”, que es el clon más vigoroso, posiblemente porque no derive del “Eureka”, y “Corona Eureka” que parece ser una selección de “Villafranca”. Otros dos clones de “Eureka” son “Doro” y “Mordiconi”.

El único clon nucelar actualmente usado es el “Frost”, obtenido por el genetista H.B. Frost, de Riverside, California. Existen clones nucleares de las otras líneas pero no han sido utilizados hasta ahora.

Un clon nucelar de “Eureka” obtenido en Australia es el “Lambert Eureka”, muy similar al “Eureka”, aunque es más vigoroso y más productivo.

2.5.2. Clones de “Lisbon”

Los clones de “Lisbon” se diferencian más entre sí que los de “Eureka”, por caracteres como la compactación del ramaje, densidad de follaje, cantidad de espinas, árboles abiertos o densos, etc. A pesar de estas diferencias, todos los clones tienen en común dos características: su elevada producción y su vigor. Algunos de los clones difieren en la forma del fruto, lo que hace sospechar tengan un origen distinto al “Lisbon”. Los más importantes son: “Galligan”, probable selección de “Villafranca”, “Limoneira 8A”, “Monroe”, “Prior”, “Strong” y “Rosemberger”, que es un clon muy vigoroso, muy popular en California, con pocas espinas; el fruto es más corto que el “Lisbon” y tiene unas características intermedias entre “Lisbon” y “Villafranca”.

“Kaweah” y “Walker”, con menor interés.

Clones que fueron importantes en el pasado son: “Bradbury”, “Cavers”, “Deaver”, “Hall”, “Jameson”, “Leding”, “Price”, “Prospect” y “USDA”.

El clon nucelar más importante es el “Frost”, obtenido como el “Frost Eureka” por H.B. Frost.

2.5.3. Clones de “Femminello”

Se diferencian por su mayor o menor resistencia al “mal seco” y su mayor o menor capacidad de reflorescencia. Los más importantes son: “Ovale”, “Sfusato”, “Continella”, “Dosaco”, “Flor de naranjo”, “Santa Teresa” y “Siracusano”.

Los clones “46/212”, “46/6” y “46/206” son híbridos entre “Femminello” y “Monachello”. Se parecen en la forma al limón “Verna”, aunque tienen un número mayor de semillas. La acidez es más baja que en el “Femminello común”.

“Scandurra”, es un clon seleccionado en Catania por su resistencia al “mal seco”. No tiene semillas; gran contenido en zumo y acidez elevada.

2.6. PROGRAMA DE SELECCIÓN CLONAL DEL LIMONERO EN ESPAÑA

Se inició con unas prospecciones de material realizadas en los años 1973 y 1974 y se potenció a partir del año 1976 con la celebración de las primeras Jornadas sobre limonero.

En el Departamento de Hortofruticultura de Murcia perteneciente al entonces CRIDA 07 del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, se inició el programa de selección de nuestras variedades autóctonas “Fino” y “Verna”, que está dando positivos resultados.

Los criterios de selección que se siguieron se pueden resumir del siguiente modo:

Caracteres generales del árbol:

En limonero “Fino”:

- Precocidad
- Producción
- Estado vegetativo

En limonero “Verna”:

- Producción
- Estado vegetativo
- Amplio periodo de recolección
- Baja estaminación
- Buena afinidad de injerto con naranjo amargo

Calidad del fruto (en “Fino” y en “Verna”):

- Forma oval y no demasiado alargada
- Mamelón pequeño y poco pronunciado
- Corteza fina, lisa y rica en aceites esenciales
- Gajos muy adherentes entre sí, reduciendo al mínimo el espacio ocupado por el eje central.
- Elevado rendimiento en zumo (al menos superior al 30 %).
- Acidez no inferior a 60 g/l.
- Pocas semillas

Este programa de selección se escalonó en las siguientes fases:

Fase 1ª: Prospección en campo, eligiendo las zonas mas antiguas de cultivo donde es presumible encontrar la mayor variabilidad genética.

Fase 2ª: Saneamiento y seguimiento varietal de los clones seleccionados en campo, incluyéndolos en el programa de mejora sanitaria de variedades de agrios.

Fase 3ª: Establecimiento de parcelas experimentales para comparación de los clones seleccionados y saneados en distintas áreas ecológicas.

Fase 4ª: Tipificación varietal de los clones seleccionados.

Del material estudiado, se seleccionaron varios clones de “Fino” y “Verna”, algunos de los cuales fueron saneados mediante la técnica de microinjerto y se iniciaron los estudios para su valoración agronómica.

Para concluir, daremos una breve relación de estos clones seleccionados, cuyo comportamiento en campo ha sido posteriormente realizado.

Las selecciones realizadas inicialmente dentro del tipo “Fino” fueron:

“Tana 46”, “Tana 47” y “Tana 48”, árboles productivos, con fruto temprano, de buena calidad. El último de ellos es el más vigoroso de los tres. Actualmente denominados “Fino 46”, “Fino 47” y “Fino 48”.

“Albudeite 49”, de iguales características a los anteriores. Piel muy fina y con pocas semillas (actualmente “Fino 49”).

“Santomera 77”, muy precoz, con fruto alargado y muy productivo (actualmente “Fino 77”).

“Guadalobón 94” y “Abejeras 95”, sin semillas ni espinas, ambos muy precoces (“Fino 94” y “Fino 95”).

“Chaparro”, mutación detectada recientemente en árbol de “Fino 49”. Árbol muy productivo, de recolección temprana y muy espinoso.

Las selecciones realizadas inicialmente dentro del tipo “Verna” fueron:

Tipo “Verna”, están “Tana 50” y “Tana 51” (“Verna 50” y “Verna 51”).

“Agridulce 62” y “Agridulce 70, este último con posible afinidad con naranjo amargo, aunque de poca calidad y poco productivo (son los “Verna 62” y “Verna 70”).

“Ferre 96”, árbol muy espinoso, muy productivo, y con escasos problemas de miriñaque. Fruto con muy pocas semillas.

3. PATRONES DE LIMONERO

3.1. EL INJERTO

Cuando dos plantas se unen por injerto se crea una nueva planta, en la que cada uno de sus componentes conserva sus características propias coadyuvando a la vida del conjunto; se establece una especie de simbiosis en la que cada una de las partes integrantes influye más o menos en las funciones y desarrollo de la otra; esta influencia del patrón sobre el injerto, como la del injerto sobre el patrón, es de características análogas a las reacciones que provocan las condiciones del medio ambiente, y afectan normalmente con variaciones de carácter cuantitativo a las siguientes características: cambio de tamaño y forma, longevidad, intensidad de coloración, etc.

Si bien todas las especies del género *Citrus* pueden injertarse unas en otras con resultados satisfactorios desde un punto de vista botánico, no ocurre lo mismo desde un punto de vista práctico o comercial.

La selección de los diversos patrones, para conseguir la mejor adaptación a las características particulares de cada una de las zonas citrícolas del mundo ha costado gran esfuerzo y a veces grandes pérdidas económicas. Así mientras en Japón se emplea principalmente el *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., en Brasil se emplea la Lima Rangpur (*C. limonia* Osbeck), en Sudáfrica el limón rugoso (*C. jambhiri* Lush), etc.

3.1.1. Historia de los patrones en España

La utilización de patrones para el cultivo de los agrios se remonta en nuestro país, al menos, a la segunda mitad del siglo XVIII. En aquel tiempo, los patrones utilizados eran el cidro o poncilero y el limonero y se multiplicaban mediante enraizamiento de estacas. También se cultivaban numerosos naranjos procedentes de semillas sin injertar. Este tipo de árboles, resultan

muy sensibles a hongos del género *Phytophthora*, que provocan la podredumbre de la corteza, generalmente en la base del tronco, con abundantes exudaciones gomosas. Por ello, conforme se fue extendiendo el cultivo, se hizo necesario buscar otros patrones con mayor resistencia a *Phytophthora* sp. Las excelentes cualidades del naranjo amargo (*C. aurantium* L.), solucionaron los problemas planteados entonces, y explican la difusión masiva que llegó a adquirir, tanto en nuestro país como en otras zonas productoras, llegando a alcanzar el 95% en la cuenca mediterránea.

Cuando se detectó la tristeza en España hacia 1957, más del 95% de las plantaciones de agrios estaban injertadas sobre este patrón. En algunas áreas muy concretas se utilizaban también como patrones el mandarino común (*C. reticulata* Blanco) y el naranjo dulce (*C. sinensis* (L.) Osbeck), ambos tolerantes a la tristeza. Actualmente, los patrones tolerantes más utilizados en nuestro país, son los citrange Troyer y Carrizo [(*C. sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.)) y el mandarino Cleopatra (*C. reshni* Hort. ex Tan.) para naranjo, mandarino y pomelo (*C. paradisi* Macf.). El *C. macrophylla* Wester y el naranjo amargo son sensibles a tristeza pero la combinación con limonero si es tolerante y por ello se emplean en este cultivo.

Normalmente el cambio de patrón en un área concreta es un proceso lento. No obstante, determinadas circunstancias pueden forzar a que se realice este cambio con mayor rapidez, como fue el caso de Brasil, donde se utilizaba masivamente el naranjo amargo como patrón y la rápida difusión de la tristeza llevó a su abandono y sustitución por otros patrones tolerantes a la dicha enfermedad.

3.1.2. Interacciones entre el injerto y el patrón de los agrios

Varias son las razones que justifican la multiplicación por injerto de las variedades comerciales de agrios, pudiéndose destacar, entre otras, las siguientes:

- a) Se puede aplicar a todas las variedades, de forma fácil y económica, con las máximas garantías de autenticidad varietal.
- b) Seleccionando adecuadamente el patrón se puede cultivar cualquier variedad en condiciones edafológicas adversas (altos niveles de caliza, de salinidad, etc.).
- c) Mediante la utilización de un patrón adecuado se pueden obtener árboles con una mayor resistencia a determinados patógenos (*Phytophthora* sp., *Armillaria mellea*, etc.).

3.1.3. Influencia del patrón sobre la variedad injertada

Las influencias que ejerce el patrón sobre la variedad injertada son numerosas y bien conocidas en muchos casos. Precisamente, la valoración agronómica de un patrón se basa, en gran parte, en las características que induce sobre las diferentes variedades injertadas.

Los principales efectos del patrón sobre aspectos vegetativos y productivos de la variedad son: vigor, productividad y calidad de la fruta, así como el contenido en sólidos disueltos y la acidez del zumo. El patrón también influye sobre la variedad injertada en otros muchos aspectos, tales como la composición mineral de las hojas y frutos, espesor de corteza del fruto, etc.

3.1.3.1. Vigor

Los patrones de agrios conocidos actualmente en el mundo poseen diferencias claras de vigor, aunque no tan notables como las que se presentan en otras especies frutales (peral o manzano, por ejemplo).

Como patrones muy vigorosos, cabe destacar el limón rugoso, el *C. volkameriana* Pasquale y el *C. macrophylla*; como bastante vigorosos el naranjo dulce, la lima Rangpur, la limeta dulce de Palestina (*C. limettioides* Tan) y el citrumelo Swingle CPB 4475 (*C. paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.); como portainjertos estándar: el naranjo amargo, los citrange Troyer y Carrizo y el mandarino Cleopatra; poco vigorosos los citranges Rusk y Cunningham y como enanizantes el más difundido es el “Flying dragon” (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.).

Actualmente se han obtenido en el IVIA de Valencia una serie de portainjertos enanizantes (Forner-Alcaide nº 5, 7, 18 y 24) que podrían tener interés en limonero para reducir marcos de plantación. Los resultados en naranjas y clementinas son en algunos casos muy buenos, pero no hay información respecto a su utilización en limonero.

3.1.3.2. Productividad

La densidad de producción, es decir, la producción por unidad de volumen de copa de una variedad, está condicionada sensiblemente por el patrón.

El *C. macrophylla* y el *C. volkameriana*, inducen elevadas producciones. Así mismo tienen una rápida entrada en producción, y marcada precocidad de sus frutos, aspectos ambos de gran importancia económica.

3.1.3.3. Calidad de fruta

Los principales parámetros que determinan la calidad de la fruta, como son el contenido en zumo, acidez y sólidos disueltos, dependen además de la variedad ó el clon, del patrón utilizado. Así, el *P. trifoliata* y sus híbridos suelen inducir calidades óptimas; mientras que el limón rugoso y el *C. macrophylla* pueden rebajar dichas calidades hasta el extremo de que, en muchos casos, los frutos producidos quedan insípidos.

3.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PRINCIPALES PORTAINJERTOS

Los portainjertos de limonero usados en el mundo son muy variados en función de las condiciones edafoclimáticas de la zona de cultivo. A continuación haremos una breve descripción de los más utilizados.

3.2.1. Naranja amargo

Durante muchos años el naranja amargo ha sido un patrón ampliamente utilizado en numerosos países, y es todavía la especie que domina en la Cuenca Mediterránea y en algunos otros países como Cuba. Tiene poca tendencia a la clorosis férrica.

La masiva utilización de este patrón se debe a las buenas características agronómicas que presenta, tales como buena resistencia a la gomosis, muy compatible con las diversas especies comerciales, buena productividad y buena calidad de la fruta. De fácil multiplicación en vivero y bastante homogeneidad de las plantas jóvenes a pesar del grado reducido de poliembrionía de sus semillas. En la actualidad ha decaído su utilización en las nuevas plantaciones debido a su gran sensibilidad a la tristeza excepto en combinación con el limonero.

3.2.2. *Citrus macrophylla*

Presenta buena afinidad con limonero, induce rápida entrada en producción, es muy productivo y da lugar a frutos de gran calibre, por lo que se puede adelantar la recolección en el caso de limonero “Fino”, pero es un inconveniente en limonero “Verna”. Su combinación con limonero es tolerante a tristeza, pero puede ser sensible si el patrón emite rebrotes o sierpes ó si el limonero se reinjerta de naranjo, mandarino o pomelo. En algunos clones de limonero “Eureka” y “Lisbon” injertados en *C. macrophylla* se desarrolla un desorden denominado necrosis de vasos en el floema del limonero; esta necrosis ha sido detectada también en España en limonero “Lisbon” pero no en “Eureka”. Aguanta muy bien la caliza y la salinidad pero es sensible al frío y poco resistente a la asfixia radicular. Excelente para climas cálidos y secos. Su eficiencia productiva es muy grande.

3.2.3. Citranges Troyer y Carrizo

El citrange Troyer y el citrange Carrizo fueron obtenidos en 1909 por E. M. Savage en Riverside (California) y son difíciles de distinguir. El citrange Troyer ha sido el patrón más ampliamente empleado en California, aunque en la actualidad está siendo sustituido por el Carrizo y otros patrones.

Son tolerantes a la tristeza, psoriasis, xyloporosis y a “woody gall”, también tolerantes a *Phytophthora* sp., pero sensibles a exocortis y a *Armillaria mellea*, así como a contenidos altos de caliza en el suelo (10-12% el Troyer frente al 16-18% del Carrizo) y a la salinidad. Estos factores han condicionado el uso de estos patrones en España.

Poseen buena compatibilidad con las variedades de naranjo, mandarino y pomelo cultivadas en España; el limonero “Lisbon” tiene buena afinidad mientras que “Eureka” presenta problemas. La variedad “Fino” no muestra un buen comportamiento sobre estos patrones. En cuanto al fruto, estos patrones confieren una buena calidad, maduración adelantada, y en general buena productividad y tamaño.

3.2.4. Mandarino Cleopatra

Es tolerante a tristeza, exocortis y psoriasis escamosa. Aunque su tolerancia a xyloporosis ha sido cuestionada en ocasiones, los estudios realizados en plantaciones españolas lo revelan como poco tolerante a esta virosis. Es

menos resistente a *Phytophthora* spp. que el citrange Troyer, pero se recupera bien después de los tratamientos aunque otros autores la dan como susceptible. Muy resistente a la salinidad, presentando también buena resistencia a la clorosis férrica y por el contrario es sensible a la asfixia radicular. En general, el lento crecimiento junto con un comportamiento irregular e imprevisible en vivero, en numerosos casos da lugar a un desarrollo deficiente, sobre todo durante los primeros años de vida de la planta.

Suele ir bien en terrenos de tipo franco o sueltos. Suele dar buena calidad cuando se le injerta naranjo dulce, mandarino o pomelo, dando también buena productividad a partir del 6º o 7º año, pero siendo el tamaño de los frutos algo inferior al producido sobre otros patrones. La productividad del limonero sobre este patrón es baja y los frutos no son de buena calidad.

3.2.5. Limón rugoso

Es tolerante a tristeza, exocortis y xyloporosis. Por el contrario es muy sensible a *Phytophthora* sp. y sensible al hongo *Armillaria mellea* y a nematodos. Muy sensible al “blight”. Presenta buena resistencia a la caliza y una resistencia media a la salinidad, siendo sensible a la asfixia radicular. Es sensible también al frío.

Patrón muy vigoroso, adecuado para naranjo dulce, mandarino, pomelo y limonero, especies en las que induce elevadas producciones. Sin embargo, la calidad de los frutos suele ser baja, reduciendo en ellos la cantidad de zumo, así como la de sólidos disueltos y acidez. Su comportamiento en vivero es excelente, dando lugar a plantas uniformes y de gran vigor.

Ampliamente utilizado en Florida hasta la década de los 70 en que apareció el “blight”; se utiliza para limonero Eureka en Sudáfrica y en Australia.

3.2.6. Citrumelo

Es un híbrido obtenido en 1907 por W. S. Swingle polinizando flores de pomelo Duncan con polen de *Poncirus trifoliata*. Uno de los más conocidos es el citrumelo Swingle CPB 4475.

Patrón muy vigoroso, tolerante a tristeza, exocortis y xyloporosis. Resistente a *Phytophthora* spp. y a nemátodos, presenta una resistencia moderada al frío y a la salinidad.

Más sensible a la caliza que el citrange Troyer. Aunque las referencias internacionales lo dan como sensible a la asfixia radicular, en España se le considera como muy resistente. Su comportamiento en vivero es excelente, dando lugar a plantas uniformes de buen vigor, buen diámetro de tronco y poca tendencia a ramificar en la base.

La productividad y calidad del fruto son variables con la especie injertada: excelentes con injertos de pomelo, normales a bajos con naranjos y mandarinos. En limonero y lima se le considera poco productivo. La madurez interna y externa de los frutos, se alcanza más tarde que con otros patrones.

3.2.7. *Citrus volkameriana*

Tolerante a tristeza y a exocortis, pero sensible a “vein enation”, “Woody gall”. Se ha comprobado su sensibilidad a xyloporosis en Brasil. En Italia los injertos de limonero sobre este patrón se han mostrado más susceptible al “mal seco” que en naranjo amargo.

De rápida entrada en producción, excelente vigor y productividad, es muy utilizado en Estados Unidos. Sus principales inconvenientes residen en una menor calidad de fruta y una moderada sensibilidad a *Phytophthora* sp.

Sensible al frío. Su adaptación a suelos calizos es satisfactoria. Su producción en limonero es similar a la del naranjo amargo e inferior a la del *C. macrophylla*. En Turquía se muestra muy productivo y en Sudáfrica injertado sobre limón Eureka se muestra muy productivo.

3.3. PATRONES DE LIMONERO UTILIZADOS EN ESPAÑA

En España los dos patrones que casi exclusivamente se utilizan para limonero son el naranjo amargo y el *C. macrophylla*, y en muy pequeña cantidad y fundamentalmente para usos ornamentales, el *C. volkameriana*.

El número de plantones de limonero producidos por los Viveros Autorizados de la Región de Murcia en los últimos 10 años supera el millón y medio de plantas, de los que casi la totalidad de ellos están en pie de *C. macrophylla*.

En las Tablas 3.1 y 3.2 se resumen las características de los principales portainjertos de limonero y su influencia sobre el fruto.

TABLA 3.1.
**CARACTERÍSTICAS DE LOS PRINCIPALES PORTAINJERTOS
DEL LIMONERO UTILIZADOS EN EL MUNDO**
(ORTÍZ Y GARCÍA LIDÓN, 1982) (1)

PORTAINJERTO							
	Naranja amargo	<i>Citrus macro- phylla</i>	Citranges Troyer y Carrizo	Manda- rino Cleo- patra	Limo- nero rugoso	Citru- melo	<i>Citrus Volkame- riana</i>
Tristeza	S	S	T	T	T	T	T
exocortis	T	T	S	T	T	T	T
Xiloporosis	T	S	T	T	T	T	S
Vein enation	T	?	T	T	S	-	-
<i>Phytophthora</i> (2)	R	R	R	S	S	R	N
<i>Armillaria</i>	R	i	S	S	S	-	-
Nematodos	S	S	S	S	S	R	S
Tolerancias:							
A la sal	N	B	M	B	N	N	N
Al frío	B	M (3)	B	B	M	N	S
Al encharcamiento	B	M	M	M	M	R	R
Longevidad	N	N	N	M	B	-	-

(1) S= Susceptible; R= resistente; T= tolerante; N= normal; B = buena; M = mala.

(2) R o S puede ser más o menos intensa según especies y razas.

(3) Alta recuperación en árboles adultos.

TABLA 3.2.
INFLUENCIA DEL PORTAINJERTO SOBRE EL FRUTO DEL LIMONERO
(ORTIZ Y GARCÍA LIDÓN, 1982).

PORTAINJERTO						
	Naranja amargo	<i>Citrus macrophylla</i> y Carrizo	Citranges Troyer	Mandarino Cleopatra	Limonero rugoso	Citrumelo
Productividad (1)	++	+++	++	+	++ (2)	+
Tamaño del fruto (1)	++	+++	++	+	++	++
Calidad del fruto (1)	++	++	+	+	+	++

(1) Índices de estimación: + = bajo; ++ = medio; +++ = alto.

(2) Desciende a partir de los 10 ó 12 años.

4. FRUCTIFICACIÓN

4.1. FLORACIÓN Y DESARROLLO DEL FRUTO

En general se acepta que la época de reposo vegetativo (diciembre-enero) es el periodo de mayor sensibilidad que tienen los agrios a los procesos de inducción floral. La floración y el desarrollo del fruto constituyen procesos cruciales en la determinación de la cuantía y calidad de la cosecha.

Las condiciones ambientales no sólo determinan la época de brotación de los cítricos sino que son también responsables, en gran medida, de la intensidad, época, distribución y duración de la floración. Es más, aspectos tales como las bajas temperaturas, déficit hídricos o fotoperiodos cortos son requisitos indispensables para que ésta tenga lugar. Por otra parte las altas temperaturas invernales reducen la floración en climas templados. Se inicia en la antesis (momento en que las flores abren sus pétalos) y finaliza durante la "caída de junio"; tiene una duración aproximada de 50 días. Durante la antesis, la flor detiene su crecimiento (dos o tres días), la división celular se detiene, los pétalos se abren y tiene lugar la polinización (transporte del polen hasta el estigma) y la fecundación. Si el proceso se desarrolla con éxito, el ovario de la flor se transforma en fruto y se inicia el crecimiento y el desarrollo del mismo. La polinización y fecundación estimulan la síntesis de hormonas vegetales (giberelinas, citoquininas y auxinas) que son los factores que activan en el crecimiento celular.

La intensidad y distribución de la floración, determinan, a través de fenómenos de competencia de metabolitos, el cuajado de las flores. Este proceso, agronómicamente contemplado, se prolonga en el tiempo, de modo que hasta que el fruto no tiene asegurada su persistencia en el árbol está sujeto a dicha competencia que es la que regula la abscisión de los frutos y, por tanto, su desarrollo inicial. Es por ello que resulta frecuente hablar de "cuajado inicial", concepto que responde al proceso de cuajado en sí (paso del

ovario de la flor a fruto en desarrollo) y a su control, y de "cuajado final", que indica el número de frutos cosechados y es determinado por factores diversos, temporalmente separados, y controlados por mecanismos diferentes. La cuantía y la calidad de la cosecha son determinadas pues, durante las primeras fases de desarrollo del fruto.

El desarrollo del fruto sigue una curva sigmoideal caracterizada por tres estados relativamente bien diferenciados. El estado I, es un periodo de crecimiento lento de tipo exponencial, en el que se produce la división celular que provoca un incremento del espesor del pericarpo.

El pericarpo es la porción del fruto exterior a los lóculos que está formado por tres regiones: el exocarpo o flavedo, que es el más extremo y constituye la parte visible de la corteza, formado por células epidérmicas de color verde cuando el fruto es inmaduro y naranja, rojo o amarillo, según la especie, en la madurez; el endocarpo o parte más interna que alcanza a las membranas loculares y está constituido por células parenquimáticas; y el mesocarpo o albedo, formado por un tejido esponjoso de células parenquimáticas situadas entre las dos anteriores. El exocarpo y el mesocarpo constituyen la corteza del fruto propiamente dicha.

Durante el estado I también se produce la formación de las vesículas, o sacos de zumo, que están constituidas por una capa de células epidérmicas, alargadas en la dirección del eje principal de la vesícula, que engloban células con grandes vacuolas en las que se aloja el zumo. Las vesículas inician su formación durante la apertura de pétalos y la prolongan hasta la caída del estilo, aunque en algunas variedades el estilo es persistente. Su origen es el endocarpo cuyas células subepidérmicas sufren, en determinados puntos, una división periclinal, consecuencia de la cual es la aparición de una pequeña cúpula meristemática hacia el interior del lóculo, cuyas células se dividen posteriormente en todas las direcciones pero manteniendo su carácter meristemático. Las células subepidérmicas también se dividen, pero sus células hijas pierden el carácter meristemático y aumentan de tamaño. El proceso de división continúa en las células del extremo distal del meristemo de la vesícula en formación, mientras que las del extremo proximal se alargan y se diferencian en células del filamento vesicular. Los filamentos vesiculares están formados por una capa de células epidérmicas externamente cutinizadas, que envuelven a unas pocas células parenquimáticas.

Mientras dura la formación de los filamentos sólo se observan divisiones anticlinales en la epidermis de la vesícula pero cuando se completa, la vesícula sigue creciendo como consecuencia de la actividad meristemática, que todavía perdura, y da lugar a la formación de una gruesa masa meristemática que acaba convirtiéndose en el cuerpo de la vesícula. Las células de esta masa inician entonces un aumento de tamaño que comienza a partir de las situadas en el centro de la vesícula y progresa hacia las más externas, alcanzando todas ellas. Las vesículas formadas, llenan por completo los lóculos, alcanzando incluso, las que tienen un filamento más largo, el eje central del fruto. El estado II del desarrollo del fruto se ha iniciado.

El estado II tiene una duración de varios meses, según la especie o variedad. Las células que se dividen en la fase anterior comienzan a crecer individualmente, por alargamiento o por elongación celular. Durante este estado el fruto absorbe gran cantidad de agua y alcanza su tamaño definitivo, presentando un crecimiento lineal con el tiempo. El final del estado II viene marcado por el cambio de color del flavedo.

El estado III del desarrollo del fruto comprende todos los cambios asociados a la maduración y se caracteriza por su reducida tasa de crecimiento, por la parada de la elongación de las células. Durante esta fase no existe crecimiento y solamente se producen diversas transformaciones bioquímicas que propician la maduración tanto interna como externa. El contenido en sólidos solubles, sobre todo azúcares y compuestos nitrogenados, aumenta, mientras que la acidez disminuye progresivamente como consecuencia, fundamentalmente, de un proceso de dilución.

En las zonas de cultivo de limonero de nuestro país, con clima subtropical mediterráneo, se dan en el árbol varias floraciones escalonadas, de mayor o menor intensidad, que dan origen a distintas cosechas. Las diferentes variedades se comportan de modo distinto respecto a la floración, siendo “Eureka”, “Ferminello” y “Verna” marcadamente reflorescentes, mientras que “Lisbon”, “Fino” y “Monachello” concentran su floración fundamentalmente en un solo periodo del año.

Dentro de una misma floración, se comportan también de modo diverso las distintas variedades, como sucede en “Verna” cuya floración principal tiene una floración bastante más dilatada que la de “Fino”, en la que la mayor parte de las flores se abren en un margen muy reducido de días.

4.2. RELACIONES INTENSIDAD DE FLORACIÓN-PRODUCTIVIDAD. LOS FENÓMENOS DE COMPETENCIA DE FRUTOS

En aquellas variedades de naranjo dulce, mandarino, limonero y pomelo en las que la floración no está relacionada con la producción y especialmente en aquellas en las que lo está inversamente, la mayor parte de las estructuras reproductivas se desprenden durante su desarrollo inicial. El número de frutos finalmente cosechados no suelen superar el 5% de las flores inicialmente formadas, siendo valores de 0'5%, y aún inferiores, normales en algunos casos.

En limonero tipo "Fino" y "Eureka" el cuaje en árboles jóvenes puede superar el 10%, pero a medida que pasan los años el número de flores aumenta, así como la producción, pero el porcentaje de cuaje disminuye.

Las diferencias en intensidad de floración no sólo se reflejan en la cantidad de flores que caen, sino que cuanto mayor es la intensidad en la floración, la caída ésta se produce en estados de desarrollo más precoces.

4.3. FACTORES QUE AFECTAN AL CUAJADO

El cuajado en el proceso de desarrollo que determina la conversión de una flor (ovario) en un frutito que crecerá hasta la madurez y es el factor central en la determinación de la cosecha en los agrios, que depende del número de frutos y de su peso individual.

No todas las especies y variedades cultivadas se comportan de modo idéntico en lo que al cuajado respecta. Las variedades con semillas cuajan con facilidad e incluso en ocasiones, en exceso; su problema de productividad tiene lugar en los años en que la floración es escasa, consecuencia de una cosecha anterior elevada (vecería), en los que a pesar del elevado porcentaje de cuajado (próximo en ocasiones al 100%) el número de frutos es insuficiente para alcanzar una buena cosecha. El problema de la alternancia ha sido detectado también en algunas variedades sin semillas. En éstas se ha establecido una relación positiva (n° de flores/ n° de frutos) para valores entre 0 y 20 flores/100 nudos, y aunque para este intervalo el número de frutos finalmente cosechados aumenta con la floración, el porcentaje de cuajado desciende progresivamente. Superado dicho nivel ambos parámetros no tienen relación.

Sin embargo, en la mayor parte de las variedades sin semillas, la floración es suficiente para alcanzar una cosecha adecuada, pero la caída, de flores previa a su antesis o tras ella (caída de junio) es tan elevada que el número de frutos finalmente cosechados no supera el 10% de las flores formadas e incluso alcanza valores tan bajos como el 0'1%.

La caída de frutos se da en todas las especies cultivadas pero no es uniforme en el tiempo. Así se ha detectado una caída de flores (caída de floración), durante o inmediatamente después de la antesis que afecta a yemas, capullos en desarrollo y flores, otra cuando se inicia el desarrollo del fruto (caída de postfloración), que tiene lugar una ó dos semanas después de la antesis y afecta a los ovarios en el estado de “caída de pétalos”, cuando los ovarios de las flores ya no tienen pétalos y están transformándose en frutos y por último una caída final de frutos. Esta tercera época de abscisión de frutos se da 40-50 días después de la antesis y se conoce como “caída de junio”. Los frutos que no se desprenden durante la caída de junio prácticamente todos llegan a madurar. La caída de frutos maduros, si bien determina también la cosecha final, no tiene relación con el proceso de cuajado.

Además de estos tres periodos de abscisión, también han sido detectados en los agrios, en los que, adicionalmente, aparece una caída pre-antesis (capullos) tanto más notable cuanto mayor es la intensidad de floración. Esta abscisión arrastra al pedúnculo y al cáliz. Las caídas de capullos, de flores y de frutos en desarrollo se hallan solapadas en el tiempo; su inicio y duración varían con los años y su intensidad global determina el porcentaje de frutos cuajados. En árboles jóvenes limonero “Fino 49” y “Eureka” la caída de junio puede llegar a ser del orden del 30% de las flores totales formadas.

La comparación de árboles con distintos niveles de floración ha demostrado que para floraciones poco abundantes la mayor parte de los órganos reproductivos se desprenden en forma de frutos en desarrollo (caída de junio), pero a medida que aumenta la floración, la caída de órganos se anticipa y es más intensa, llegando a ser la caída de capullos la más importante porcentualmente. Por tanto, el porcentaje de flores que cuajan (cuajado inicial) disminuye con el aumento de la floración, a pesar de lo cual el número de frutos cosechados (cuajado final) no es alterado e incluso puede aumentar. La cosecha final en estos casos no depende de la intensidad de floración. Solamente para floraciones excesivas (del orden de 125.000 flores/árbol o más) se ha detectado una abscisión de capullos y flores de tal importancia

que puede afectar a la cosecha. En estas condiciones no sólo el cuajado inicial es bajo, sino también el cuajado final y el número de frutos cosechados está inversamente relacionado con el número de flores formadas.

En estos casos, por tanto, no es el número de flores lo que limita la cosecha sino su capacidad de cuajado y de persistencia en la planta, lo que depende críticamente de la velocidad de crecimiento del fruto es decir, existe una relación inversa entre el tamaño del ovario en desarrollo la probabilidad de abscisión. Todos aquellos factores que estimulan el crecimiento inicial del ovario contribuyen, por tanto, a mejorar el cuajado.

La floración en agrios se distribuye en los diferentes tipos de brotes: con hojas (brotes mixtos) y sin ellas. La presencia de las hojas se muestra como factor importante del cuajado, y así la defoliación de brotes mixtos reduce en un 75% el porcentaje de cuajado en éstos cuando se comparan con brotes sin defoliar.

La importancia de las hojas en este proceso se basa en su capacidad para sintetizar y exportar metabolitos al fruto en desarrollo. Mientras tiene lugar el desarrollo del brote sus hojas actúan como sumidero y reclaman metabolitos de otras partes de la planta, pero a medida que éstas maduran se convierten en órganos de exportación y son capaces de conferir al brote un cierto grado de autosuficiencia en lo que al desarrollo del fruto respecta, en clara ventaja frente a los situados en brotes sin hojas. Ello explica la persistencia en el árbol de los frutos situados en mejor posición, ya que un déficit en fotoasimilados durante el desarrollo inicial del fruto provoca su abscisión.

El papel de las hojas no sólo se centra en su capacidad de proveer de azúcares al fruto en desarrollo. En las inflorescencias con hojas se ha detectado un mayor contenido en giberelinas endógenas que en las que no poseen hojas y es mayor el nivel de citoquininas encontrado en los frutos procedentes de frutos mixtos.

Esta influencia de las hojas sobre el cuajado del fruto exige considerar a éste como sumidero de carbohidratos y fitorreguladores. Aquellos frutos que por su posición o tipo de brote en el que se presentan cuajan con mayor facilidad, poseen una mayor capacidad de movilización de nutrientes lo que relaciona aspectos nutritivos y minerales en el proceso de cuajado.

4.4. FACTORES QUE DETERMINAN EL TAMAÑO FINAL DEL FRUTO

El tamaño final alcanzado por el fruto está regulado por un conjunto de factores de índole e incidencia variables. La imposibilidad de su control global y su interrelación complican su estudio y sólo permiten tener un conocimiento parcial de algunos de ellos, lo que unido a las diferencias varietales, condiciones edafológicas, nutricionales, posición del fruto en el árbol, etc., obliga al estudio separado de los mismos.

Uno de los factores que más importancia tiene en la determinación del tamaño final alcanzado por el fruto es la competencia entre órganos en desarrollo. Cuanto mayor es el número de órganos en crecimiento, sean flores o frutos, mayor es la competencia entre ellos, tanto por los elementos minerales como por los productos de la fotosíntesis, lo que limita sus posibilidades de crecimiento. Esta competencia tiene una importancia decisiva en el cuajado del fruto en algunas variedades.

4.4.1. Influencia del número de frutos

La competencia entre los frutos durante el periodo de desarrollo explica la relación inversa, encontrada siempre en los cítricos, entre el número de frutos producidos por la planta y su tamaño individual. Esta relación, sin embargo, no es lineal, y solamente cuando el número de frutos es inferior a un determinado nivel, distinto según la variedad, condiciona de forma importante su tamaño. Por encima del mismo, el tamaño del fruto alcanza su límite mínimo y depende poco del número de los cosechados. Incluso en la zona de mayor dependencia (cuando el número de frutos es relativamente bajo) la correlación entre ambos parámetros es baja y raramente explica más allá del 50% de la variabilidad total encontrada en el tamaño del fruto, lo que impide explicar su tamaño final como un simple fenómeno de competencia entre frutos en desarrollo. Tanto en el mandarino Clementino como en Satsuma existe una relación muy estrecha entre el tamaño que alcanza el fruto al finalizar la caída de junio y en el momento de su maduración. Esta relación pone de manifiesto la importancia que el desarrollo alcanzado por el fruto en las primeras fases de su crecimiento tiene en su tamaño final.

Todo lo anterior nos permite evaluar la importancia que la reducción del número de frutos puede tener como método para aumentar su tamaño final.

Esta técnica, conocida como aclareo de frutos, se lleva a cabo tanto manual como químicamente.

En el aclareo de frutos, hay que tener en cuenta que tanto si es químico como si es manual, no es indiscriminado sino selectivo, afectando a los frutos más pequeños de la planta, y, en el caso de ser manual, también a aquellos frutos que presentan mermas en su calidad por otras causas distintas al tamaño.

Por otra parte, la eliminación de los frutos más pequeños aumenta el peso medio de los frutos recolectados, sin que ello signifique que hayan aumentado de tamaño. Se consigue así eliminar los calibres pequeños que no tienen valor comercial y se obtiene una cosecha, de mejor calidad.

En limonero “Fino” es frecuente aprovechar la poda de verano (a partir de San Juan) para controlar el número de frutos y poder adelantar la recolección ya que al tener menos cantidad, el calibre es mayor.

El aclareo químico, para aumentar el tamaño de los frutos de limonero y adelantar la recolección en variedades tempranas, se ha realizado con éxito en la variedad “Fino”, aplicando el 3,5,6-TPA.

4.4.2. Influencia del número de flores

El número de flores producidas por la planta tiene una gran influencia en la determinación del tamaño final alcanzado por el fruto, habiéndose encontrado, generalmente, relaciones mucho más estrechas entre ambos parámetros que entre el número de frutos y su tamaño.

Esta mayor influencia se debe a la importancia decisiva que la competencia entre frutos en sus primeras fases de desarrollo tiene en la determinación del tamaño final. En el momento de la antesis los ovarios de flores procedentes de plantas con alto nivel de floración son más pequeños que los procedentes de plantas con menor nivel de floración; además, estos últimos presentan una mayor velocidad de crecimiento.

Aunque el efecto de la floración sobre el tamaño final del fruto es general, en ocasiones se ha encontrado, como en el caso de la variedad de navelina dulce “Navelina”, que la competencia entre frutos desde el cuajado hasta la maduración es tan importante o más que la competencia entre flores. Un

efecto similar se ha señalado en la mandarina “Fortune”, en la que los frutos de los árboles con una floración muy elevada eran de menor tamaño al final de la caída de junio, pero en la maduración superaban a los procedentes de árboles con niveles de floración mucho menores; en este caso, el exceso de floración redujo drásticamente el cuajado siendo el número de frutos cosechados en estos árboles muy pequeño.

4.5. TIPOS DE FLORACIONES EN LIMONERO

De las variedades más cultivadas en España “Fino” y “Lisbon” tienen la floración principal agrupada y son poco reflorecientes, mientras que “Eureka” y “Verna” prolongan la floración principal de primavera, haciéndola más propensas a los ataques de *Prays citri*. También en “Verna”, al permanecer durante el verano los frutos maduros en el árbol, algunos años sufren el ataque de la “mosca del Mediterráneo”.

El limonero “Verna” tiene una tendencia natural a la reflorescencia sobre todo si durante el cultivo se producen desequilibrios hídricos o bien el árbol tiene pocos frutos de la cosecha principal. Presenta una floración principal en primavera (febrero-mayo), más larga y abundante que la del “Fino”, que nos dará lugar a los frutos de cosecha, otra en junio (“segundos” o “sanjuaneros”) y una tercera floración que va desde septiembre hasta final de año que serán los llamados “rodrejos”, “redrojos” o “ridruejos” y en italiano “verdelli”. El marcado escalonamiento de las floraciones en esta variedad, si bien suministra frutos a lo largo de todo el año, tiene como contrapartida el darlos en épocas que en la mayoría de los años no tienen interés comercial (caso de los segundos).

Los frutos de “cosecha” son de tamaño medio-grande, dependiendo éste del número de frutos que tenga el árbol, de las prácticas culturales a las que se le somete así como de la humedad ambiente que haya durante el año. Hay que resaltar que en el “Verna” aunque el fruto haya tomado su color característico de madurez, si la primavera es húmeda, tiene un gran desarrollo durante la misma, viéndose éste ralentizado durante los meses de verano más secos y calurosos. La conservación de los frutos en árbol es buena. Si el verano es caluroso el fruto suele reverdecerse. Fuertes calores con temperaturas superiores a 40°C y humedades bajas producen la descomposición de la pulpa y caída del fruto maduro (“asado”), teniendo en los mismos un efecto parecido a una helada, siendo los frutos más sensibles los situados en

la parte superior de la copa (“punteros”). Son muy resistentes al transporte al tener más consistencia y menos aceites esenciales que el resto de las variedades, lo que les hace tener menos problemas de oleocelosis, por lo que hasta hace relativamente pocos años su cultivo estaba muy extendido, recolectándose sus frutos desde enero hasta finales de agosto e incluso septiembre; realizándose su recolección por cortes o pases según iban adquiriendo los calibres comerciales. Generalmente, para que la cosecha de un huerto de limoneros “Vernas”, si se recolecta de una sola vez, tenga comercialmente un calibre óptimo, alrededor de un 10% de los frutos deben de tenerlo en exceso. El limón “Verna”, en conservación frigorífica es más sensible a los daños por frío que las variedades tipo “Fino”. El aumento de plantaciones de “Fino”, así como la fuerte competencia del Hemisferio Sur, hace que el periodo de comercialización de la cosecha de “Verna” se haya reducido, realizándose en la actualidad la mayor parte de su recolección durante los meses de abril, mayo, junio y julio.

Los frutos “segundos” o “sanjuaneros” proceden de la floración de junio, son de tamaño grande, piel gruesa, con mamelón poco diferenciado y con la parte apical del mismo estriada, con un gran número de semillas, alrededor de veinte, y que una vez alcanzada la madurez, rápidamente se les produce endoxerosis (destrucción de los tejidos de la parte interna del eje del fruto), desprendiéndose del árbol. Maduran de abril a junio. Su recolección debe de hacerse en el momento óptimo, ya que si el “segundo” aunque tenga su coloración típica se recolecta tierno, pasados unos días el fruto tiende a ponerse flácido por deshidratación (“pansío”) y si la misma se retrasa tendrá el eje central engomado (endoxerosis). Los frutos de “Verna” son los que tienen mayor contenido en aceites esenciales y los menos apreciados comercialmente.

Los “rodrejos” son de buen tamaño, con poco mamelón y de piel muy lisa y color verdoso precisando generalmente desverdización. Con un contenido medio en zumo, pueden permanecer más de un año en el árbol si son rodrejos auténticos (sin semillas), siendo los frutos de limonero con menor riqueza en aceites esenciales y por tanto menos propensos a la oleocelosis motivada por daños mecánicos. En la actualidad sólo tienen interés los rodrejos procedentes de la floración de septiembre-octubre que serán recolectados en septiembre-octubre del año siguiente cuando hayan alcanzado su calibre comercial, ya que los de floraciones más tardías, su recolección coincidirá con la plena campaña del “Fino”, aunque en la mayoría de las veces, por lo general, al

coincidir las primeras fases de desarrollo del fruto de estas flores tardías con los primeros fríos invernales, este no llega a desarrollarse. Al ser el “Verna” una variedad reflorescente nos encontraremos durante todo el año con frutos que no estarán incluidos totalmente dentro de los tres tipos anteriores y así tendremos:

Clase de fruto	Época de floración
Flor de enero	Floración del mes de enero
Cosecha	Floración de febrero hasta la 1ª quincena de mayo
Cosecha asegundada	Floración de 2ª quincena de mayo
Segundo	Floración de junio
Segundo arrodrejado	Floración de julio
Rodrejo asegundado	Floración de agosto
Rodrejo	Floración de septiembre a diciembre

Esta tipificación de frutos es común para todas las variedades de limonero, en nuestras condiciones climáticas.

Los frutos llamados "Flor de enero" tienen mamelón como los de cosecha pero la epidermis es la típica del rodrejo con un menor contenido en glándulas oleíferas.

Años atrás, se practicaba con frecuencia el “forzado” para conseguir rodrejos en las plantaciones de “Vernas”, en las que a finales de junio se observaba que habían desprendido en el cuaje la mayor parte de la cosecha. Para ello, se les daba "seca" a los árboles durante julio y primera quincena de agosto, dándoles dos riegos seguidos con un intervalo de una semana, aportándose en el segundo riego un fuerte abonado nitrogenado, obteniéndose así una brotación y floración a principios de septiembre que nos daba lugar a los frutos rodrejos para recolectar en septiembre del año siguiente. Este método practicado frecuentemente por los italianos para la obtención de sus "verdelli" presenta en la actualidad dificultades de realización en las plantaciones con riego localizado, ya que la respuesta al riego de las mismas es más lenta que en el caso del riego a manta. Tiene como inconvenientes el desequilibrar al árbol hacia la producción de rodrejos en años sucesivos, dándose el caso de huertos de limonero “Verna” que producían sólo rodrejos y apenas frutos de cosecha, así como producir una mayor cantidad de ramillas secas y por tanto aumentar los gastos de la poda, ya que la floración del rodrejo es en el extremo del brote y cuando se recolecta el fruto se produce la muerte de la ramilla en la que se encontraba, con el consiguiente gasto de

limpieza de secos cuando se realiza la poda. Los rodrejos que se recolectan en el mes de agosto y septiembre suelen alcanzar buenas cotizaciones.

Debido a la floración escalonada, resulta difícil efectuar una predicción de la cosecha de limones basada en la intensidad de floración. Las variedades de floración concentrada como “Fino” y “Lisbon”, presentan menos problemas de fructificación que aquellas que lo hacen de modo escalonado, ya que en esta últimas la competencia por los nutrientes entre flores y frutos en los distintos estados de desarrollo es muy fuerte. En el caso del “Verna”, el problema se agrava porque en plena floración y cuaje todavía tiene pendientes los frutos de cosecha de la floración de la primavera anterior.

En general, la mayor parte de las variedades de limonero tienen semillas y para que se desarrolle el fruto después de la antesis, se requiere que la polinización se haya efectuado con éxito y por tanto que se haya producido la fecundación de los óvulos y el posterior desarrollo de las semillas. En las variedades o clones con muy pocas semillas (“Fino 46”, “Messina” y “Fino 95”) la producción es inferior a otras con mayor número. Se ha observado que la polinización con otras variedades o clones puede aumentar significativamente la cosecha total.

5. MADURACIÓN

5.1. EVOLUCIÓN DE LA MADURACIÓN

La maduración se define como el conjunto de cambios externos, de sabor y de textura que un fruto experimenta cuando alcanza su máximo tamaño y completa su desarrollo. La maduración incluye procesos característicos tales como la coloración, la pérdida de firmeza, el aumento en la concentración de azúcares solubles, descenso de almidón, reducción de la acidez libre, y otros cambios físicos y químicos. Superado este punto, la pérdida de turgencia de sus tejidos y su posterior abscisión definen la senescencia, estado en el cual la falta de control enzimático en los procesos metabólicos conduce a la pérdida de calidad.

5.1.1. Características físicas

En el fruto del limón al igual que en el resto de los cítricos, se pueden distinguir: la piel o corteza y los gajos. La corteza, a su vez, está formada por los siguientes tejidos: epicarpo y mesocarpo. El epicarpo es la parte más externa de la corteza del fruto y en él cabe distinguir dos zonas: la epidermis y la hipodermis. En el mesocarpo hay dos zonas perfectamente diferenciadas: el mesocarpo externo y el interno. El epicarpo y el mesocarpo externo forman la parte coloreada de la corteza, la cual recibe el nombre de flavedo por alusión a su color en el fruto maduro. El mesocarpo interno está compuesto por células que se han modificado profundamente, agrupándose para formar una especie de red muy compleja, con grandes espacios vacíos, a lo que debe esta parte de la corteza su estructura esponjosa. Como este tejido carece de cromatóforos o son muy escasos su color es blanco o blanquecino, y de aquí el nombre de albedo, que usualmente se da a esta parte de la corteza. En el interior se encuentra la parte comestible, formada por los gajos (endocarpo), envueltos por membranas carpelares. Dentro de los gajos están

situadas las vesículas que contienen el zumo. Finalmente, se denomina pulpa a los residuos del fruto una vez exprimido.

La pulpa de los frutos de algunas especies de agrios y asimismo de su zumo, tiene color amarillo más o menos verdoso, como ocurre con el limón, pomelo, lima, cidro y bergamoto, mientras que naranja, mandarina y algunas variedades de pomelo son de color que varía de anaranjado al rosa y rojo.

El contenido en agua del limón es elevado. Sus valores en flavedo oscilan entre el 75-80% y en el albedo alcanzan un 75%. En el zumo los niveles son superiores al 90%.

A pesar del interés que ofrece el estudio de la dinámica de la evolución del fruto, sobre todo desde el punto de vista de las transformaciones que sufren sus medidas físicas, no son muy abundantes los trabajos de investigación dedicados a este tema.

Las determinaciones físicas nos puedan indicar de forma precisa las tendencias evolutivas referidas a tamaño y forma, que presenta el fruto durante su desarrollo y maduración, como son la altura, el diámetro ecuatorial y el peso. Hay también, un grupo de características importantes a la hora de evaluar la calidad de estos frutos, tales como el espesor, color de la corteza y el contenido en zumo.

La importancia que presenta el estudio de los cambios que se producen en tamaño y peso del fruto, viene dada por el criterio, generalmente admitido, de que los cítricos presentan unas curvas evolutivas de crecimiento y desarrollo caracterizadas por una fase inicial de aumento lento, seguida de un periodo de fuerte incremento de estas dimensiones, para alcanzar durante la maduración una zona de valores prácticamente constantes. A partir de este momento se observa una tendencia a la disminución del tamaño del fruto, con efectos negativos sobre su calidad, es decir en la fase de senescencias.

En el espesor de la corteza ejerce una notable influencia la presión ejercida por la pulpa, sobre todo, en la fase de desarrollo del fruto, proceso que está condicionado, en gran parte, por la cantidad de agua que el árbol recibe durante este periodo. Generalmente, el espesor de corteza del fruto disminuye durante su desarrollo, para alcanzar en la maduración valores prácticamente constantes. Aunque su medida suele expresarse en milímetros, resulta algunas veces útil su representación, como "índice de espesor", que es la relación entre el espesor de la corteza y el diámetro del fruto.

El color de la corteza y del zumo de los frutos cítricos son atributos de calidad de gran importancia, y constituyen factores decisivos en la adquisición de los mismos por los consumidores.

En la comercialización de los frutos para su consumo en fresco, generalmente se relaciona el color externo con su calidad interna, aunque el color de la corteza es en cierto grado independiente del estado de madurez del endocarpo.

El atractivo color externo de los frutos cítricos se debe a los carotenoides presentes en la corteza. Cuando están verdes, el color se debe a la clorofila. Este color externo, así como el del endocarpo y zumo, se puede medir por comparación visual con patrones de referencia o por métodos físicos, haciendo uso de aparatos desarrollados para tal fin.

El color es frecuente expresarlo como el cociente a/b de los parámetros **a** y **b** (**a** con valores negativos representa los verdes y positivos los rojos, mientras que **b** con valor negativo son los azules y los positivos los amarillos) ó como el “índice de color” medidos con colorímetro triestímulos en el espacio de color HunterLab. Estas relaciones tienen una buena correlación con la apreciación visual del color en el caso de naranjas, mandarinas y pomelos, pero no con el limón. Los valores negativos de ambas relaciones corresponden a colores verdes, los próximos a cero a colores amarillos y los valores positivos, a medida que aumentan, representan la variación del color desde el amarillo al naranja o rojizo.

Entre los factores que más influyen sobre el color de la corteza y del endocarpo están: la especie y variedad, temperatura, fertilización, portainjerto, posición de los frutos en el árbol, luz y riego.

Es imposible separar el estudio del fruto de la planta que lo produce y no es extraño que en el estudio de las características físicas del fruto, se resalte la influencia de un gran número de factores, como son el suelo, clima y prácticas de cultivo. La interpretación de todos sus valores no puede realizarse de forma aislada, sino que un examen global permitirá comprender los mecanismos de crecimiento y desarrollo del fruto, así como las posibles relaciones existentes.

En la Tabla 5.1 se expresan las características físicas de los frutos de las principales variedades cultivadas en España.

TABLA 5.1.
*CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LAS VARIETADES DE LIMONERO
 CULTIVADOS EN ESPAÑA, EN PATRÓN CITRUS MACROPHYLLA.*

	“Verna”	“Fino”	“Eureka”	“Lisbon”
Peso (g)	162.6	144.1	141.1	133.3
Diámetro (mm)	62.5	60.8	60.7	57.2
Altura (mm)	96.4	86.2	82.6	84.8
Diámetro mamelón (mm)	20.2	19.1	17.7	21.0
Altura cuello (mm).	8.1			14.2
Espesor de corteza (mm)	6.5	6.3	5.3	5.9
Índice de espesor	10.4	10.3	8.7	10.3
Índice de color	-3.02	-2.74	-2.54	-2.55
Índice de color interno	-8.1	-6.43	-6.55	-5.63

5.1.2. Composición química

El contenido en zumo de los frutos de limón se va incrementado a lo largo del periodo de maduración, hasta alcanzar el 40 al 46% en algunas variedades, siendo muy frecuente valores próximos al 30% en las variedades italianas. La madurez comercial en el caso de los limones se considera cuando los frutos alcanzan el 30% de contenido en zumo.

Los compuestos químicos que forman parte del fruto del limonero son muy variados. Nos limitaremos más extensamente a los dos que tienen un mayor interés desde el punto de vista comercial para el mercado de frutos frescos: los azúcares y los ácidos orgánicos y sucintamente mencionaremos vitamina C y los aminoácidos.

5.1.2.1. Azúcares

En el albedo fresco de los frutos maduros, el 75-80% está compuesto de agua y la materia seca está constituida por un 44% de azúcares, un 33% de celulosa incluidas ligninas y pentosanas y un 20% de sustancias pépticas; también hay glucósidos y ácido ascórbico. En la corteza, los azúcares predominantes son glucosa, fructosa y sacarosa, siendo el más abundante el primero de ellos, la xilosa y algún otro se encuentran como trazas.

En el zumo de naranjas el 75-80% de los sólidos solubles son azúcares. Los azúcares reductores y totales contenidos en el zumo de la naranja "Valencia" aumenta a medida que el fruto madura y resultados similares han sido encontrados en otras especies y variedades. En el zumo de la naranja "Valencia" los principales azúcares son, glucosa, fructosa y sacarosa en proporciones 2:2:1. Estos tres azúcares son los más importantes también en el zumo de pomelo, limones, mandarinas y naranjas. Posteriormente se identificaron a y b-glucosa, fructosa, sacarosa y pequeñas cantidades de galactosa. La relación de fructosa/ glucosa no puede ser considerado como un índice de la pureza en zumos de naranjas y pomelos, pero puede servir como un método útil para detectar la adición de sacarosa a zumos de otras variedades

En las variedades de limonero españolas, los contenidos de fructosa + glucosa son superiores a las de sacarosa (Tabla 5.2), siendo algo mayor en la variedad "Fino" que "Verna".

TABLA 5.2.
EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE AZÚCAR EN EL ZUMO DE LIMONES "VERNA" Y "FINO" SOBRE DIFERENTES PORTAINJERTOS (G/100 ML DE ZUMO). (ORTIZ ET AL., 1990)

	Septiembre		Noviembre		Febrero	
	Verna/Na	Verna/Mc	Verna/Na	Verna/Mc	Verna/Na	Verna/Mc
Fructosa + glucosa	0,97	0,85	0,84	0,58	0,61	0,67
Sacarosa	0,61	0,62	0,35	0,38	0,31	0,32
Total	1,58	1,46	1,19	0,96	0,92	0,99
	Fino/Na	Fino/Mc	Fino/Na	Fino/Na	Fino/Na	Fino/Mc
Fructosa + glucosa	0,99	0,82	1,03	0,86	0,90	0,74
Sacarosa	0,40	0,39	0,59	0,50	0,34	0,30
Total	1,39	1,21	1,62	1,36	1,24	1,04

(1) Na = Naranjo amargo; Mc = *C. macrophylla*.

La cantidad de azúcar contenida en los frutos de una misma variedad, varía según las condiciones de cultivo y condiciones climatológicas, densidad de plantación portainjerto y cantidad de agua de riego (en general a menos agua mayor cantidad de °Brix). Incluso entre los frutos producidos dentro de un mismo árbol puede haber diferencias notables; en general los frutos del interior del árbol son más pobres en azúcar que los que se desarrollan en el exterior; un fenómeno similar ocurre con los frutos que vegetan en la parte norte del árbol que son más pobres en azúcar que los orientados

al sur. Dentro del fruto, el azúcar no está distribuido de una manera uniforme, sino que su concentración varía en la misma forma que los sólidos disueltos, es decir, aumentando del pedúnculo hacia el estilo; también existen diferencias notables de concentraciones de azúcares entre los distintos gajos de un mismo fruto. Las diferencias entre riquezas en azúcar de las mitades estilar y peduncular de un fruto son menos marcadas en el pomelo que en la naranja, y menos aún en el limón.

5.1.2.2. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son componentes importantes de los sólidos solubles de los zumos de los cítricos que en el caso de los limones y limas son los componentes más abundantes.

La acidez del zumo de los frutos cítricos se debe principalmente al ácido cítrico, que supone del 70 al 90% del total de acidez, y, al que acompañan los ácidos málico y oxálico y en menores cantidades succínico, malónico, quínico, láctico, tartárico y otros. En el zumo de la naranja los principales ácidos son el cítrico y el málico. El ácido cítrico varía ampliamente de 8,38 g/l a 25,39 g/l, mientras que el málico varía entre límites muy estrechos de 1,40 a 1,77 g/l.

En el zumo de limón predomina también el cítrico, algo de málico y trazas de oxálico. El ácido cítrico viene a representar el 60-70% de los sólidos solubles, mientras que en el zumo de pomelo el ácido cítrico representa casi el 99% y el resto málico, oxálico y algo de tartárico. Los ácidos libres representan alrededor del 90% de los ácidos totales.

El pH del zumo varía generalmente entre valores de 2 para limones y otros frutos ácidos y 5 para mandarinas y naranjas; valores de hasta 9 se han encontrado, no obstante en las naranjas "Valencia" y "Washington navel". Tanto en naranjas y pomelos, como en mandarinas, los ácidos libres aumentan en el fruto durante los primeros estados de desarrollo y permanecen, aproximadamente, constantes en su concentración hasta la maduración en que descienden como consecuencia, fundamentalmente, de la dilución provocada por el aumento de tamaño del fruto. Este descenso de la concentración de ácidos (A) junto con el incremento gradual de los sólidos totales (E), sobre todo azúcares, durante el desarrollo del fruto provoca un incremento de su relación (E/A), denominada "índice de madurez". Este parámetro consti-

tuye la base para determinar su madurez comercial así como su índice organoléptico. Esta evolución no es, sin embargo, la que siguen los limones en los que el ácido cítrico permanece consistentemente elevado y puede llegar a alcanzar valores de hasta 60-70% del total de sólidos solubles.

Mientras el ácido cítrico es el principal ácido del endocarpo de todos los frutos cítricos, excepto en el caso de la lima dulce y las naranjas no ácidas, los principales ácidos de su corteza son el oxálico, málico y en pequeñas cantidades, cítrico, con pequeñas variaciones según la especie y el cultivar.

La acidez total de los zumos se expresa normalmente en ácido cítrico anhidro. Evidentemente, de esta forma se comete un error, pero este es muy pequeño, primero porque el predominio del ácido cítrico en el zumo es mayoritario y segundo, porque los pesos equivalentes de los ácidos cítrico y málico son casi iguales (64,02 y 67,02 g/l, respectivamente).

La fertilización es un factor importante que incide en el contenido total de ácidos en el fruto, aunque también influyen, densidad de plantación (a más espaciamiento menor acidez) el patrón, el riego, la especie, variedad, suelo, condiciones climáticas, posición en el árbol, técnicas de cultivo, etc.).

Durante el proceso de maduración hay una disminución del porcentaje de acidez en el zumo, aunque los frutos siguen aumentando de tamaño y por tanto la cantidad de zumo de los mismos; de aquí puede deducirse que la cantidad de ácido cítrico contenido en un fruto permanece constante, y por tanto, su concentración en el zumo disminuye con la madurez, al aumentar la cantidad de este y por consiguiente la dilución.

El zumo de los agrios presenta un poder tampón muy elevado, por lo que un cambio de acidez marcado puede afectar sólo ligeramente al valor del pH. El valor del pH en el zumo varía muy ligeramente durante el proceso de maduración del fruto.

Al existir en los zumos un ácido débil, como es el ácido cítrico, acompañado de sus sales, el pH del mismo está determinado fundamentalmente por la constante de disociación y la relación existente entre las cantidades de ácido combinado y ácido libre; aunque otros componentes del zumo pueden contribuir a la concentración de hidrogeniones, su acción, en comparación con las de los ácidos cítrico y málico, es muy pequeña.

Los zumos en que la relación ácido libre/combinado es próxima a 1 tienen un poder tampón máximo en casos de dilución del zumo y por esta razón los zumos de limón en los que el valor de dicha relación es alto, los cambios de pH por dilución son mayores que en otros zumos de agrios como la naranja, por ejemplo.

5.1.2.3. Vitamina C

La vitamina C (ácido ascórbico) es la vitamina más abundante en los frutos cítricos, por lo que éstos constituyen la principal fuente natural para su obtención. Su descripción de forma más ampliada será tratada en la sección 6.2.

5.1.2.4. Aminoácidos

Los compuestos nitrogenados presentes en los frutos cítricos son aminoácidos, aminas, péptidos y proteínas.

Los aminoácidos libres están en general en todas las partes del fruto. Su contenido es máximo cuando el fruto se halla próximo a la maduración, pero decrece en febrero y marzo, que es cuando coincide con el periodo de la nueva brotación y crecimiento de la planta. El contenido en aminoácidos en el zumo de limones varía según diversos autores entre los 150-190 mg/100ml, en función de las variedades y portainjertos. Los valores obtenidos en variedades españolas superan ampliamente estos valores (230-275 mg/100 ml).

La evolución de los contenidos de aminoácidos en el zumo de limón de nuestras variedades “Verna” y “Fino” sobre los portainjertos naranjo amargo y *Citrus macrophylla* puede apreciarse en las Tablas 5.3 y 5.4.

TABLA 5.3.
 CONTENIDO DE LOS AMINOÁCIDOS PRESENTES EN EL ZUMO DE
 LIMÓN "VERNA" A LO LARGO DEL PERIODO DE MADURACIÓN
 DEL FRUTO (MG/100 ML) (ORTIZ ET AL., 1990).

Portainjerto (1):	Septiembre		Noviembre		Febrero	
	Na	Mc	Na	Mc	Na	Mc
Ácido aspártico	22.7	17.3	17.6	19.2	18.5	23.2
Treonina	0.6	0.6	0.4	0.5	0.7	0.7
Serina	16.6	16.6	15.7	17.1	14.4	12.5
Asparagina	18.7	26.7	13.9	27.4	15.8	14.6
Ácido glutámico	13.8	13.9	14.8	11.4	11.7	12.5
Glutamina	1.4	0.6	0.5	0.5	0.5	0.4
Cisterna	–	–	–	–	–	–
Prolina	11.3	8.9	26.2	9.7	22.2	21.3
Glicocola	0.7	0.7	0.5	0.7	1.0	0.7
Alanina	5.9	5.8	5.2	5.9	6.5	6.6
Valina	0.8	0.7	0.6	0.6	0.7	0.7
Metionina	–	–	–	–	–	–
Isoleucina	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
Leucina	0.5	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3
Tirosina	0.2	0.3	–	–	0.2	–
Fenilalanina	0.6	0.5	0.3	0.4	0.7	0.7
Histidina	0.4	0.5	0.3	0.2	0.4	0.3
Ornitina	0.3	0.3	–	0.2	0.3	0.
Lisina	0.5	0.7	0.1	0.4	0.4	0.3
Arginina	0.3	2.4	–	2.0	1.7	0.8
Cistina	0.1	0.1	0.1	0.2	–	–
Total (mg/100 ml)	233.0	262.0	296.7	247.5	275.1	232.3

(1) Na = Naranja amargo; Mc = *C. macrophylla*

TABLA 5.4.
 CONTENIDO DE LOS AMINOÁCIDOS PRESENTES EN EL ZUMO DE
 LIMÓN "FINO" A LO LARGO DEL PERÍODO DE MADURACIÓN
 DEL FRUTO (MG/100 ML) (ORTIZ ET AL., 1990).

Portainjerto (1):	Septiembre		Noviembre		Febrero	
	Na	Mc	Na	Mc	Na	Mc
Ácido aspártico	26,6	23,1	23,8	22,8	21,5	18,9
Treonina	0,4	0,5	0,4	0,6	0,6	0,7
Serina	13,3	14,6	12,9	14,0	11,4	15,4
Asparagina	15,5	18,5	12,4	17,2	12,3	19,6
Ácido glutámico	14,9	14,0	13,8	12,2	11,3	11,0
Glutamina	1,1	0,3	0,4	0,4	0,3	0,7
Cisterna	–	–	–	–	–	–
Prolina	12,1	13,3	20,2	17,1	25,8	16,5
Glicocola	0,5	0,7	0,6	0,7	0,6	0,8
Alanina	6,0	6,6	6,8	6,7	7,0	6,9
Valina	0,9	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7
Metionina	–	–	–	–	–	–
Isoleucina	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3
Leucina	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3
Tirosina	0,1	0,2	--	--	0,1	0,2
Fenilalanina	0,6	0,6	0,5	0,7	0,5	0,5
Histidina	0,5	0,4	0,4	0,4	0,6	0,4
Ornitina	0,5	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
Lisina	0,6	0,4	0,2	0,3	0,5	0,4
Arginina	–	1,3	1,1	1,1	1,5	2,8
Cistina	–	0,1	–	0,1	–	–
Total (mg/100 ml)	245,8	269,4	250,6	246,9	262,7	239,2

(1) Na = Naranja amargo; Mc = *C. macrophylla*

5.1.2.5. Compuestos fenólicos

Entre los compuestos fenólicos presentes en los cítricos destacan los ácidos fenólicos como salicílico, p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, los cuales pueden estar libres o generalmente enlazados a glucosa. Sin embargo, son los flavonoides los compuestos mayoritarios presentes en los cítricos. Su descripción, características y biosíntesis en *Citrus limon* será desarrollada en la sección 6.

6. COMPONENTES BIOACTIVOS DEL LIMÓN

6.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

Actualmente, la interacción alimentos-medicina está siendo considerada por parte de la comunidad científica como de vital importancia para la salud. Así, el concepto de **alimentos funcionales**, que acepta el papel de los componentes alimenticios, como nutrientes esenciales para el mantenimiento de la vida y de la salud, y como compuestos no nutricionales beneficiosos para la salud, aquellos que contribuyen a prevenir o retardar las enfermedades crónicas, está tomando un gran protagonismo. La idea de la formulación de alimentos en base a los beneficios para la salud que sus componentes no nutricionales puedan aportar al consumidor, es de gran interés para las grandes compañías dedicadas a la alimentación.

El concepto tradicional de que para el mantenimiento de una salud óptima, la dieta diaria debe proveer cantidades adecuadas de nutrientes esenciales ha cambiado en los últimos años, por la evidencia cada vez mas fuerte de que los alimentos contienen también sustancias fisiológicamente activas que cumplen, al igual que los nutrientes esenciales, una función beneficiosa, contribuyendo a reducir la incidencia de ciertas enfermedades crónicas y por tanto son necesarias para una vida saludable. Excepto para los nutrientes reconocidos, en la mayoría de tales sustancias alimenticias no están completamente caracterizadas sus funciones fisiológicas. Estudios epidemiológicos *in vitro* y clínicos indican que una dieta a base de vegetales puede reducir el riesgo de enfermedades crónicas, especialmente del cáncer, conforme lo demuestra la revisión de 200 estudios epidemiológicos llevada a cabo por Block y sus colaboradores en 1992, en la cual se demuestra que el riesgo de cáncer en personas que consumen dietas altas en frutas y vegetales, es la mitad del riesgo que se observa en personas que consumen poco de estos alimentos. La evidencia es clara de que las dietas basadas en vegetales contienen otras sustancias, además de los nutrientes tradicionales, que contribuyen a reducir el riesgo de cáncer.

Como resultado, la prevención de enfermedades basada en la dieta diaria es vista cada vez más como una opción, a base del desarrollo de productos diseñados para cubrir necesidades de salud específicas. El interés del consumidor por obtener dietas óptimas para mantener una buena salud, por extender los años de vida, la desconfianza hacia los alimentos procesados y el aumento en el mercado de los alimentos naturales, ha permitido el desarrollo de los alimentos funcionales o alimentos diseñados. La base de estos componentes es eminentemente de origen vegetal, aunque como excepción también están incluidos los suplementos prebióticos y probióticos. Los alimentos funcionales, los productos alimentarios y los suplementos dietarios que proveen un posible beneficio fisiológico en el control o la prevención de enfermedades representan una oportunidad para el desarrollo de nuevos productos.

La comprensión científica de cómo estos componentes no nutricionales o fitoquímicos actúan en el organismo está en continuo avance; no sólo se están identificando y encontrando que aparentemente existen cientos de ellos, sino que también se está logrando establecer la forma de acción de algunos. Aunque los fitoquímicos no contribuyen energía o material estructural al organismo, pueden cumplir importantes funciones. Los profesionales de la salud están gradualmente reconociendo el papel de los componentes fitoquímicos de los alimentos en la mejora de la salud.

Especialistas en nutrición humana, ciencia y tecnología de alimentos, mercadotecnia, etc. investigan activamente esta nueva área y se encuentran formulando nuevos productos que permitan un futuro más saludable para la humanidad. Congresos y reuniones científicas se llevan a cabo cada vez con mayor frecuencia para discutir esta nueva área, convertida en uno de los tópicos de mayor interés desde el año 1996. En diversas Universidades se han iniciado programas para el estudio de esta interesante área de las ciencias de los alimentos y de la nutrición, siendo quizás el centro más reconocido la Universidad de Illinois (USA).

No existe un acuerdo para definir en forma precisa lo que son los "alimentos funcionales". Muchos consideran que se trata de un concepto aún en desarrollo y que bien podría considerárselos como productos intermedios entre los tradicionales y la medicina. Los alimentos funcionales podrían definirse como "cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos contiene componentes adicionales que favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona".

La idea de los "alimentos funcionales" fue desarrollada en Japón durante la década de los 80 como una necesidad para reducir el alto costo de los seguros de salud que aumentaban por la necesidad de proveer cobertura a una población cada vez mayor en edad, gracias a los avances en cuidado médico y una buena nutrición. El término se refería a alimentos procesados conteniendo ingredientes que ayudan a ciertas funciones específicas del organismo además de ser nutritivos. Por el momento, Japón es el único país que ha formulado un proceso regulatorio específico para la aprobación de alimentos funcionales. Conocidos como "alimentos para uso específico de salud" ("foods for specified health use" o FOSHU) estos alimentos son elegibles para llevar un sello de aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar. Más de 100 productos tienen licencia FOSHU en el Japón.

Los alimentos funcionales cumplen un papel específico en las funciones del cuerpo humano, entre las que podemos indicar:

- a) mejoramiento de los mecanismos de defensa biológica,
- b) prevención o recuperación de alguna enfermedad específica,
- c) control de las condiciones físicas y mentales,
- d) retardo en el proceso de envejecimiento.

El primer término usado para este tipo de alimentos en los Estados Unidos fue el de "alimentos diseñados", utilizado en 1989 por el Dr. Herbert Pierson, Director del Programa de Alimentos Diseñados del Instituto Nacional del Cáncer, para describir aquellos alimentos que contienen naturalmente o que son enriquecidos con componentes químicos, biológicamente activos pero no nutritivos, provenientes de plantas (fitoquímicos), y que resultan ser efectivos en la reducción de los riesgos al cáncer. Ese mismo año, el Dr. Stephen DeFelice, Director de la Fundación de Medicina Innovativa, crea el término "nutracéutico" para referirse a "cualquier sustancia que pueda ser considerada como alimento o como parte de un alimento y que proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención o el tratamiento de una enfermedad".

El término "fitoquímicos" constituye la evolución más reciente del término "alimentos funcionales" y enfatiza las fuentes vegetales de la mayoría de los compuestos preventivos de enfermedades. Muchos factores han contribuido a la presente "revolución" dietaria y al interés en los "alimentos funcionales": La evidencia abundante acerca del papel vital de los factores nutritivos en el mantenimiento de la salud y en la ocurrencia de las enferme-

dades, y por otra parte, el papel de la dieta en la ocurrencia de diez de las mayores causas de muerte entre las que se que incluyen: enfermedades del corazón, cáncer, derrame cerebral, diabetes, arterosclerosis, enfermedades hepáticas.

Otras enfermedades, aunque no fatales, también resultan de una dieta inadecuada y causan problemas de capacitación física. Ejemplo de este tipo de enfermedades es la osteoporosis.

Esto lleva a pensar a muchos que es posible que el aumento en el consumo de compuestos fitoquímicos con actividad biológica presentes en una dieta, contribuya a la reducción del riesgo de cáncer. Todos estos factores han contribuido a un gran interés en el papel de alimentos fisiológicamente funcionales en la prevención de enfermedades y en la promoción de la salud, partiendo del hecho de que la evidencia científica enfatiza que existe una fuerte relación entre los alimentos que se consumen y la salud humana y también la de los animales utilizados como parte del ciclo de alimentación del hombre. Además, el cada vez más amplio conocimiento científico correlaciona en forma benéfica las funciones de varios componentes alimenticios (nutrientes y no nutrientes) con la prevención y el tratamiento de enfermedades específicas.

A continuación describiremos los compuestos beneficiosos para la salud presentes en el limón.

6.2. VITAMINA C

La dieta es la fuente de todos los nutrientes para los seres humanos. Estos se dividen clásicamente en componentes de la dieta que proporcionan energía (carbohidratos, grasas y proteínas), fuentes de aminoácidos esenciales y no esenciales (proteínas), ácidos grasos insaturados (grasas), minerales (oligominerales), y vitaminas (compuestos orgánicos hidrosolubles y liposolubles).

Las vitaminas, a pesar de su composición química diversa, pueden definirse como sustancias orgánicas que deben obtenerse en pequeñas cantidades a partir del ambiente, porque los seres humanos no pueden sintetizarlas *de novo*, o su velocidad de síntesis es inadecuada para la conservación de la salud. En la mayor parte de los casos, la fuente ambiental es la dieta, ya que

el organismo es incapaz de sintetizarlas, pero una excepción obvia a esta regla general es la síntesis endógena de vitamina D que se puede formar en la piel con la exposición al sol, y algunas pueden formarse por la flora intestinal (las vitaminas K, B₁, B₁₂ y ácido fólico, que se forman en pequeñas cantidades en la flora intestinal), o sintetizarse en el hígado a través de sus precursores (p. ej. los carotenos, y la vitamina A)

Una vez ingerida con el alimento es absorbida al intestino, transportada a una célula y asimilada en su interior. Hay vitaminas que se transforman en coenzimas, como la vitamina B y la mayoría de las hidrosolubles, a excepción de la C. Otras vitaminas tienen otros modos de actuación. Son responsables de importantes procesos biológicos, producción del pigmento visual, o funcionan como antioxidantes.

Las vitaminas no generan energía, son acalóricas. Sus carencias o deficiencias originan trastornos y patologías concretas. Las vitaminas son consideradas como nutrientes porque el organismo las necesita para poder aprovechar otros nutrientes, participando en los procesos metabólicos del organismo, todas tienen un papel metabólico específico. Esta definición distingue entre vitaminas y oligoelementos esenciales, que son nutrientes inorgánicos necesarios en pequeñas cantidades. También excluye a los aminoácidos esenciales, que son sustancias orgánicas preformadas y necesarias, que se encuentran en la dieta en cantidades mayores. El término vitamina se restringe aquí para incluir únicamente las sustancias orgánicas necesarias para la nutrición de mamíferos.

Las vitaminas son sustancias orgánicas imprescindibles en los procesos metabólicos que tienen lugar en la nutrición de los seres vivos. No aportan energía, puesto que no se utilizan como combustible, pero sin ellas el organismo no es capaz de aprovechar los elementos constructivos y energéticos suministrados por la alimentación. Normalmente se utilizan como precursoras de las coenzimas, a partir de las cuales se elaboran los miles de enzimas que regulan las reacciones químicas de las que viven las células.

Se puede hacer una clasificación de ellas, dependiendo de su solubilidad. Las vitaminas A, D, E y K son liposolubles, se absorben en nuestro organismo con la ayuda de las grasas y aceites, y las vitaminas del complejo B y C son hidrosolubles, no necesitan grasa para su absorción. Las vitaminas hidrosolubles sólo se almacenan en una cantidad limitada y se requiere consumo frecuente para conservar la saturación de los tejidos. Las vitaminas

liposolubles pueden almacenarse en cantidades muy abundantes, y esta propiedad les confiere un potencial de toxicidad grave que excede mucho la del grupo hidrosoluble. En la forma que se consumen, muchas vitaminas no tienen actividad biológica y requieren procesamiento *in vivo*. En el caso de varias vitaminas hidrosolubles, la activación incluye fosforilación (tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina), y es posible que también requiera acoplamiento a nucleótidos purina o piridina (riboflavina, ácido nicotínico). En sus principales efectos conocidos, las vitaminas hidrosolubles participan como cofactores para enzimas específicas, en tanto al menos dos vitaminas liposolubles, A y D, se comportan como hormonas e interactúan con receptores intracelulares específicos en sus tejidos blanco.

Con una dieta equilibrada y abundante en productos frescos y naturales, dispondremos de todas las vitaminas necesarias y no necesitaremos ningún aporte adicional. Un aumento de las necesidades biológicas requiere un incremento de estas sustancias, como sucede en determinadas etapas de la infancia, el embarazo, la lactancia y durante la tercera edad. El consumo de tabaco, alcohol o drogas en general provoca un mayor gasto de algunas vitaminas, por lo que en estos casos puede ser necesario un aporte suplementario. Debemos tener en cuenta que la mayor parte de las vitaminas sintéticas no pueden sustituir a las orgánicas, es decir, a las contenidas en los alimentos o extraídas de productos naturales (levaduras, germen de trigo, etc.). Aunque las moléculas de las vitaminas de síntesis tengan los mismos elementos estructurales que las orgánicas, en muchos casos no tienen la misma configuración espacial, por lo que cambian sus propiedades.

El descubrimiento de las vitaminas se produjo a raíz de la observación de que, mientras que una dieta sintética (con carbohidratos, proteínas, lípidos y minerales, exclusivamente) no podía mantener el crecimiento de animales de experimentación, la adición de leche a la mezcla producía un alimento suficiente. El fraccionamiento de la leche permitió encontrar rápidamente que tanto la fracción grasa como la acuosa eran igualmente indispensables, y a los componentes esenciales (todavía desconocidos) se les llamó vitamina A (la presente en la grasa) y B (le presente en la fracción acuosa). En consecuencia, los estudios realizados posteriormente tuvieron muy en cuenta esta división, y todavía se consideran las vitaminas como pertenecientes a dos grandes grupos, las vitaminas hidrosolubles (solubles en agua y presentes en las partes acuosas de los alimentos) y las vitaminas liposolubles, insolubles en agua y presentes en las partes grasas de los alimentos. La fracción denominada B, resultó ser en realidad una mezcla de varias vitaminas distintas.

El escorbuto, la enfermedad por déficit de vitamina C, se ha conocido desde la época de las Cruzadas, especialmente entre las poblaciones del norte de Europa que subsistían a base de dietas que carecían de frutas y verdura fresca durante gran parte del año. La incidencia de escorbuto se redujo mediante la introducción de la patata (una fuente de vitamina C) en Europa en el transcurso del siglo XVII. Sin embargo, los prolongados viajes marítimos de exploración durante los siglos XVI a XVIII, que se emprendían sin abastecimiento de frutas y verduras frescas, dieron por resultado la muerte por escorbuto de gran número de integrantes de las tripulaciones.

Durante mucho tiempo se había sospechado que el escorbuto dependía de una causa relacionada con la dieta. En 1535, Cartier aprendió de los indígenas de Canadá como curar el escorbuto en su tripulación, al hacer un extracto de hojas de abeto; posteriormente, varios capitanes de barco evitaron el escorbuto o lo curaron mediante la administración de jugo de limón. Con todo, un estudio sistemático de la relación entre dieta y escorbuto tuvo que esperar hasta 1747, cuando Lind, un médico de la marina británica, llevó a cabo un estudio clínico en pacientes con escorbuto manifiesto que recibieron sidra, vinagre, agua de mar, naranjas, limones, ajo y mostaza. Quienes consumieron frutas cítricas se recuperaron con rapidez. La introducción subsecuente de jugo de limón en la marina británica, en 1800, dio por resultado una disminución notoria de la incidencia de escorbuto; en tanto en 1780 ingresaron 1.457 pacientes al hospital naval en Portsmouth, en 1806 sólo se atendió a dos.

El siguiente episodio de importancia en la historia de la vitamina C fue la aportación de Holst y Frölich, en 1907, al observar que los cobayas presentan escorbuto cuando reciben una dieta de avena y salvado, sin complementos de verduras frescas. La demostración de escorbuto en el cobaya permitió efectuar pruebas de fracciones de frutas cítricas para cuantificar su potencial contra el escorbuto. En 1928, Szent-Györgyi aisló un compuesto reductor en forma pura a partir de la col (repollo); en 1932 Waugh y King identificaron el compuesto de Szent-Györgyi como un factor antiescorbútico activo en el jugo de limón. Pronto se estableció la estructura química de esta sustancia en varios laboratorios, y se le asignó el nombre químico trivial de ácido ascórbico para designar su función en la prevención de escorbuto.

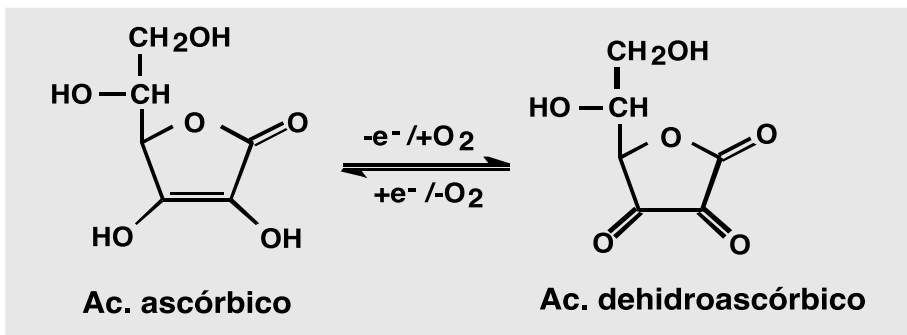
Las manifestaciones de escorbuto por deficiencia de vitamina C también han surgido después de inducir escorbuto experimental mediante restricciones intencionales de la dieta. Por ejemplo, Crandon se sometió a sí mismo

a una dieta sin vitamina C durante 161 días; su concentración plasmática de ácido ascórbico disminuyó hasta cifras insignificantes en el transcurso de 41 días, y las concentraciones en sus leucocitos se hicieron indetectables después de 121 días. Aparecieron hiperqueratosis perifoliculares (acumulación de células epidérmicas alrededor de los folículos pilosos) a los 121 días; sobrevinieron hemorragias bajo la piel (petequias y equimosis) a los 161 días, y una herida en la espalda que no cicatrizó.

El término vitamina C debe usarse como un nombre descriptivo genérico para todos los compuestos que muestran desde el punto de vista cualitativo la actividad biológica del ácido ascórbico.

El ácido ascórbico (Figura 6.1) es una cetolactona de seis carbonos, que tiene relación estructural con la glucosa y otras hexosas, se oxida de modo reversible en el organismo para dar ácido dehidroascórbico. Este último compuesto posee actividad completa de vitamina C.

FIGURA 6.1.
ESTRUCTURA QUÍMICA E INTERCONVERSIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y AC. DEHIDROASCÓRBICO



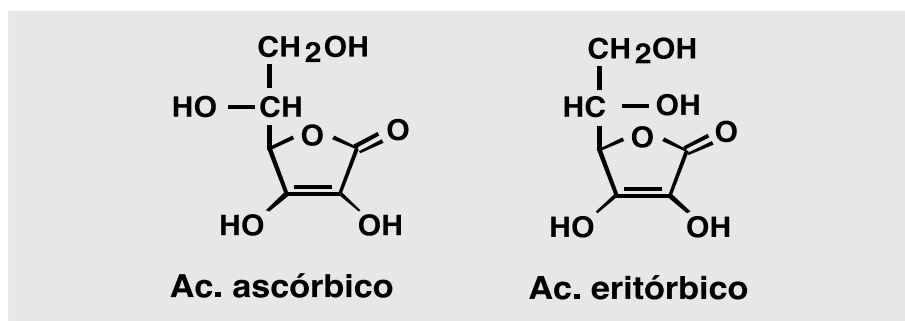
El ácido ascórbico tiene un átomo de carbono con actividad óptica, y la acción contra el escorbuto reside casi por completo en el isómero L. Otro isómero, el ácido eritórbico (Figura 6.2) (ácido D-isoascórbico o ácido D-araboascórbico), tiene actividad muy débil en el escorbuto, pero muestra un potencial de óxido-reducción similar. Por tanto, ambos compuestos se han usado para prevenir formación de nitrosamina a partir de nitritos en carnes curadas como el tocino. La falta de un efecto más potente del ácido eritórbico contra el escorbuto quizá depende de la incapacidad de los tejidos para retenerlo en las cantidades en que se almacena el ácido ascórbico. Una

consecuencia de la oxidación de este último es la facilidad con la que puede destruirse por exposición al aire, especialmente en medio alcalino, y si hay cobre como agente catalítico.

La vitamina C posee pocos efectos farmacológicos. El suministro del compuesto en cantidades mucho mayores a los requerimientos fisiológicos causa pocas acciones demostrables salvo en individuos con escorbuto, cuyos síntomas se alivian con rapidez.

FIGURA 6.2.

ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y AC. ERITÓRBICO



El ácido ascórbico funciona como un cofactor en diversas reacciones de hidrólisis y amidación al transferir electrones a enzimas que proporcionan equivalentes reductores. De este modo, se requiere para, o facilita, la conversión de algunos residuos de prolina y lisina que se encuentran en el procolágeno, en hidroxiprolina e hidroxilisina en el transcurso de la síntesis de colágeno, la oxidación de cadenas laterales de lisina en proteínas, para proporcionar hidroxitrimetilisina para la síntesis de carnitina, la conversión de ácido fólico en ácido folínico, el metabolismo microsómico de fármacos, y la hidroxilación de dopamina para formar noradrenalina. El ácido ascórbico favorece la actividad de una enzima amidante que se cree participa en el procesamiento de algunas hormonas peptídica, como oxitocina, hormona antidiurética y colecistocinina. Al reducir el hierro férrico no hemo al estado ferroso en el estómago, el ácido ascórbico también favorece la absorción intestinal de hierro. Además, dicho ácido participa, aunque de una manera poco definida, en la esteroidogénesis suprarrenal.

A nivel tisular, una función importante del ácido ascórbico se relaciona con la síntesis de colágeno, proteoglucanos y otros constitutivos orgánicos de la matriz intercelular en tejidos tan diversos como dientes, huesos y endotelio

capilar. Aun cuando el efecto del ácido ascórbico sobre la síntesis del colágeno se ha atribuido a su participación en la hidroxilación de prolina, las pruebas también sugieren que hay estimulación directa de la síntesis de péptidos de colágeno. El escorbuto se relaciona con un defecto de la síntesis de colágeno, que queda de manifiesto por la falta de cicatrización de heridas, defectos de la formación de los dientes, y rotura de capilares. En tanto esto último es debido a adherencia inadecuada de las células endoteliales, también se cree que en el escorbuto hay defectos del tejido fibroso pericapilar, lo cual produce apoyo inadecuado de los capilares, y su rotura bajo presión.

El ácido ascórbico se absorbe con facilidad desde el intestino por medio de un proceso dependiente de energía, que es saturable y dependiente de la dosis. La absorción del ascorbato de la dieta es casi completa. Cuando se administra vitamina C en una dosis única por vía oral, la absorción disminuye desde 75% a 1 g, hasta 2% a 5 g. El ácido ascórbico se encuentra en el plasma y está distribuido de modo omnipresente en las células del organismo. Las concentraciones de la vitamina en los leucocitos a veces se utilizan para representar a las que hay en los tejidos y son menos sensibles a agotamiento que el plasma. Los leucocitos en adultos tienen concentraciones de aproximadamente 27 mg de ácido ascórbico por 108 células. Cabe hacer notar que la cantidad de este ácido en los leucocitos puede mostrar relación inversa con su número, y es posible que los estimados del estado, en cuanto a ácido ascórbico se refiere, resulten falsamente bajo en pacientes con leucocitosis, en quienes se mide el ascorbato de los leucocitos. Las concentraciones plasmáticas también varían con el consumo. La ingestión adecuada se relaciona con cifras de más de 0,5 mg/dl (28 mM), en tanto en individuos con escorbuto manifiesto se observan cifras de 0,15 mg/dl (8,5 mM).

Cuando la dieta no contiene en esencia ascorbato, disminuyen las concentraciones plasmáticas; como se mencionó, los síntomas de escorbuto son obvios cuando se alcanza una cifra de 0,15 mg/dl (8,5 mM), y las reservas corporales totales de la vitamina se aproximan a 300 mg. Cuando aumenta el consumo de ascorbato, también lo hace la concentración plasmática: al principio de manera lineal. La ingestión diaria de 5 a 10 mg proporciona una reserva corporal total de 600 a 1.000 mg de ascorbato. Cuando se consumen 60 mg/día de vitamina C (la dosis actual para adultos), la concentración plasmática alcanza unos 0,8 mg/dl (45 mM), y las reservas corporales totales son de aproximadamente 1.500 mg. Si el consumo se aumenta más allá de 200 mg/día, las reservas corporales tienden a nivelarse a 2.500 mg, y las cifras plasmáticas a 2 mg/dl (110 mM). El umbral renal para el ácido ascórbico

es de alrededor de 1,5 mg/dl de plasma (85 mM), y cuando la ingestión diaria excede de 100 mg, se excretan cantidades cada vez mayores del ácido ascórbico ingerido.

El ascorbato se oxida hasta CO_2 en ratas y cobayas pero en seres humanos puede detectarse mucha menos conversión. Una vía de metabolismo de la vitamina en seres humanos comprende su conversión en oxalato, y la excreción a la postre en la orina; el deshidroascorbato probablemente es un intermediario. También se ha identificado ácido ascórbico-2-sulfato como un metabolito de la vitamina C en la orina humana.

Los seres humanos y otros primates, así como los cobayas y algunos murciélagos, son los únicos mamíferos conocidos que son incapaces de sintetizar ácido ascórbico; en consecuencia requieren vitamina C en la dieta para la prevención del escorbuto. Como es característico en animales que no requieren vitamina C en la dieta, la rata sintetiza ácido ascórbico a partir de glucosa por medio de la formación intermediaria de ácido D-glucurónico, ácido L-gulónico, y L-gulonolactona. Los seres humanos, monos y cobayas carecen de la enzima hepática necesaria para llevar a cabo esta última reacción, es decir, la conversión de L-gulonolactona en ácido L-ascórbico.

Como hemos visto, una deficiencia de consumo de vitamina C puede generar escorbuto. Se encuentran casos de este último entre ancianos que viven solos, alcohólicos, drogodependientes, y otros con dietas inadecuadas, incluso lactantes. En casos espontáneos de escorbuto, por lo general hay aflojamiento de los dientes, gingivitis y anemia, que pueden deberse a una función específica del ácido ascórbico en la síntesis de hemoglobina. El cuadro del escorbuto espontáneo en la práctica clínica a menudo también se complica por deficiencia de otros nutrientes.

El escorbuto puede sobrevenir en lactantes que reciben dietas a base de fórmulas preparadas en el hogar, con cifras inadecuadas de ácido ascórbico. El lactante es irritable y no tolera que lo toquen, debido a dolor. Este último se origina por hemorragias bajo el periostio de los huesos largos, y los hematomas resultantes a menudo son visibles como inflamaciones en las diáfisis de esos huesos.

La ingestión diaria de ácido ascórbico debe ser igual a la cantidad que se excreta o destruye por oxidación. Los seres humanos adultos saludables pierden 3 a 4% de sus reservas corporales al día. Para conservar una reserva

corporal de 1.500 mg de ácido ascórbico o más en un varón adulto, se requeriría la absorción de unos 60 mg/día. Los valores de los requerimientos de vitamina C de otros grupos de edad, se basan en un razonamiento similar.

En circunstancias especiales, parece requerirse más ácido ascórbico para alcanzar concentraciones plasmáticas normales. Las cifras plasmáticas más bajas de vitamina C que se encuentran en fumadores dependen de incremento de la velocidad de recambio metabólico de la vitamina. De este modo, para asegurar un estado adecuado de dicha vitamina, la dosis adecuada para fumadores se ha establecido en 100 mg/día. Las concentraciones plasmáticas de ascorbato también disminuyen en usuarias de anticonceptivos orales. Los requerimientos pueden aumentar en algunas enfermedades, en particular las infecciosas, así como luego de intervención quirúrgica.

El ácido ascórbico se obtiene a partir de frutas cítricas, tomates, fresas, verduras verdes, col (repollo) y patatas. Los jugos de naranja y limón son fuentes con alto contenido de la vitamina y contienen alrededor de 0,5 mg/ml (2,8 mM). El ácido ascórbico se destruye con facilidad por calor, oxidación y álcalis. Además de su participación en la nutrición, el ácido ascórbico suele utilizarse como un antioxidante para proteger el sabor y color naturales de muchos alimentos (ej., fruta procesada, verduras y productos lácteos).

La vitamina C regularmente se administra por vía oral; de cualquier modo, en situaciones que evitan la absorción adecuada a partir del tubo digestivo, pueden proporcionarse soluciones por vía parenteral. Más aún, debe administrarse ácido ascórbico en sujetos que reciben alimentación parenteral. Debido a la pérdida en la orina de gran parte del ácido ascórbico administrado, es posible que se requieran dosis diarias de 200 mg para conservar cifras plasmáticas normales de alrededor de 1 mg/dl (60 mM en esos individuos).

6.2.1. Vitamina C en el limón

La corteza de los cítricos es especialmente rica en esta vitamina; así los porcentajes que tiene la naranja son: en el flavedo un 34%, en el albedo un 19%, la pulpa un 21% y el zumo un 26%, mientras que en el pomelo estos valores representan el 31%, 33%, 19% y 17% respectivamente. En base al peso total del fruto, el zumo contiene alrededor del 25% de la vitamina C presente en la naranja y solamente el 17% en el pomelo.

El contenido total es muy variable según la especie. En naranjas generalmente oscila entre 30 y 70 mg/100 ml de zumo; en pomelos entre 25 y 60 mg/100 ml; en limones entre 20 y 60 mg/100 ml; en limas entre 15 y 45 mg/100 ml; y en mandarinas donde hay más heterogeneidad entre 15 y 60 mg/100 ml. El contenido en vitamina C de las diversas variedades cultivadas en España puede observarse en la Tabla 6.1. Se observa que “Eureka” tiene unos contenidos más bajos que las otras variedades. No parece en nuestro caso una influencia del patrón sobre el contenido en vitamina C.

El contenido en vitamina C del fruto también varía con diferentes factores; así, suele ser muy alto en naranjas y pomelos inmaduros y a medida que el fruto madura y aumenta de tamaño la concentración disminuye, aunque el contenido total en el fruto aumenta. Los frutos más altos del árbol y situados en el exterior de la copa son más ricos en vitamina C que los situados en las zonas más bajas del árbol. Los frutos procedentes de la cara norte, son más pobres en vitamina C que los frutos situados en la cara sur. Los situados en el interior de la copa tienen la misma cantidad de vitamina C, con independencia de su posición relativa en la planta. Dentro de un mismo fruto, hay mayor contenido en la zona peduncular que en la zona estilar y más alrededor del eje central que en las proximidades de la corteza.

Cuando se recolectan al mismo tiempo, las naranjas verdosas presentan menos vitamina C que las coloreadas. Las condiciones climáticas, la fertilización y el patrón -aunque no parece que sea siempre-, son factores que determinan el contenido de vitamina C del fruto. Disminuye su contenido cuando el nitrógeno ó el fósforo en el suelo aumentan, pero la adición de potasio al suelo aumenta la cantidad de ácido ascórbico en el fruto. No parece influir el riego.

TABLA 6.1.
 CONTENIDO EN VITAMINA C (MG/100 ML) EN ZUMO DE
 VARIEDADES DE LIMÓN CULTIVADAS EN ESPAÑA SOBRE
 DISTINTOS PORTAINJERTOS. (ORTIZ ET AL., 1990)

	Naranja amargo	<i>C. macrophylla</i>
“Verna”	39,8	40,4
“Fino”	39,0	42,3
“Eureka”	32,4	36,4
“Lisbon”	38,3	40,0

6.3. FLAVONOIDES: GRUPOS Y ESTRUCTURAS

Los flavonoides están englobados dentro de los fenoles vegetales, constituyendo un importante grupo dentro de los metabolitos secundarios de las plantas, estimándose que aproximadamente el 2% de todo el carbono fotosintetizado por las plantas se convierte en flavonoides o compuestos relacionados. Estos muestran una estrecha interrelación química y estructural que se manifiesta en la gran similitud existente entre los diversos procesos de biosíntesis a través de los cuales se forman en las plantas.

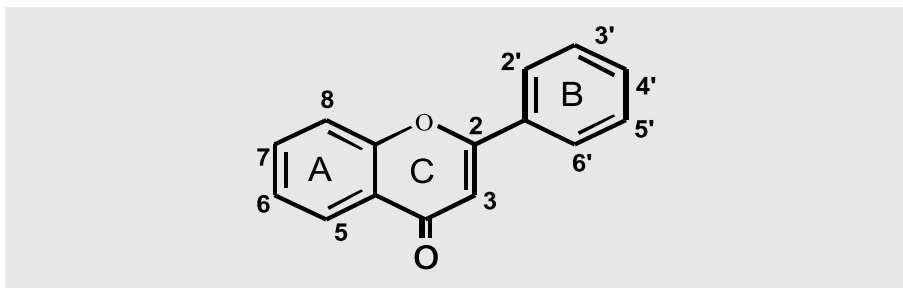
Los flavonoides fueron descritos por primera vez por Albert Szent-Gyorgyi en 1936, ganador del premio Nóbel, por el descubrimiento de la vitamina C. El informó que determinadas sustancias presentes en los cítricos (flavonoides) endurecían las paredes de los vasos capilares y disminuían la permeabilidad capilar, capacidad que no tenía la vitamina C. Denominó a estos compuestos vitamina P o factor de la permeabilidad. El descubrimiento de estas sustancias surgió al analizar las diferencias entre los resultados obtenidos en la aplicación de vitamina C impura y purificada sobre los síntomas de deficiencia de vitamina C. Observó que la recuperación tras la aplicación de vitamina C impura era mayor que cuando se aplicaba la purificada. Después de muchas investigaciones, llegó a la conclusión de que las sustancias que acompañaban al ácido ascórbico eran las responsables de las diferencias observadas. Estudios posteriores revelaron que las sustancias que acompañaban a la vitamina C impura eran flavonoides. Estos compuestos fenólicos potencian o complementan la acción del ácido ascórbico sobre los síntomas de deficiencia de vitamina C.

Los flavonoides atrajeron la atención de un gran número de investigadores, al principio por sus propiedades como colorantes naturales, posteriormente por su aplicación en los campos de alimentación y farmacología, y actualmente se desarrolla con mayor interés el estudio de su biosíntesis, síntesis química, estereoquímica, actividad biológica y fisiológica.

Existen actualmente más de 2000 estructuras conocidas, clasificadas en 11 clases principales según el nivel de oxidación del anillo pirona central (Figura 6.3).

Los flavonoides presentes en el género *Citrus* han sido objeto de estudio durante los últimos años, no sólo para su aislamiento, caracterización y cuantificación, sino también por sus importantes propiedades en relación con

FIGURA 6.3.
 ESTRUCTURA DEL ANILLO PIRONA DONDE SE REPRESENTAN
 LAS SUSTITUCIONES MÁS FRECUENTES ENCONTRADAS
 EN LOS FLAVONOIDES



el sabor, su potencialidad farmacológica e incluso su papel como posibles marcadores taxonómicos. Entre ellos cabe mencionar: **flavanonas** (incluyendo 3-hidroxi-flavanonas-dihidroflavonoles), **flavonas** (incluyendo 3-hidroxi-flavonas-flavonoles), **cumarinas** y **antocianinas**.

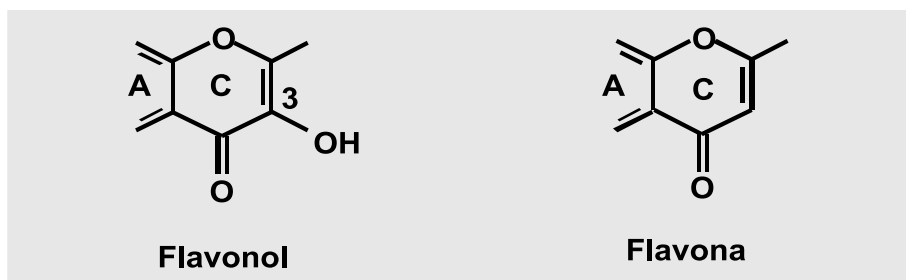
Dependiendo de la presencia o no en su molécula de cadenas de azúcares y de la posición en que éstas se sitúen, las flavanonas y flavonas pueden dividirse en O-glicósidos, C-glicósidos y aglicones.

A) *Flavonas y Flavonoles*

El término flavona corresponde al núcleo 2-fenilbenzopirona (Figura 6.4). Es una estructura base no existente en la naturaleza, pero sí sus hidroxiderivados y sus éteres. De forma análoga el término flavonol se emplea para designar a las 3-hidroxi-flavonas. Esta simple diferencia tiene una importante significación desde el punto de vista biosintético, fisiológico, filogenético y farmacológico. Las mayores frecuencias de oxi-sustitución se producen en las posiciones 3, 5, 7, 3' y 4'. Encontramos 5-Deoxiflavonas mayoritariamente en Fabáceas, Asteráceas y Rutáceas (*Citrus*). La C-alquilación se produce mayoritariamente en las posiciones 6 y 8. De forma continua se descubren nuevos flavonoles y flavonas glicosiladas. Normalmente el punto más común de glicosilación es el grupo hidroxilo en posición 7 para el caso de las flavonas, 7 y/o 3 para los flavonoles, aunque se han descrito algunos casos en posiciones 4', 3' ó 5'. El tipo de sustitución es diverso: arabinósidos, galactósidos, ramnósidos y glucósidos; entre los

disacáridos la más común es la estructura tipo rutinósido (ramnosil (α 1-6) glucosa), con neohesperidósidos (ramnosil (α 1-2) glucosa) y rungiósidos (ramnosil (α 1-3) glucosa) en menor proporción.

FIGURA 6.4.
ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS FLAVONOLES Y FLAVONAS



Las flavonas *O*-glicosiladas, sus derivados *O*-glicosilados e incluso los correspondientes aglicones son más numerosos en las diversas especies del género *Citrus* que las flavanonas, si bien, con una consideración de significativa importancia, su presencia se produce en muy bajas concentraciones, dificultando su extracción, purificación y caracterización. Las flavanonas más comunes: apigenina, acacetina, luteolina, etc., se encuentran presentes en forma de β -neohesperidósido o β -rutinósido en la posición 7 de la estructura flavónica.

En el caso de las 3-hidroxi-flavonas (flavonoles), la posición “preferida” de glucosilación es el hidroxilo del C-3. Así encontramos en el limón compuestos como los flavonoles: limocitrina, limocitrol e isolimocitrol, todos ellos presentes como 3- β -D-glucósidos.

Las flavona-aglicones son los flavonoides más característicos de los presentes en las especies del género *Citrus*, aunque pueden encontrarse ocasionalmente en otras especies de plantas. Son compuestos múltiplemente sustituidos, particularmente en el anillo A, por grupos hidroxilo y sobre todo metoxilo. Las C-glicosilflavonas, son usualmente compuestos minoritarios que presentan enormes dificultades para su extracción y purificación. Los ejemplos más característicos de ellos son: 6-*O*- β -D-glucosildiosmetina y 8-*O*- β -D-glucosildiosmetina, ambas presentes en el limón.

La formación de flavonoles en plantas parece estar asociada con procesos de lignificación en hojas y leño y con los procesos de absorción de luz UV

por las flores, habiendo sido descrita su presencia fundamentalmente en angiospermas leñosas y en menor extensión en herbáceas. Taxonómicamente, respecto a la presencia de flavonoides, la característica que hace diferir a las diversas familias de angiospermas es la presencia o no, de dichos compuestos, de C-5-hidroxilación y/o 6-O-metilación. Las familias de angiospermas que contienen flavonoles en mayor proporción son además de las Rutáceas, Asteráceas, Fabáceas, Lamináceas, Mirtales, Scrofulariáceas y Solanáceas. En estas familias los compuestos más ampliamente distribuidos son las flavonas y flavonoles glicosilados.

B) Flavanonas y Dihidroflavonoles

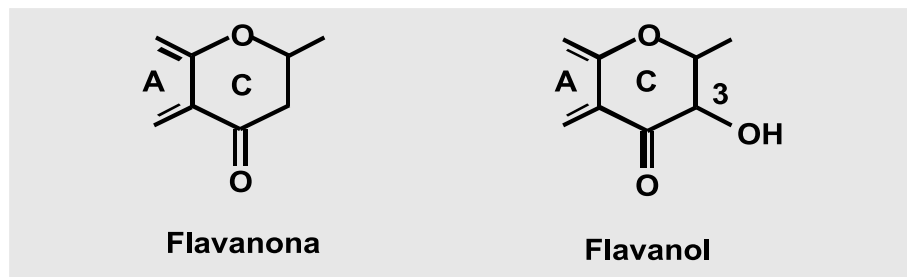
Las flavanonas son los flavonoides más abundantes en la mayoría de las especies cítricas, sin embargo, su presencia en otras especies sólo ha sido descrita en zonas leñosas de determinadas plantas y en muy bajas concentraciones.

Los estudios sobre la presencia de estos compuestos en la naturaleza son todavía escasos y únicamente han sido examinados algunos géneros como *Citrus*, *Pinus*, *Prunus*, *Acacia* y *Eucaliptus*. En las leguminosas también se ha descrito la presencia de estos compuestos.

La estructura de las flavanonas difiere químicamente de la flavona en la saturación del enlace entre los carbonos 2 y 3, y en la desaparición, debido a este hecho, de la conjugación entre dicho doble enlace y el grupo carbonilo, conjugados a su vez con el grupo 2-fenilo (anillo B) y con el anillo A. Su modelo básico es, por consiguiente, la 2-fenilbenzopirán-4-ona (Figura 6.5).

FIGURA 6.5.

ESTRUCTURA BÁSICA DE LAS FLAVANONAS Y DIHIDROFLAVONOLES



Los dihidroflavonoles se construyen sobre la base estructural 2-fenil-3-hidroxibenzopiran-4-ona y de ahí su denominación de 3-hidroxiflavanonas. Las posiciones más comunes de sustitución (hidroxilación y metilación) son similares a las de flavonas y flavonoles, y del mismo modo las de C-alquilación. Así mismo, la posición 7 es la mayoritaria en los casos de glicosilación.

Flavanonas y dihidroflavonoles son compuestos muy interesantes desde el punto de vista estructural, puesto que son obligados intermedios en las rutas generales de biosíntesis de flavonoides.

Las principales flavanonas del género *Citrus*: Hesperetina, Naringenina, Eriodictiol e Isosakuranetina, mayoritariamente se encuentran en forma glicosilada en el hidroxilo situado en el C-7. Esta glicosilación puede ser de dos tipos según la estructura (Figura 6.6):

- A) β -neohesperidósido (2-O-a-L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranososa).
- B) β -rutinósido (6-O-a-L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranososa).

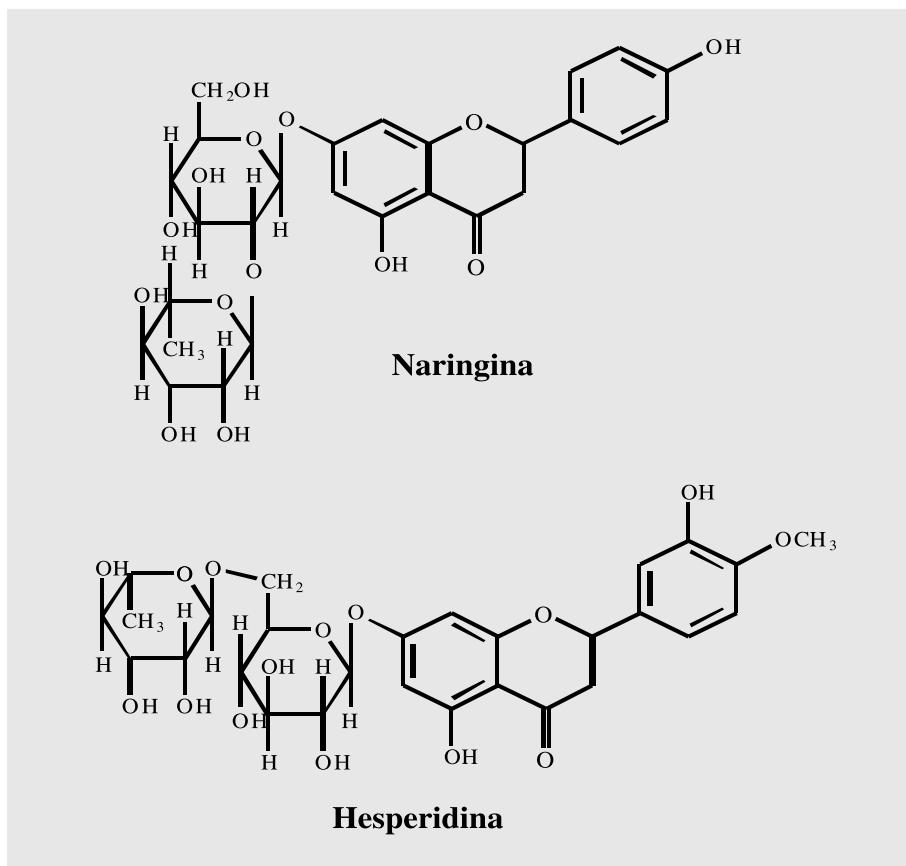
Dentro de los rutinósidos, las flavanonas más abundantes en cítricos son: hesperidina, narirutina, eriocitrina, eriodictiol. Las más abundantes, tipo neohesperidósido, son: naringina, neohesperidina, neoeriocitrina, poncirina, neoeriodictiol.

Estos dos tipos de flavanonas, que se describen a continuación (Figura 6.6), se diferencian además, generalmente por su sabor, mientras que los neohesperidósidos son amargos, los rutósidos carecen prácticamente del mismo.

Así mismo, se han descrito otras flavanonas glicosiladas, tales como los derivados trisacáridos naringina 4'- β -D-glucósido y naringenina 7- β -rutinósido 4'- β -D-glucósido, aisladas ambas en pequeña proporción en tejidos de pomelo. Otro flavonoide presente en pomelo, 3-hidroxinaringenina (dihidrokaempferol) se encuentra así mismo en forma de glicósido, siendo por otra parte, la única 3-hidroxiflavona conocida en especies del género *Citrus*.

Durante la década de los años setenta, se han llevado a cabo estudios sobre la presencia de flavanonas glicosiladas en un gran número de híbridos del género *Citrus* con objeto de determinar si el producto de un proceso de

FIGURA 6.6.
 ESTRUCTURAS DE LAS DOS FORMAS MÁS COMUNES DE GLICOSILACIÓN EN POSICIÓN 7 DE LOS FLAVONOIDES PRESENTES EN EL GÉNERO CITRUS: TIPO β -NEOHESPERIDÓSIDO, ESTRUCTURA CORRESPONDIENTE A NARINGINA; TIPO β -RUTINÓSIDO, ESTRUCTURA CORRESPONDIENTE A HESPERIDINA.



hibridación es un verdadero híbrido genético o el producto de un embrión nucelar que, por otro lado, es de aparición habitual en algunas especies de cítricos. Ya que los embriones nucleares producen una descendencia exclusivamente del tejido “materno”, el patrón de flavonoides de una planta adulta y el de sus descendientes debe ser idéntico. Un esquema o modelo de flavonoides diferente indicaría la existencia de una contribución procedente de otra fuente, en concreto del polen “paterno”.

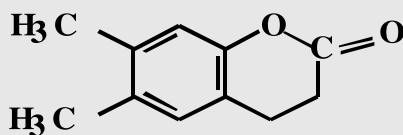
C) *Cumarinas*

Con el nombre de cumarinas se conoce a un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales, las cuales son derivadas del benzopirano. Son lactonas que se pueden considerar derivadas de un ácido *O*-hidroxicinámico (ácido *O*-cumárico) por cierre de un anillo entre el grupo hidroxilo orto y el grupo carboxílico de la cadena lateral. En el anillo aromático suelen presentar grupos hidroxilo, metoxilo e isopentenilo. Se conocen más de 500 estructuras de cumarinas naturales, distribuidas en las plantas superiores. Son compuestos característicos de las familias Umbelliferae y Rutaceae, en las que realizan una función protectora actuando como fitoalexinas, en sustitución de isoflavonoides. Las cumarinas y furanocumarinas desempeñan en las plantas funciones ecológicas, actuando en relaciones alelopáticas y como disuasorios nutritivos.

El género *Citrus* produce cumarinas en forma libre o glicosiladas. Algunas especies de *Citrus* al ser infectadas por hongos fitopatógenos acumulan ciertas cumarinas como xantiletina, seselina y escoparona (Figura 6.7), variando la naturaleza de la cumarina sintetizada en este proceso con respecto a la especie y el patógeno en cuestión.

FIGURA 6.7.

FORMULA DE LA ESCOPARONA, UNA CUMARINA (FITOALEXINA) QUE SE ACUMULA EN LOS CÍTRICOS CUANDO SON INFECTADOS POR HONGOS



Escoparona

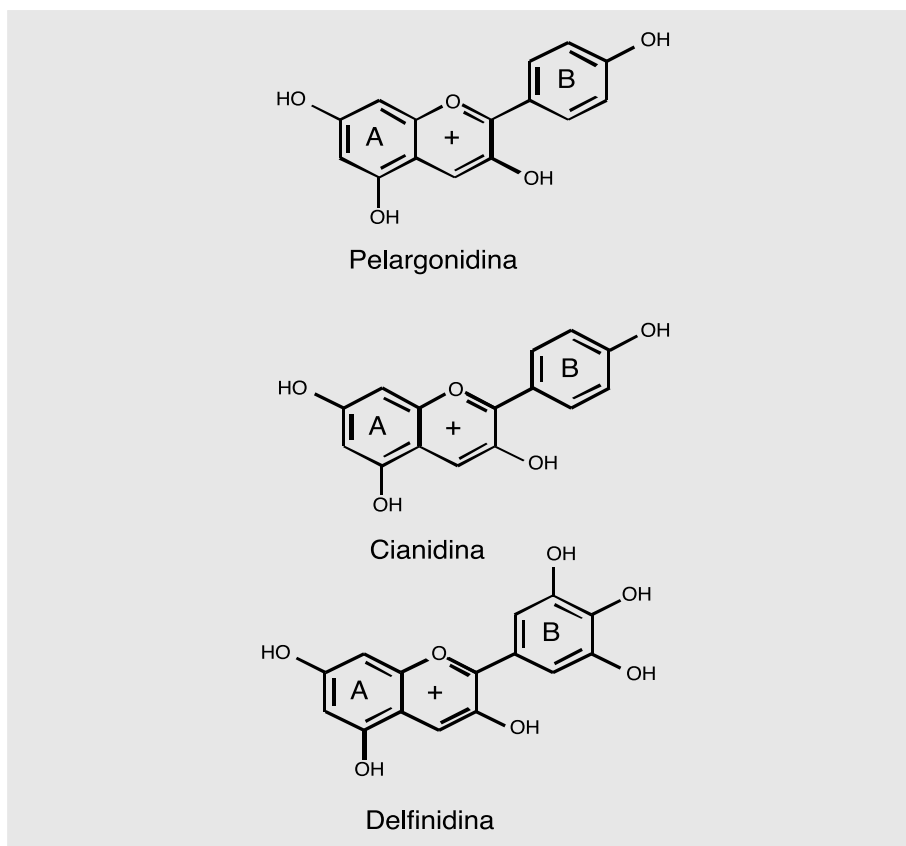
Por ejemplo *C. limon*, acumula escoparona tras la inoculación con *Penicillium digitatum*, pero no tras la infección con *Geotrichum candidum*. La infección de tangelo Nova, *C. aurantium* y *C. paradisi* con *Phytophthora parasitica* aumenta los niveles de escoparona envuelta en los mecanismos de defensa de esos *Citrus* contra el hongo, tal y como ha sido descrita para otras especies de *Citrus* infectadas con *Phytophthora citrophthora*, ó *Penicillium digitatum*.

D) Antocianinas

Las antocianinas (Figura 6.8), que constituyen en otros conjuntos de plantas un importante grupo de pigmentos en flores y frutos, son muy escasas en este género, ya que sólo se ha descrito su presencia en algunas especies de naranjas sanguinas.

Las antocianinas son pigmentos solubles en agua, responsables en su mayor parte de la atractiva coloración que muestran un gran número de flores, hojas, frutos, zumos de frutas y vinos. Pertenecen a un amplio grupo de compuestos glicosilados presentes en las células de dichos órganos ve-

FIGURA 6.8.
ESTRUCTURA DE LAS ANTOCIANIDINAS PELARGONIDINA,
CIANIDINA Y DELFINIDINA



getales. Sus estructuras libres de la porción formada por una o más moléculas de azúcares se denominan antocianidinas. La constitución estructural común de todas las antocianidinas es el catión 2-fenilbenzopirilium o catión flavilium. Los modelos de hidroxilación de las antocianinas corresponden a tres esquemas básicos: pelargonidinas, cianidinas y delfidinas; las tres tienen en común la hidroxilación en las posiciones 3, 5, 7, y 4'.

Sus derivados metilados han sido ampliamente descritos en la naturaleza, generalmente en sus formas glicosiladas (antocianinas) conteniendo uno o más azúcares enlazados y, ocasionalmente, diversos radicales orgánicos de tipo ácido. Los radicales azucarados más comunes son: 3,5-dihexósidos, 3-ramnoglucósidos, 3-xiloglucósidos, 3-monohexósidos y grupos glicósido-acilados.

Las antocianinas muestran a veces modificaciones en su capacidad de pigmentación o en sus propiedades en general, debido a la presencia simultánea de otros compuestos de naturaleza similar, las proantocianidinas. Estos compuestos pueden convertirse en antocianinas mediante tratamiento ácido en caliente. Tras un período de controversia se les ha denominado finalmente leucoantocianidinas, a las proantocianidinas monoméricas cuya estructura base es el flavan-3,4-diol, y proantocianidinas condensadas a los diversos flavan-3-ol dímeros, trímeros y oligómeros.

6.3.1. Conceptos generales sobre su biosíntesis

El interés por el estudio de la biosíntesis de flavonoides surge con la especulación química del modo en que se forma el esqueleto carbonado de estos compuestos. Tras el descubrimiento del primer enzima que cataliza esta ruta denominada “ruta del fenilpropanoico”, fenilalanina amonioliase (PAL), quizás la enzima más estudiada en el metabolismo secundario en plantas; ya que está situada en un punto entre el metabolismo primario y el secundario y es un importante paso regulador en la formación de algunos compuestos fenólicos. El estudio enzimático sobre la síntesis de los flavonoides ha sido siempre complicado, por la dificultad en el proceso de aislamiento de dichos enzimas en las plantas superiores, debido a la relativa baja concentración, así como por la variación de la actividad de los enzimas del metabolismo secundario durante la mayoría de estados del crecimiento y desarrollo de las plantas.

En los últimos años, debido a una mayor capacidad para la obtención de preparaciones estables del enzima clave en la biosíntesis de flavonoides, la chalcona sintetasa, así como por el uso de un buen número de flores de diversas especies vegetales, como fuentes de los enzimas implicados en estas rutas de biosíntesis, y mediante el uso de sustratos marcados con ^{14}C (particularmente naringina y dihidrokamferol), se ha progresado considerablemente en la definición de las rutas de biosíntesis de flavonoides.

Por otro lado, el uso de cultivos celulares ha complementado, o a veces sustituido, a los estudios *in vivo* y en este sentido ha sido muy ventajosa la información genética que se ha obtenido sobre la síntesis de flavonoides.

Además, en esta última década se ha conseguido un aumento en la capacidad de detección de las actividades enzimáticas en extractos celulares, y al mismo tiempo, el desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ha permitido una mejor separación, identificación y cuantificación tanto de sustratos como de productos en el estudio de estas reacciones.

Mediante el uso de productos marcados, se ha podido avanzar en el estudio sobre el origen de los flavonoides a partir del metabolismo primario. Básicamente el anillo A de un flavonoide estaría formado por la condensación de tres moléculas de acetato, mientras que el anillo B, así como los átomos de carbono 2, 3 y 4, procederían del precursor fenilpropano, derivado del ácido siquímico.

Se ha confirmado que los ésteres CoA del ácido malónico y de los diversos ácidos cinámicos son los dos sustratos reales de la reacción de condensación que conduce a la formación del esqueleto carbonado de un flavonoide.

En la Figura 6.9 se describe de una forma general las posibles rutas de biosíntesis de las diversas clases de flavonoides a partir de la ruta del ácido siquímico.

Dicha ruta se da en plantas, hongos y bacterias pero no se ha descrito en animales. Los animales no sintetizan los tres aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) los cuales son, por lo tanto, nutrientes esenciales en rutas animales.

Así mismo, en la Figura 6.10 se describe de forma simplificada la ruta biosintética de los flavonoides mayoritarios en *Citrus limon*, como son la flavona diosmina (Figura 6.9) y las flavanonas hesperidina y eriocitrina (Figura 6.12).

Este complejo entramado de actividades enzimáticas y mecanismos de biosíntesis está regulado por un variado conjunto de factores. La presencia de algunos flavonoides en determinadas plantas hace que sean considerados como auténticos constituyentes de las mismas; su aparición estaría controlada por factores endógenos durante el desarrollo normal de la planta, que modularían la aparición de las diversas actividades enzimáticas ya descritas. Pero, en múltiples ocasiones la síntesis de flavonoides es inducida por factores externos, como la fotoinducción, sobre todo la luz UV, o los efectos de diversos tipos de estrés, como la inducción a través de infecciones fúngicas y microbianas.

FIGURA 6.9.

RUTA SIMPLIFICADA DE LA BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES Y OTROS COMPUESTOS FENÓLICOS EN PLANTAS, DENOMINADA RUTA DEL ÁCIDO SIQUÍMICO

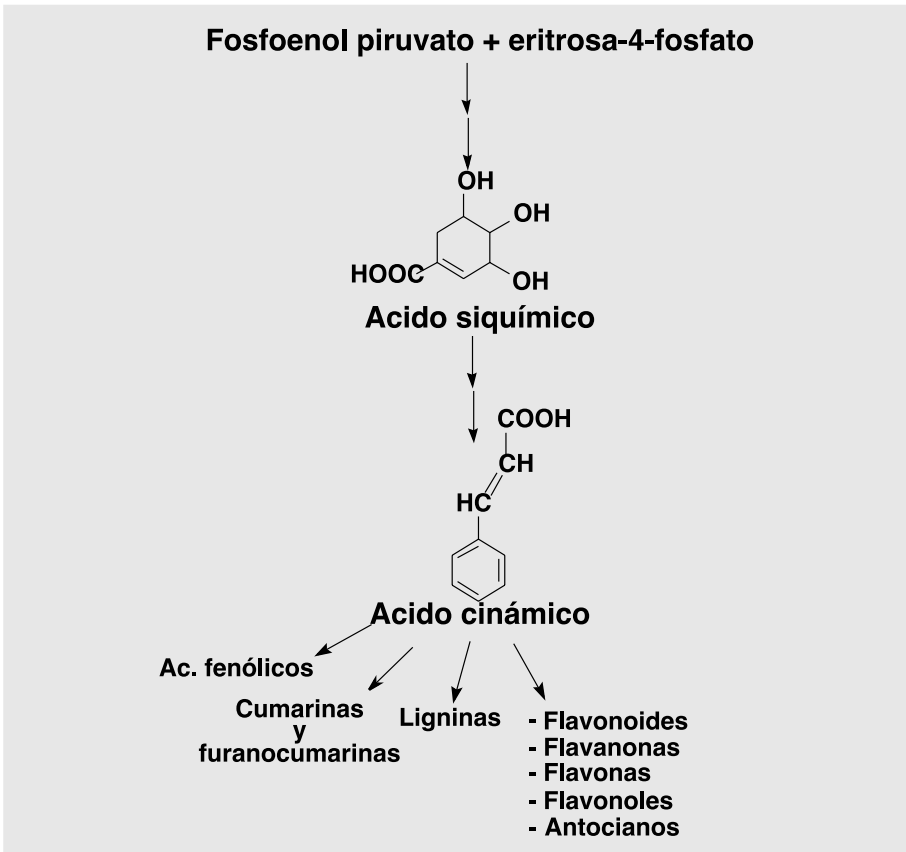
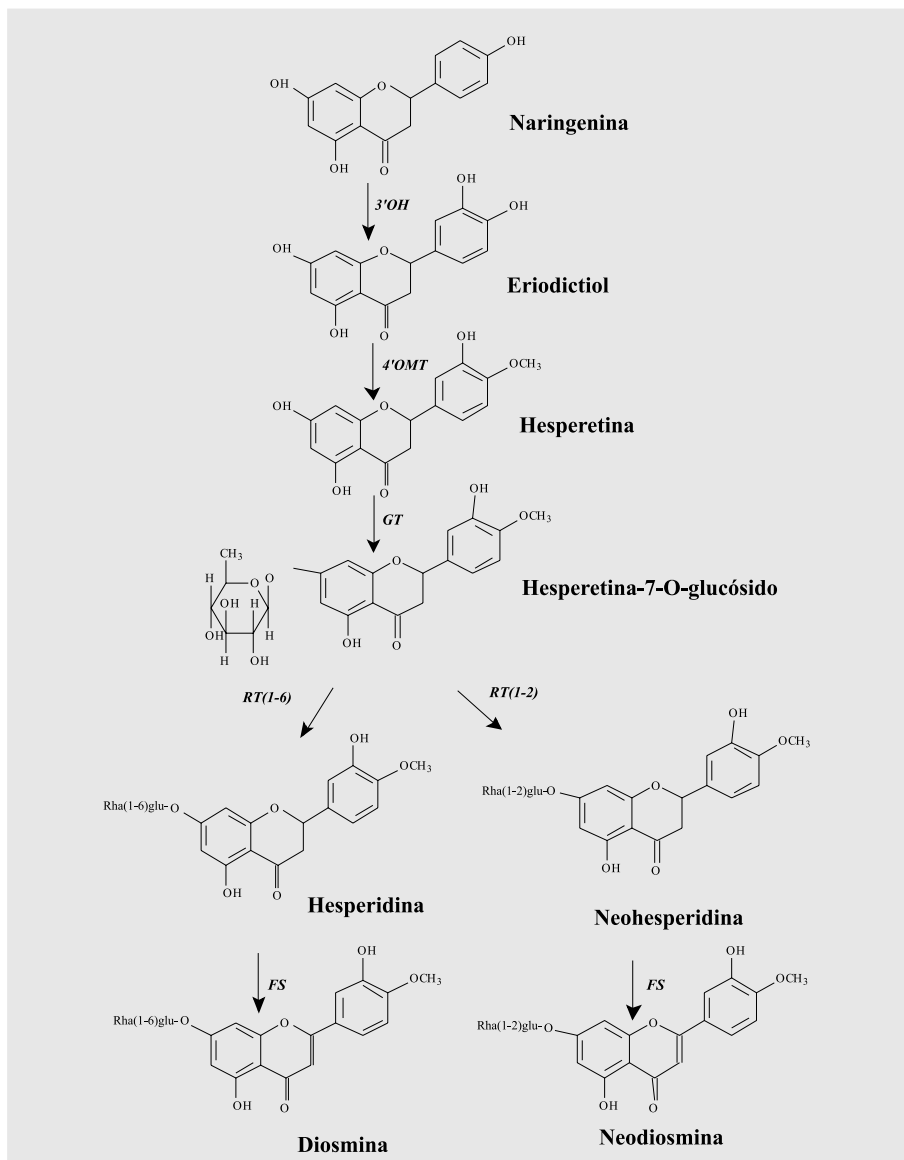


FIGURA 6.10.
ESQUEMA SIMPLIFICADO DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LOS FLAVONOIDES MAYORITARIOS EN CITRUS LIMON: DIOSMINA, HESPERIDINA Y ERIOCITRINA. SIENDO 3'OH: 3-HIDROXILASA, GT: GLUCOSILTRANSFERASA, 4'OMT: 4'O-METILTRANSFERASA, RGT: RAMNOSILGLUCOSILTRANSFERASA, FS: FLAVONA SINTETASA



Durante mucho tiempo los flavonoides, junto con otros metabolitos secundarios de las plantas han sido considerados como productos “finales”, metabólicamente inactivos y almacenados como materiales superfluos en diversos tejidos de la planta. Este concepto, basado en la asunción de que estos constituyentes de las plantas no representan energía potencial bioquímicamente aprovechable, no considera el aspecto dinámico de este metabolismo y muestra una evidente escasez de datos experimentales. Actualmente es conocido que todas las células producen una continua síntesis de polifenoles, lo cual nos lleva a considerar el estudio de lo que se denomina fenómeno de “creación-continua” y “turnover” de flavonoides, cuya concentración estaría sujeta a la variación de sus velocidades de síntesis y degradación.

La concentración de metabolitos de naturaleza flavonoide en estado estacionario, es muy baja, por lo que deben ser los procesos de interconversión y de polimerización los que determinan mayoritariamente el fenómeno de “creación-continua” de los flavonoides. En algunas especies vegetales como en los cítricos, se observa un incremento de flavonoides hasta un determinado nivel a partir del cual se mantiene constante durante el largo período de crecimiento, debido a que las velocidades de síntesis y turnover son similares, o debido a que la actividad enzimática que genera el flavonoide desaparece, según la especie. Diversos factores externos (ambientales) e internos (hormonales), influyen sobre el nivel de flavonoides en los tejidos de las plantas, modificando la maquinaria biosintética, o actuando sobre las velocidades de turnover o degradación. En general, existe una escasa extensión de los procesos catabólicos de flavonoides en *Citrus*.

6.3.2. Funciones fisiológicas en las plantas y aplicaciones

Dentro del metabolismo secundario de las plantas, los compuestos biológicamente más activos suelen ser los nitrogenados, debido a su carácter básico con una fuerte afinidad por grupos ácidos. En contraste, los anillos fenólicos pueden reaccionar únicamente con grupos receptores específicos, generalmente mediante puentes de hidrógeno. Sin embargo, la presencia de diversos sustituyentes en dichos anillos fenólicos mejora sustancialmente sus características de solubilidad, permitiendo incluso fáciles desplazamientos a través de las membranas biológicas. En un amplio rango de fenómenos biológicos, los flavonoides juegan un papel importante en la regulación de la bioquímica de la planta, sobre todo debido a la alteración de las propiedades de las membranas celulares.

La potencial reactividad biológica de los flavonoides, está basada en su comportamiento químico por su solubilidad, coeficiente de extinción, resonancia, constantes de ionización y reactividad con metales pesados. De esta manera distintos flavonoides difieren en estructura y grado de sustitución así como en su nivel de reactividad con un receptor biológico de membrana, con un enzima en particular o con otros compuestos de bajo peso molecular. Es imposible definir una única función biológica para todos los flavonoides, si relacionamos todas las variables biológicas de los mismos.

Se ha determinado el papel de los flavonoides en el crecimiento y desarrollo de la planta, mediante la aplicación exógena de éstos, observándose efectos estimuladores o inhibidores de crecimiento, lo que en definitiva podría interpretarse como una implicación de los mismos en tales mecanismos regulatorios. De todas las acciones en las que se encuentran implicados los flavonoides, se conoce la participación de los flavonoides en la respiración, bloqueando e inhibiendo la síntesis de ATP. Por otro lado, pueden ser oxidados por ciertos enzimas, y las sustancias quinónicas formadas pueden influir en el nivel de ácido ascórbico ya que son antioxidantes para este ácido. Es también importante su propiedad como quelantes y de interacción con grupos SH afectando a membranas y enzimas, y de esta forma podrían influir indirectamente sobre la permeabilidad y el transporte en la célula. La presencia de flavonoides en determinados homogenados de material vegetal puede interferir e incluso inhibir, ciertas actividades enzimáticas, como fenolasas, deshidrogenasas, descarboxilasas, e incluso ribonucleasas.

De la gran diversidad de flavonoides, flavonoides glicosilados, y de las posibles estructuras derivadas, se ha establecido que los modelos de glicosilación, hidroxilación metilación y tipo de enlace C₂-C₃ afectan a la actividad fisiológica de los mismos.

En general los flavonoides constituyen un gran grupo de pigmentos, con una elevada absorbancia, entre 250-290 nm. Flavonas y flavonoles absorben significativamente además en el rango entre 330-350 nm, y las antocianinas absorben entre 520-560 nm.

La reactividad química y las propiedades de solubilidad de los flavonoides glicosilados, así como su predisposición para formar complejos con ciertas proteínas, aseguran que algunos de ellos pueden causar cambios metabólicos, incluso a través de rutas inespecíficas, cuando son aplicados a plantas. Además, pueden interaccionar como cofactores de determinados enzimas en reacciones que requieren fenoles hidroxilados como aceptores de electrones.

Los cambios producidos durante el desarrollo de la planta son atribuidos a las hormonas reguladoras del mismo, aunque en algunos últimos estudios de aplicación de flavonoides se ha observado que no es siempre posible separar los efectos debido al flavonoide y a la acción hormonal. Este hecho podría estar debido a la existencia de ciertas interacciones entre los flavonoides, el ácido indolacético (AIA) y los enzimas que catalizan su oxidación.

Por otro lado un papel ecológico de los flavonoides como pigmentos, sería el de favorecer la fecundación de ciertas flores al atraer a pájaros e insectos. La especificidad de su olor determina incluso la naturaleza del agente polinizador.

Finalmente, muchos compuestos fenólicos y entre ellos algunos flavonoides considerados habituales en tejidos vegetales no infectados, se acumulan en cantidades importantes en zonas de la planta donde se produce una infección. En este sentido se ha determinado una relación entre el contenido en flavonoides de ciertas plantas y su resistencia, considerando el papel de éstos como agentes antifúngicos, y verdaderas fitoalexinas.

El posible papel de los fenoles en la fisiología de las plantas es aún motivo de estudio. La regulación por estos compuestos de varios estados fisiológicos, se basa en varias hipótesis, como son los efectos causados tras el suministro exógeno de compuestos fenólicos (estudios *in vitro*), y la observación de variaciones en el metabolismo que precede o acompaña a los sucesos fisiológicos que tienen lugar en la planta, así como la revelación de las modificaciones en los niveles de ciertos fenoles durante la aplicación de varios estímulos sobre las respuestas en crecimiento y desarrollo.

Aunque la mayoría de las presunciones están a favor de la participación potencial de los compuestos fenólicos en los procesos de desarrollo, no existe una observación correlacionada *in vivo* con la obtención de inhibiciones o estimulaciones realizadas *in vitro* como prueba absoluta de la participación de esos compuestos en el funcionamiento normal de las células.

6.3.2.1. Papel antioxidante de los flavonoides

La oxidación lipídica es una de las causas principales del deterioro de la calidad de los alimentos, después de las alteraciones producidas por los microorganismos. Dicha oxidación inicia cambios que afectan a su calidad nutricional, al color, sabor y textura.

Las industrias alimentarias intentan evitar la oxidación de los alimentos mediante diferentes técnicas, como es el envasado a vacío y/o uso de recipientes opacos. Los antioxidantes son los principales ingredientes para proteger la calidad de los alimentos evitando el deterioro oxidativo de los lípidos, lo que implica el desarrollo de sabores y olores desagradables.

La mayoría de los productos grasos tienen sus propios antioxidantes naturales, aunque muchas veces estos se pierden durante el procesado (refinado de los aceites, por ejemplo), pérdida que debe ser compensada. Las grasas vegetales son en general más ricas en sustancias antioxidantes que las animales.

Por otra parte, la tendencia a aumentar la insaturación de las grasas de la dieta, como una forma de prevención de las enfermedades coronarias hace necesario el uso de antioxidantes, debido a que las grasas insaturadas son mucho más sensibles a los fenómenos de oxidación.

La aplicación de antioxidantes requiere un conocimiento básico de la química de los aceites y grasas, del mecanismo de oxidación y de la función de los antioxidantes para evitar este tipo de transformación. Un hecho a destacar es que los antioxidantes son más efectivos en productos de buena calidad, que en productos muy alterados, por tanto su adición se debe de realizar durante las primeras etapas de elaboración de los productos.

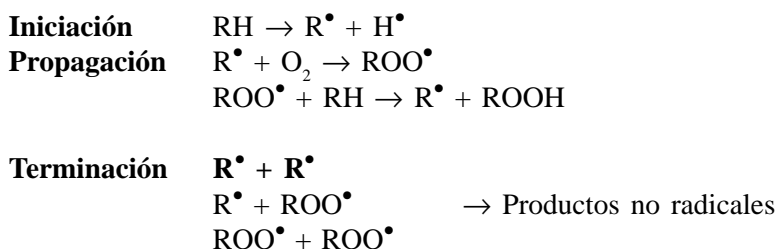
Los componentes principales de las grasas son mezclas de triglicéridos y ácidos grasos saturados o insaturados de larga cadena. Los ácidos grasos vegetales son insaturados, como oleico o linoléico, mientras que las grasas animales son saturadas, como por ejemplo el palmítico y esteárico.

Debido a que la velocidad de autooxidación depende del número de dobles enlaces en la molécula, se podría pensar que las grasas animales son más estables. Sin embargo, las vegetales contienen cantidades significativas de tocoferoles, los cuales son antioxidantes naturales, por lo que las grasas animales al carecer de tocoferoles u otro antioxidante endógeno, se oxidan más rápidamente que lo que podría esperarse de su composición química.

A la hora de hablar de los mecanismos de oxidación lipídica, hay que distinguir entre oxidación química o enzimática (lipoxigenasa). Esta última no se ve afectada por antioxidantes, y únicamente se puede evitar mediante tratamiento térmico.

La autoxidación de los lípidos poliinsaturados implica reacciones en cadena de radicales libres, los cuales se generan inicialmente por exposición de lípidos a la luz, calor, radiaciones ionizantes, iones metálicos o por acción de metaloproteínas tales como la lipooxigenasa. La clásica ruta de autoxidación incluye la iniciación (producción de radicales libres de lípidos), propagación y terminación (síntesis de productos no radicales).

La iniciación tiene lugar por oxidación del carbono adyacente a un doble enlace.



El intermedio que resulta de esas reacciones de radicales libres son los hidroperóxidos. Estos intermedios son inestables y su descomposición está acelerada por la presencia de trazas de Fe y Cu. Dichos intermedios se estabilizan formando aldehídos, cetonas, alcoholes, o hidrocarburos de cadena corta, dando un sabor y olor a rancio.

Este conjunto de reacciones está acelerado por la presencia de agua, ya que ésta actúa como solvente de trazas metálicas que actúan a su vez como prooxidantes.

Los antioxidantes pueden interferir con el proceso de oxidación al reaccionar con los radicales libres, con la catálisis metálica, y también por actuar como captadores de oxígeno.

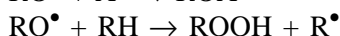
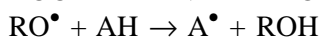
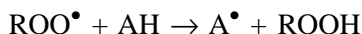
Un antioxidante es definido como el compuesto capaz de evitar o retrasar los procesos de autoxidación, o los antioxidantes son sustancias usadas para conservar los alimentos retardando el deterioro, enranciamiento o la decoloración debido a la oxidación. Las sustancias sinérgicas son aquellas que exaltan la actividad antioxidante, sin que ellas per se tengan dicha propiedad.

De acuerdo a su modo de acción, los antioxidantes se pueden clasificar como reductores de radicales libres, quelatantes de iones metálicos, o

captadores de oxígeno. Así, los antioxidantes primarios reaccionan con radicales excitados de lípidos para convertirlos en especies termodinámicamente estables. Los antioxidantes secundarios, también conocidos como antioxidantes preventivos, funcionan como retardando la iniciación de la cadena por descomposición de los hidroperóxidos. Los antioxidantes fenólicos son incluidos en la categoría de terminadores de radicales libres.

6.3.2.1.1. *Mecanismos de acción de los antioxidantes fenólicos*

El primer estudio cinético detallado de actividad antioxidante fue realizado en 1947, postulándose las siguientes reacciones para los antioxidantes finalizadores de radicales libres.

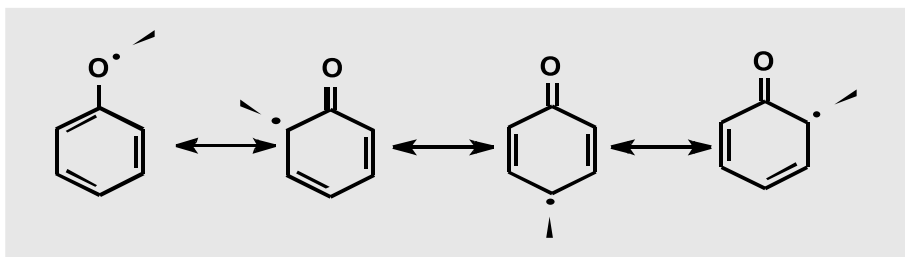


El antioxidante fenólico (AH) interfiere con la oxidación del lípido mediante donación de un átomo de hidrogeno a los radicales del lípido. Las reacciones últimas compiten con las reacciones de propagación en cadena.

Dichas reacciones son exotérmicas, donde la energía de activación se incrementa con la energía de disociación de los enlaces A-H y R-H. Así, la eficacia de los antioxidante A-H se incrementa cuando desciende la fuerza de enlace A-H. El radical fenoxi resultante no debería iniciar la formación de un nuevo radical o se debería estabilizar rápidamente. En este sentido, los antioxidantes fenólicos son excelentes donadores de electrones o de hidrógeno, y además sus radicales intermedios son relativamente estables debido a la deslocalización por resonancia, y de disponer de múltiples sitios para el ataque por oxígeno molecular.

El radical fenoxi formado por reacción de un fenol con un radical lipídico se estabiliza por deslocalización de los electrones desapareados (Figura 6.11), alrededor del anillo aromático. Sin embargo, el fenol por si mismo es inactivo como antioxidante. La sustitución de los átomos de hidrógeno en las posiciones orto y para con grupos alquilo, incrementa la densidad electrónica del principal OH mediante un efecto inductivo, aumentando la reactividad

FIGURA 6.11.
MECANISMO DE ESTABILIZACIÓN DEL RADICAL FENÓLICO



frente a los radicales lipídicos. La sustitución en la posición para con un grupo etilo o n-butilo, más que un grupo metilo, incrementan la actividad antioxidante, sin embargo la presencia de cadenas o grupos alquilo en la cadena decrece la actividad antioxidante.

La estabilidad del radical fenoxi se incrementa con grupos voluminosos en la posición orto ya que esos sustituyentes incrementa la estabilidad del radical y reducen la velocidad de las reacciones de propagación en cadena. La introducción de un segundo grupo hidroxilo en el fenol incrementa la actividad antioxidante. La actividad antioxidante de derivados de dihidroxi-bencenos es particularmente debida al hecho de que el radical semiquinoide, producido inicialmente, se puede oxidar rápidamente a quinona mediante la reacción con otro radical lipídico. La actividad de 2-metoxifenol es mucho mas baja que la de catecol, el cual posee dos grupos hidroxilos libres. Este hecho es debido a que los 2-metoxifenoles son incapaces de estabilizar el radical fenoxi mediante puentes de hidrógeno.

Sin olvidar una de las múltiples aplicaciones de los flavonoides en la industria Agroalimentaria como aditivos, protegiendo a los aceites y grasas de la peroxidación, así como por su capacidad para proveer un sabor dulce o amargo (flavanonas), las principales propiedades de los flavonoides están relacionadas con la salud y se basan en su actividad antioxidante. Dentro de estas propiedades incluimos actividades antivirales, anticarcinogénicas, cardioprotectivas y antiinflamatorias, así como sus destacados efectos mejorando la fragilidad capilar e inhibir la agregación plaquetaria. Por su poder antioxidativo son utilizados como drogas terapéuticas para desastres geriátricos como la lipoxidación oxidativa, arteriosclerosis, etc.

Además, algunos estudios han demostrado que algunos polifenoles específicos, como los flavonoides caracterizados por una estructura benzo- γ -pirona (siendo la quercetina la más estudiada) actúan como antioxidantes en los sistemas biológicos, captando radicales superóxido, radicales hidroxilo, reduciendo los radicales lipoperoxyl, inhibiendo la peroxidación lipídica ó bien actuando como quelantes de iones Cobre (Cu^{+2}) e hierro (Fe) a través de su estructura orto di-hidroxi fenilo. Dependiendo de su estructura, los polifenoles actúan bien como antioxidantes donantes de hidrógeno, bien como quelantes de iones metálicos previniendo la formación catalizada de metales en la iniciación de especies radicales. Actualmente existen contradicciones al considerar las relaciones existentes entre la capacidad quelante y las propiedades como captadores de radicales de los flavonoides, y la relativa contribución de su estructura química a la actividad antioxidante.

Dentro de los fenoles, los potenciales de reducción de los flavonoides son más bajos que los radicales peroxyyl alquil y el radical superóxido, lo cual significa que los flavonoides pueden inactivar esas especies oxyl y prevenir las consecuencias indeseables de sus reacciones.

Los diferentes puntos en los cuales los flavonoides pueden ejercer su acción antioxidante son:

1. Actividad antiradical hidroxil ($\bullet\text{OH}$).
2. Actividad antilipoperoxidante (alquil, $\text{R}\bullet$; peroxi $\text{ROO}\bullet$; alcoxi $\text{RO}\bullet$).
3. Actividad antioxígeno (O_2 , $^1\text{O}_2$).
4. Actividad antiradical superóxido, ($\text{O}_2\bullet$).
5. Actividad quelante de metales.

La capacidad antioxidante de una sustancia en general, depende de dos principios: una alta reactividad contra diferentes radicales, es decir, cuando están presentes en bajas concentraciones relativas al sustrato que va a ser oxidado, pueden impedir, retrasar o prevenir la autooxidación de radicales libres mediados en la oxidación del sustrato, y el segundo, el “radical antioxidante” intermedio formado debe ser estable.

La formación de los radicales libres está asociada con el metabolismo natural de las células aeróbicas, de forma que el consumo de oxígeno da

lugar a una serie de radicales de oxígeno (superóxido, hidroxil y lipoperóxidos) los cuales pueden ser bloqueados, y/o extinguidos por compuestos como los polifenoles, y particularmente los flavonoides por sus características estructurales. Conjuntamente a una habilidad en la captura de electrones, esas características aportan estabilidad al radical formado mediante una dislocación tautomérica, la cual previene la propagación en cadena de esos radicales de oxígeno. De esta manera, los flavonoides tienen un marcado efecto en la formación de $\bullet\text{OH}$ *in vivo* lo cual es importante en la respuesta de las plantas a la infección viral.

Hay tres criterios químicos para la captura efectiva de radicales por polifenoles, estas son:

1. La presencia de estructuras *O*-dihidroxi (catecol) en el anillo B el cual le confiere alta estabilidad a la forma radical, posiblemente a través de un puente de hidrógeno, y participa en la deslocalización del electrón.
2. Un doble enlace en 2-3 en conjugación con la función 4-oxo en el anillo C, la cual es responsable de la deslocalización del anillo B.
3. La presencia de los grupos 3 y 5-OH con función 4-oxo en el anillo A y C para un máximo potencial captador de radicales y una fuerte absorción de radicales. La presencia o ausencia de grupo 5-hidroxil puede tener una influencia decisiva en la conformación del flavonoide ya que introduce un componente estereoisomérico en la capacidad de dislocación del electrón y por tanto en la estabilidad de los radicales aroxil del flavonoide.

Obviamente, la capacidad antioxidante de los flavonoides será el resultado de la combinación de esas características estructurales, la cual no será igual o mostrará el mismo grado de efectividad hacia cada uno de los radicales descritos, sino que dependerá de los diferentes mecanismos de acción que tendrán lugar en cada caso en particular. Esos mecanismos estarán influenciados por factores estructurales como la presencia o ausencia de moléculas glicósidos en los esqueletos flavonoide (glicósidos o aglicones), el lugar de glicosilación, número y posición de los grupos hidroxilo libres, hidroxilos esterificados, etc. Así los flavonoles (quercetina) son más efectivos que los flavanoles (catequina) por cumplir todos los requerimientos descritos, mientras que, naringenina, apigenina y kaempferol son antioxidantes menos eficaces.

6.3.2.2. *Papel protector de los fenoles sobre el ácido indol-3-acético (AIA)*

Los compuestos fenólicos pueden actuar en el crecimiento de los frutos a través de interacciones con las fitohormonas. La mayoría de los trabajos realizados durante las últimas dos décadas se han concentrado principalmente en las relaciones entre polifenoles y el metabolismo auxínico. Principalmente conciernen a la degradación de auxinas, el transporte polar, y el balance entre formas libres y conjugadas.

Numerosos trabajos *in vitro*, demuestran un efecto antagonista o estimulante de los compuestos fenólicos en la degradación de la auxina por AIA-oxidasa. De hecho existen contradicciones causadas en particular por las diferentes concentraciones usadas y así los resultados obtenidos muestran que los *o*-difenoles (como rutina, quercetina y ácido caféico) son inhibidores de la actividad AIA-oxidasa, mientras que, en contraste los monofenoles (derivados de *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzoico, ácidos vanílico, etc.) son activadores. Por otra parte, ciertos compuestos *o*-difenoles, como el ácido clorogénico, son mejores sustratos para AIA-oxidasa que la auxina, y pueden de esta manera ser muy efectivos en la protección de la auxina. Todos estos resultados se han obtenido *in vitro* y las correlaciones con las condiciones *in vivo* son siempre muy delicadas. De cualquier forma, las hipótesis demuestran que el crecimiento de los frutos está ligado con sus relativos contenidos de mono- y *o*-difenoles.

Los datos experimentales sobre la variación de mono y difenoles durante el crecimiento de los frutos son escasos. En este sentido, se ha descrito que el alto contenido en AIA en frutos jóvenes de tomate, desciende 20 días tras la anthesis, al mismo tiempo que la relación de mono/difenoles (M/D) aumenta rápidamente al principio, y después más despacio. El rápido aumento en esta relación, precede a una caída en el nivel de AIA y un aumento en la actividad peroxidasa, y particularmente AIA-oxidasa, la cual aparece en tomate al final del crecimiento y durante la maduración.

Paralelamente, hacia el final del primer periodo de crecimiento de los frutos cítricos, cuando las divisiones celulares cesan casi completamente, y comienza el crecimiento interno del fruto, muchos componentes como los ácidos ascórbico y dehidroascórbico, la flavanona hesperidina, y muchos sistemas enzimáticos como peroxidasa, catalasa, indol-3-acético oxidasa (AIA-oxidasa) y el ácido ascórbico oxidasa llegan a los máximos valores y actividades, en frutos de naranja y tangelo Nova. Las flavanonas en *Citrus* están

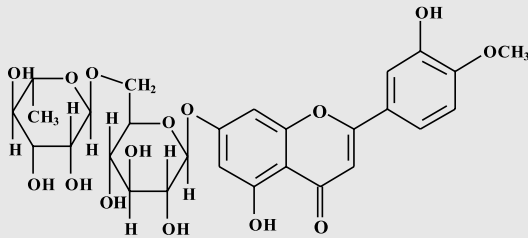
presentes en altas concentraciones en frutos en crecimiento, pero su relación fisiológica con el desarrollo del fruto no ha sido apenas investigada.

6.3.2.3. Aplicaciones farmacológicas

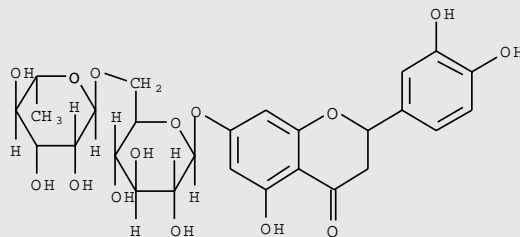
Como ya se ha comentado anteriormente, la hesperidina es la flavanona mayoritaria en limón, representando entorno a un 68% respecto del contenido total flavónico, mientras que la flavona diosmina y la flavanona eriocitrina representan respectivamente el 3% y 1%. Otros compuestos fenólicos presentes en limón representan el 28% respecto al contenido total flavónico.

La flavanona hesperidina, influye sobre la permeabilidad vascular, aumentando la resistencia capilar, con un efecto analgésico y antiinflamatorio, es también un efectivo antioxidante ya que captura los radicales libres de oxígeno, los cuales están implicados en la carcinogénesis.

FIGURA 6.12.
ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA FLAVONA DIOSMINA Y DE LA
FLAVANONA ERIOCITRINA



Diosmina



Eriocitrina

La flavona diosmina (Figura 6.12) es otro flavonoide importante en limón. Este compuesto tiene importantes aplicaciones farmacológicas, siendo el componente activo de ciertas medicinas empleadas en el tratamiento de varias enfermedades del sistema circulatorio, mejora el tono muscular, la resistencia vascular y las afecciones inflamatorias, por lo que se emplea en el tratamiento de enfermedades como la insuficiencia venosa crónica y la artritis reumática. Esta flavona posee propiedades antiinflamatorias, antihemorroidales, antioxidantes, antiperoxidación lipídica, y de protección frente a radicales libres.

La flavanona eriocitrina (Figura 6.12) es muy abundante en limón y en lima, encontrándose en muy pocos otros frutos cítricos. Obtenida a partir de la piel de estos cítricos, es utilizada en numerosos complejos multivitamínicos, los cuales resaltan la capacidad de los "bioflavonoides" para mantener la integridad capilar y la circulación periférica por sus propiedades antioxidantes. Dada la gran estabilidad de este compuesto antioxidante durante el procesamiento y almacenamiento de los zumos, es utilizada en la preparación de productos alimenticios. Eriocitrina posee la actividad más antioxidante de todos los flavonoides glicósidos presentes en frutos de limón.

6.4. FLAVONOIDES MAYORITARIOS EN *CITRUS LIMON*

6.4.1. Niveles en hojas, tallos y flores

Hesperidina es la flavanona mayoritaria en los cultivares de limón estudiados ("Fino-49", "Eureka", "Lisbon" y "Verna") así como en los diferentes órganos (Tabla 6.2). En flores, se observa para esta flavanona niveles semejantes para los cuatro cultivares, estando en torno a 5g/100g peso seco. Los niveles de diosmina y eriocitrina obtenidos en flores son inferiores, oscilando entre 0,3-0,4 g/100 g peso seco y entre 0,06-0,08 g/100g peso respectivamente, para los cuatro cultivares estudiados.

El estudio de los niveles de flavonoides presentes en los tallos jóvenes y hojas jóvenes de los cuatro cultivares revela que, los niveles de hesperidina en tallos son similares o algo inferiores a los detectados en las hojas mientras que los niveles de diosmina y eriocitrina en tallos son inferiores a los detectados en hojas (Tablas 6.2) siendo en las hojas del cultivar "Eureka" donde se encuentran los mayores niveles de diosmina (1,91g/100g peso seco) y Eriocitrina (0,51g/100g peso seco).

TABLA 6.2.
 NIVELES DE HESPERIDINA, DIOSMINA Y ERIOCITRINA EN HOJAS
 JÓVENES, TALLOS JÓVENES Y FLORES DE CITRUS LIMON
 (“LISBON”, “EUREKA” “FINO-49” Y “VERNA”). LOS DATOS
 SE EXPRESAN EN G/100G DE PESO SECO \pm ES (N = 3)

		Flavonoides (g/100 g Peso seco)		
<i>Citrus limon</i>		HESPERIDINA	DIOSMINA	ERIOCITRINA
“Lisbon”				
	Hojas jóvenes	6,98 \pm 1,83	1,79 \pm 0,09	0,37 \pm 0,11
	Tallos jóvenes	7,00 \pm 0,86	0,50 \pm 0,05	0,17 \pm 0,02
	Flores	5,53 \pm 0,05	0,34 \pm 0,03	0,06 \pm 0,01
“Eureka”				
	Hojas jóvenes	9,23 \pm 2,16	1,91 \pm 0,45	0,51 \pm 0,20
	Tallos jóvenes	6,94 \pm 1,00	0,60 \pm 0,12	0,18 \pm 0,03
	Flores	5,95 \pm 0,60	0,37 \pm 0,04	0,08 \pm 0,01
“Fino-49”				
	Hojas jóvenes	4,99 \pm 3,35	1,61 \pm 0,76	0,29 \pm 0,11
	Tallos jóvenes	5,46 \pm 2,34	0,44 \pm 0,13	0,15 \pm 0,04
	Flores	5,23 \pm 0,62	0,33 \pm 0,04	0,07 \pm 0,01
“Verna”				
	Hojas jóvenes	6,02 \pm 2,30	1,51 \pm 0,62	0,32 \pm 0,21
	Tallos jóvenes	6,00 \pm 1,03	0,54 \pm 0,12	0,12 \pm 0,03
	Flores	5,03 \pm 0,20	0,40 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01

6.4.2. Niveles y distribución en el fruto

Los niveles de hesperidina, diosmina y eriocitrina presentes en diferentes etapas del desarrollo de los frutos de limón (“Fino-49”, “Eureka”, “Lisbon” y “Verna”) se expresan en la Tabla 6.3.

En ella se observa un paralelismo en la evolución de hesperidina y diosmina en los cuatro cultivares, aunque con niveles diferentes (hesperidina suele ser 10 o más veces superior a diosmina). Este paralelismo entre ambos flavonoides es debido a que la flavanona hesperidina es el precursor de la flavona diosmina.

Desde la formación del fruto recién cuajado hasta la formación de frutos inmaduros se observa un incremento en los niveles de hesperidina, como la flavanona mayoritaria, hasta alcanzar niveles máximos: más del 30% del peso seco en frutos inmaduros, en “Lisbon”, “Fino-49” y “Verna”; mientras

que en el cultivar “Eureka”, la hesperidina no llega al 30% del peso seco en frutos inmaduros. Sin embargo, a medida que se desarrolla el fruto hasta llegar al estado maduro, se comprueba que los niveles de hesperidina disminuyen hasta valores mínimos, comprendidos entre 0,6 a 0,9% del peso seco de frutos maduros (Tabla 6.3).

La diosmina, presenta un comportamiento idéntico en los cuatro cultivares: un primer incremento en los niveles de esta flavona durante las primeras etapas de formación y crecimiento del fruto, hasta alcanzar un determinado nivel máximo (sobre 1,5-2% del peso seco de frutos inmaduros), para después, disminuir en el caso de frutos maduros de “Fino-49” (0,3% del peso seco de frutos maduros) y más acusadamente para el caso de frutos maduros de “Verna”, “Eureka” y “Lisbon” (entorno a 0,2% del peso seco de frutos maduros) (Tabla 6.3).

La eriocitrina presenta un comportamiento diferente, ya que tiende a acumularse durante el proceso de maduración de los frutos en los cuatro cultivares “Fino-49”, “Eureka”, “Lisbon” y “Verna” (Tabla 6.3). En el cultivar “Fino-49” se alcanza un mayor nivel de eriocitrina desde el estado de fruto recién cuajado con 0,16 g/100 g peso seco hasta el estado de fruto maduro con 0,79 g/100 g peso seco, mientras que en Eureka, Lisbon y Verna se alcanzan niveles algo inferiores, comprendidos entre 0,50 a 0,65 g/100 g de peso seco (Tabla 6.3).

El mayor incremento en los niveles de eriocitrina coincide con la disminución de hesperidina y diosmina, siendo ambos procesos originados en el de fruto inmaduro (Tabla 6.3). Eriocitrina es una flavanona que se sintetiza en varias etapas anteriores a la síntesis de hesperidina y diosmina. A la vista de los resultados, se sugiere que la disminución de hesperidina y diosmina, se debe a la inactivación de los enzimas finales de la ruta de biosíntesis (4'-O-Metiltransferasa), activándose así los enzimas de rutas laterales como la Glucosiltransferasa dando lugar a eriocitrina.

En cuanto a la distribución de las flavanonas y flavona anteriormente descritas en el fruto, se puede decir que es heterogénea. Así, las flavanonas (hesperidina y eriocitrina) se encuentran en mayor concentración en el albedo (1,25 g/100g peso seco y 1,59 g/100g peso seco para hesperidina y eriocitrina, respectivamente), seguida por el flavedo (0,58g/100g peso seco y 0,66g / 100g peso seco, para hesperidina y eriocitrina, respectivamente) y pulpa (0,28g/100g peso seco y 0,25 g/100g peso seco para hesperidina y eriocitrina,

TABLA 6.3.

NIVELES DE HESPERIDINA, DIOSMINA Y ERIOCITRINA EN FRUTOS DE CITRUS LIMON (“LISBON”, “EUREKA”, “FINO-49” Y “VERNA”). LOS DATOS SE EXPRESAN EN G/100G DE PESO SECO ± ES (N = 3). FRUTOS RECIÉN CUAJADOS, INMADUROS Y MADUROS: DIÁMETRO ENTORNO A 2, 12 Y 60 MM, RESPECTIVAMENTE

		Flavonoides (g/100 g Peso seco)		
<i>Citrus limon</i>		HESPERIDINA	DIOSMINA	ERIOCITRINA
“Lisbon”				
	Recién cuajado	18,08 ± 0,19	1,02 ± 0,01	0,18 ± 0,02
	Inmaduro	39,62 ± 1,32	2,02 ± 0,20	0,22 ± 0,09
	Maduro	0,81 ± 0,02	0,16 ± 0,05	0,56± 0,01
“Eureka”				
	Recién cuajado	15,53 ± 0,17	0,92 ± 0,08	0,14 ± 0,01
	Inmaduro	28,70 ± 2,61	1,78 ± 0,08	0,33 ± 0,02
	Maduro	0,74 ± 0,04	0,28 ± 0,01	0,65 ± 0,03
“Fino-49”				
	Recién cuajado	15,61 ± 0,17	0,94 ± 0,08	0,16 ± 0,01
	Inmaduro	32,24 ± 1,01	1,49 ± 0,07	0,13 ± 0,02
	Maduro	0,59 ± 0,01	0,33± 0,04	0,79 ± 0,01
“Verna”				
	Recién cuajado	17,70 ± 0,80	1,00 ± 0,06	0,15 ± 0,02
	Inmaduro	38,80 ± 1,01	1,91 ± 0,07	0,26 ± 0,02
	Maduro	0,91 ± 0,01	0,25± 0,04	0,50 ± 0,01

respectivamente). Los niveles de éstas detectadas en el albedo son del orden de 2 veces superior a las detectadas en el flavedo y de 4-6 veces superiores a las detectadas en la pulpa (Tabla 6.4). Estos resultados con concordantes con los obtenidos por otros autores en relación a la distribución de hesperidina y eriocitrina en frutos de otros cultivares de limón. La flavona diosmina se distribuye de forma diferente, siendo el resultado casi proporcional entre flavedo (0,33g/100g peso seco) y albedo (0,20g/100g peso seco) (Tabla 6.4), destacando que en la pulpa sólo se aprecian niveles traza de diosmina (entorno a 0,04 g/100g peso seco), debido a que es una molécula menos soluble que las anteriores (más apolar).

TABLA 6.4.
*DISTRIBUCIÓN DE HESPERIDINA, ERIOCITRINA Y DIOSMINA
 EN DIFERENTES TEJIDOS DE FRUTOS MADUROS DE LIMÓN
 “FINO-49”. LOS DATOS SE EXPRESAN EN G/100G DE PESO SECO
 ± ES (N = 3)*

TEJIDO	HESPERIDINA	ERIOCITRINA	DIOSMINA
FLAVEDO	0,58 ± 0,12	0,66 ± 0,13	0,33 ± 0,08
ALBEDO	1,25 ± 0,27	1,59 ± 0,15	0,20 ± 0,06
PULPA	0,28 ± 0,06	0,25 ± 0,08	0,04± 0,001

6.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL ZUMO DE CITRUS LIMON (“FINO” Y “VERNA”)

Los zumos de limón de los cultivares “Fino” y “Verna” obtenidos mediante el sistema de extracción no industrial presentan una actividad antioxidante similar (Tabla 6.5). El zumo de limón “Fino” presenta una actividad antioxidante total equivalente a una disolución de 807,87 mg de ácido ascórbico/L y el de “Verna” de 780,52 mg de ácido ascórbico/L.

No obstante existen importantes diferencias en cuanto a la aportación que los diferentes componentes bioactivos hacen a la actividad antioxidante total (TAA). Así, mientras en el zumo de limón “Fino” el ácido ascórbico aporta aproximadamente un 66% de la actividad antioxidante total, siendo el producto responsable de la mayor parte de la actividad antioxidante, en el zumo de limón “Verna” es de aproximadamente un 33% (Tabla 6.5), datos que están en consonancia con el mayor contenido de ácido ascórbico en el zumo de limón “Fino” que en el de “Verna”. Los flavonoides aportan aproximadamente un 10 y 16% del TAA en los zumos de limón “Fino” y “Verna”, respectivamente, como cabe esperar de un mayor contenido en flavonoides del zumo de limón “Verna” con respecto al “Fino”. El porcentaje de TAA correspondiente a antioxidantes no cuantificados es de aproximadamente $\frac{1}{4}$ del total en el zumo no industrial de limón “Fino” y de aproximadamente la mitad en el limón “Verna”, en donde es la fracción más importante desde este punto de vista. Este porcentaje del TAA que corresponde a compuestos no cuantificados puede ser justificado por la presencia de carotenos y aceites esenciales con actividad antioxidante. Desde el punto de vista del TAA podemos decir que el zumo no industrial de limón “Fino” se caracteriza por el gran aporte del ácido ascórbico al TAA mientras que el de limón “Verna” por

el aporte de antioxidantes no cuantificados y flavonoides que conjuntamente suponen aproximadamente un 66% de la TAA.

De manera similar a lo descrito anteriormente para el zumo no industrial, el zumo comercial del limón “Fino” aquí estudiado tiene en el ácido ascórbico el máximo responsable del TAA mientras que para el de limón “Verna” es el conjunto de las fracciones de flavonoides y antioxidantes no cuantificados la que realiza la mayor aportación a la actividad antioxidante (Tabla 6.5).

TABLA 6.5.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (TAA) Y APORTACIÓN PORCENTUAL AL TAA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL ZUMO. TAA ESTÁ EXPRESADO COMO CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE A UNA SOLUCIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO (MG/L)

	TAA (mg/l)	Flavonoides % TAA	Ascorbato % TAA	Antioxidantes no medidos
Limón “Fino”				
Zumo no industrial	807,87	9,89	65,90	24,21
Zumo industrial	1.100,60	18,96	51,96	29,08
Limón “Verna”				
Zumo no industrial	780,52	16,08	33,32	50,60
Zumo industrial	1.048,84	21,84	29,56	48,60

7. BIBLIOGRAFÍA

-
- AGUSTÍ, M. 2000. Citricultura. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 416 pp.
- AGUSTÍ, M.; ALMELA, V. 1991. Aplicación de los fitorreguladores en Citricultura. Ed. AEDOS. Barcelona. 269 pp.
- ALDERCREUTZ, H. (1995). Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ. Health Perspect.* (Suppl. 7) 103: 103-112.
- American Dietetic Association 1995. Position of the American Dietetic Association. Phytochemicals and functional foods. *J. Amer. Diet. Assoc.* 95: 493-496.
- American Institute for Cancer Research 1996. Dietary phytochemicals in cancer prevention and treatment. Proceedings of the American Institute for Cancer Research's Sixth Annual Research Conference. Washington, D.C., Aug. 31-Sep. 1, 1995. *Adv. Exp. Med. Biol.*, Vol. 401. Plenum Publishing Corp., New York, NY.
- ANDERSON, J. et al. 1995. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *New England J. of Med.* 333 (5): 276.
- Anónimo 1991. When food meets medicine. *Food Manuf.* 66:26.
- Anónimo 1993. Antioxidant vitamins and cancer and cardiovascular disease. FDA Initiated Public Conference, 1993. National Academy of Sciences, Washington, D. C., November 1-3.
- Anónimo 1997. Nutraceuticals trend takes root despite definitional challenges. *Nutr. Buss. J.* 11 (8): 1-3, 15.
- ARAI, S. 1996. Studies on functional foods in Japan. State of the art. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 9-15.
- ARCAS, M.C., BOTÍA, J.M., ORTUÑO, A., & DEL RÍO, J.A. 2000. UV irradiation alters the levels of flavonoids involved in the defence mechanism of *Citrus aurantium* fruits against *Penicillium digitatum*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 106, 617-622.
- AVASA (Asociación de Viveristas de Agrios S.A.). 2001. Información Técnica y Estadística.
- BAIN, J.M. 1958. Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of Valencia orange *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Aust. J. Bot.*, 6: 1-24.
- BARREN, S. et al. 1994. Potential role of dietary isoflavones in the prevention of cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 354: 135-147. Plenum Press, New York, NY.

- BARTHOLOMEW, E.T.; SINCLAIR, W.B. 1951. The lemon fruit. Its composition, physiology and products. Univ. California. 163 pp.
- BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J., & DEL RÍO, J.A. 1993. Changes in neodiosmin levels during the development of *Citrus aurantium* leaves and fruits. Postulation of a neodiosmin biosynthetic pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1916-1919.
- BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; MARÍN, J.R.; ORTUÑO, A., & DEL RÍO, J.A. 1997. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4505-4515.
- BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; SABATER, F., & DEL RÍO, J.A. 1997. 4'-O-Methyltransferase from Citrus. A comparative study in *Citrus aurantium*, *C. paradisi* and tangelo Nova. *Plant Physiol. Biochem.*, 35, 785-794.
- BERKARDA, B.; KOYUNCU, H.; SOYBIR, G., & BAYKUT, F. 1998. Inhibitory effect of hesperidin on tumour initiation and promotion in mouse skin. *Res. Exp. Med.*, 98: 93-99.
- BERQVIST, D.; HALLBROOK, T.; LINDBLAD, B., & LINDHAGEN, A. 1981. A double blind trial of O-(a-hydroxy ethyl)-rutinosides in patients with chronic venous insufficiency. *Vasa*, 10: 253-260.
- BEST, D. 1997. All natural and nutraceutical. Prepared Foods 166 (6): 32-38.
- BLOCK, G.; PATTERSON, B., and SUBAR, A. 1992. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 18 (1): 1-29.
- BRAVERMAN, J.B.S. 1952. Los agrios y sus derivados. Ed. Aguilar. Madrid.
- BURTON, G. W. e INGOLD, K. V. 1981. Autooxidation of biological molecules. I. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants *in vitro*. *J. Amer. Chem. Soc.* 103:6472-6477.
- BUTTERFIELD, H.M. 1963. A history of subtropical fruits and nuts in California. Univ. Calif. Div. Agric. Sci., Berkeley. 57 pp.
- CALABRESE, F.; BARBERA, G.; SOMMA, V. 1988. Characteristics of "Badessa" a late lemon cultivar partially tolerant to mal secco. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, I: 189-194.
- CARAGAY, A.B. 1992. Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technol.* 46 (4): 65-68.
- CASAS, A.; MALLENT, D. 1988. El color de los frutos cítricos. I. Generalidades. II. Factores que influyen en el color. Influencia de la especie, de la variedad y de la temperatura. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 28 (2): 184-202.
- CASAS, A.; MALLENT, D. 1988. El color de los frutos cítricos. II. Factores que influyen en el color (continuación). Influencia de la fertilización, del portainjerto y otros. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 28 (4): 344-356.
- CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O., & DEL RÍO, J.A. 1992. Naringin and neohesperidin levels during development of leaves, flowers and fruits of *Citrus aurantium*. *Plant Physiol.*, 99, 67-73.

- CASTLE, W.S.; WUTSCHER, H.K.; YOUTSEY, C.O.; PELOSI, R.R. 1988. Citrumelos as rootstocks for Florida citrus. Proc. Fla. State Hort. Soc., 101: 28-33.
- Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. 2001. Datos Estadísticos. Sección de Estudios y Estadística. Murcia.
- CONTINELLA, G. 1992. Productivity and behaviour versus Mal Secco disease of some lemon cultivars and clones selected in Sicily. Proc. Int. Soc. Citriculture, 1: 90-92.
- CONTINELLA, G. y TRIBULATO, E. 1979. Preliminari osservazioni comparative su 22 selezioni clonali di limone. II Seminario di studio sul miglioramento genetico del limone. Giovinazzo, Bari (Italia), 81-99.
- CHAPOT, H. 1975. The citrus plant. In: Citrus. Monografía Técnica de Ciba-Geigy. 6-13. Basilea. Suiza.
- DA SILVA EMIM, J.A.; OLIVIERA, A.B., & LAPA, A.J. 1994. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a Citrus bioflavonoid, hesperidin and the isoflavonoids, duartin and claussequinone in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 118-122.
- DAMON, P.; FLANDRE, O.; MICHEL, F.; PERDRIX, L.; LABRID, C.; CASTRES, D.E., & PAULET A. 1987. Effect of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat. Study of prostaglandin E2 and F2 and tromboxane B2 release and histological changes. *Arzneimittel-Forschung*, 37, 1149-1153.
- DAVIES, F.S.; ALBRIGO, L.G. 1999. Cítricos. Ed. Acribia, 283 pp. Zaragoza.
- DEL RÍO, J. A.; FUSTER, M. D.; SABATER, F.; PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, A.; ORTUÑO, A. 1995. Effect of benzylaminopurine on the flavanones hesperidin, hesperetin 7-O-glucósido, and prunin in tangelo Nova fruits. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2030-2034.
- DEL RÍO, J.A.; ARCAS, M.C.; BENAVENTE, O., & ORTUÑO, A. 1998. Citrus polymethoxylated flavones can confer resistance against *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum*, and *Geotrichum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4423-4428.
- DEL RÍO, J.A.; ARCAS, M.C.; BENAVENTE, O.; SABATER, F., & ORTUÑO, A. 1998. Changes of polymethoxylated flavones levels during development of *Citrus aurantium* (cv. Sevillano) fruits. *Planta Medica*, 64, 575-576.
- DEL RÍO, J.A.; CASTILLO, J.; BENAVENTE, O.; FUSTER, M.D.; SABATER, F., & ORTUÑO, A. 1997. Flavanones biosíntesis and its modulation in Citrus. In: "Recent Res. Devel. in Plant Physiol." , Vol. 1, Ed. S. G. Pandálai. Research Signpost, India, pp. 55-66. ISBN: 81-86481-57-5.
- DEL RÍO, J.A.; FUSTER, M.D.; PORRAS, I.; GARCÍA-IZQUIERDO, F.; GARCÍA-LIDÓN, A., & Ortuño, A. 2002. Componentes bioactivos del limón. *Levante Agrícola*, XLI, 362, 323-326.
- DEL RÍO, J.A.; FUSTER, M.D.; SABATER, F.; PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, A., & ORTUÑO, A. 1997. Selection of citrus varieties highly productive for neohesperidin dihydrochalcone precursor. *Food Chemistry*, 59, 433-437.

- DEL RÍO, J.A.; MARÍN, F.R.; BENAVENTE, O.; MARTÍNEZ, M.; GARCÍA-LIDÓN, A.; PORRAS, I. & ORTUÑO, A. 1999. Caracterización de zumos de *Citrus limon* (var. Fino y Verna) en relación a su contenido en flavonoides, vitamina C y potencial antioxidante. *Levante Agrícola* 38, 193-197.
- DWYER, J. T. 1996. Is there a need to change the American diet? *Adv. Exp. Med. Biol.* 401: 189-198.
- ELANGOVAN, V.; SEKAR, N., & GOVINDASAMY, S. 1994. Chemoprotective potential of dietary bioflavonoids against 20-methylchloranthrene-induced tumorigenesis. *Cancer. Lett.*, 87, 107-113.
- Fallahi, E.; Rodney, D.R.; Mousavi, Z. 1990. Growth, yield, and fruit quality of eight lemon cultivars in Arizona. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115 (1): 6-8.
- FAO. 2002. Estadística. www.fao.org
- FOGUET, J.L.; OSTE, C.A.; ALVAREZ, S.; GONZÁLEZ, J.L.; DELFINI, A. 1977. Desarrollo, productividad y calidad de la fruta del limonero Eureka sobre nueve portainjertos. *Rev. Ind. y Agrícola de Tucumán*, 54 (1): 17-27.
- FORNER, J.B. 1984. Interacciones entre el injerto y el patrón en los agrios. M.A.P.A. H.D. 9/84. Madrid.
- FORNER, J.B. 1985. Características de los patrones de agrios tolerantes a la tristeza. *Generalitat Valenciana. Conselleria D'Agricultura I Pesca*. Valencia.
- FORNER, J.B. 1996. Nuevos patrones de agrios enanizantes y semienanizantes. II *Congrés Citrícola de L'Horta Sud*. Ed. y Promociones L.A.V., S.L. 35-50 pp.
- FORTE, V. 1990. *Il limone*. Edizioni Agricole. Bolonia. 90 pp.
- FROST, H.B.; SOOST, R.K. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. *The Citrus Industry*. University of California. Vol II: 290-324.
- FUSTER, M.D.; GARCÍA, D.; ORTUÑO, A.; BOTÍA, J.M.; SABATER, F.; PORRAS, I.; GARCÍA LIDÓN, A., & DEL RÍO, J.A. 1995. Selection of citrics highly productive in secondary metabolites of industrial interest. Modulation of synthesis and/or accumulation processes. In: *Current Trends in Fruit and Vegetables Phytochemistry*. García Viguera, C.; Castañer, M.; Gil, M.I.; Ferreres, F. and Tomás Barberán, F.A. (eds), 81-85. Consejo Superior Invest. Cient., Madrid, ISBN 84-00-07546-3.
- GÁBOR, M. 1988. Szent-Györgyi and the bioflavonoids: new results and perspectives of pharmacological research into benzo-pyrone derivatives. In: V. Cody, E. Middleton, Jr., J.B., Harborne and A. Beretz (Editors), *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*. Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 1-15.
- GALATI, E.M.; MONFORTE, M.T.; KIRJAVAINEN, S.; FORESTIERI, A.; TROVATO, A., & TRIPODO, M.M. 1994. Biological effects of hesperidin a *Citrus* flavonoid. (Note I): Antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco*. 40, 709-712.
- GALLEY, P., & THIOLLET, M.A. 1993. A double-blind-placebo-controlled trial of a new veno-active flavonoid fraction in the treatment of symptomatic capillary fragility. *Int. Angiol.* 12, 69-72.

- GARCÍA-LIDÓN, A.; BLEDA, J.; MATEO, I.; PORRAS, I. 1999. Estudio floral comparativo de Fino 49 y Eureka Frost. *Agrícola Vergel*, 18 (4): 197-201.
- GARCÍA-LIDÓN, A.; ORTIZ, J.M. 1983. Variedades de limonero. Selección clonal. INIA, H.T. n° 52. 27 pp.
- GARCÍA-LIDÓN, A.; ORTIZ, J.M.; GARCÍA-LEGAZ, M.F.; PORRAS, I. 1993. Estudio comparativo de la floración, cuaje y caída de junio de las variedades de limonero (*C. limon* (L.) Burm. f.) "Eureka Frost" y "Fino 49". *Fruticultura Profesional*, 55: 14-17.
- GARCÍA-LIDÓN, A.; ORTIZ, J.M.; GARCÍA-LEGAZ, M.F.; PORRAS, I. 1992. Estudio comparativo de la floración en distintas variedades de limonero. *Fruits*, 47: 661-666.
- GARCÍA-LIDÓN, A.; PORRAS, I. 1997. Variedades de limones y pomelos. Características que inciden en la calidad post-cosecha. Tendencias de futuro. Plantaciones de alta densidad. *Phythoma*, N° 90: 22-30.
- GARCÍA-LIDÓN, A.; PORRAS, I.; GONZÁLEZ D.; ORTIZ, J.M. 1988. First results of the clonal selection programme for lemon tree in Spain. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, I: 207-214.
- GARCÍA-LIDÓN, A.; RIQUELME, F.M.; EGEA, C.; PORRAS, I. 1995. Productividad de Fino 95, un clon de limonero extratemprano en comparación con Fino 49. *Levante Agrícola*, 34(1): 35-41.
- GARCÍA-LIDÓN, A.; SÁNCHEZ-BAÑOS, M.; VIDAL LUNA, J.J.; GARCÍA-LIDÓN, M.; MATEO, I.; PORRAS, I. 1999. Una selección precoz de limonero: Fino 95. *Levante Agrícola*, 38 (3): 346-352.
- GERSTER, H. 1997. The potential role of lycopene for human health. *J. Amer. Coll. Nutr.* 16:109-126.
- GIOVANNUCCI, E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: Review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (4): 317-331.
- GIOVANNUCCI, E. et al. 1995. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (23): 1767-1776.
- GLIDDEN, H.W. 1937. The lemon in Asia and Europe. *J. Amer. Orient. Soc.*, 57: 381-396.
- GODEBERG, P. 1994. Daflon 500 mg in the treatment of haemorrhoidal disease: a demonstrated efficacy in comparison with placebo. *Angiology*, 45, 574-578.
- GONZÁLEZ-SICILIA, E. 1960. El cultivo de los agrios. INIA. Madrid. 806 pp.
- GOOLDSCHMIDT, E.E.; MONSELISE, S.P. 1972. Hormonal control of flowering in *Citrus* trees and other woody perennials. En: *Plant Growth Substances*, D.J. Carr (ed.). Springer Verlag. Berlín.
- GOTTLIEB, O.R. 1975. In: *The Flavonoids*. Eds. J.B. Harborne, T.J. Mabry, H. Mabry. Academic Press New York, pp. 296.
- GUARDIOLA, J.L. 1988. Factors limiting productivity in *Citrus*. A physiological approach. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, I: 381-394.

- HASLER, C.M. 1998. Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Scientific Status Summary. Food Tech.* 52 (11): 63-70.
- HASLER, C.M.; HUSTON, R.L., y CAUDILL, E.M. 1998. En: Two Decades of Nutrition Labeling. DeKror, M., ed. *Nutrition International Inc., Dayton, NJ.* In Press.
- HAYES, K.C. et al. 1993. Differences in the plasma transport and tissue concentrations of tocopherols and tocotrienols: observations in humans and hamsters. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202 (3): 353-359.
- HERTOG, M.G.L.; FESKEENS, E.J.M.; HOLLMAN, C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of heart disease: De Zutphen eldery study. *Lancet.* 342: 1007-1011.
- HODGSON, R.W. 1967. Horticultural varieties of citrus. En: *The Citrus Industry.* W. Reuther, L.D. Batchelor; H.J. Webber (eds.). I (4): 431-591. Univ. California.
- HOROWITZ, R.M., & GENTILE, B. 1977. Flavonoids constituents of *Citrus*. In: "*Citrus Science and Technology*" vol. 1 Eds., S. Nagy, P.E. Shaw, M.K. Veldhuis. AVI Publishing, Westport, CT, pp. 397-426.
- HOSODA, K., & NOGUCHI, M. 1988. Studies on the preparation and evaluation of kijitsu, the immature fruits I. Evaluation of a new drying method. *J.Pharm. Soc. Japan.*, 108, 1009-1011.
- HOWARD, B.V., y KRITCHEVSKY, D. 1997. Phytochemicals and cardiovascular diseases. A statement for health care professionals from the American Heart Association. *Circulation* 95: 2591-2593.
- Institute of Medicine/National Academy of Sciences 1994. Opportunities in the Nutrition and Food Sciences. Ed. P. R. Thomas and R. Earl, pp. 109. Institute of Medicine/National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, D.C.
- JAKSON, L.K. 1991. Citrus growing in Florida. Univ. of Florida. 293 pp.
- JEAN, T., & BODINIER, M.C. 1994. Mediators involved in inflammation: effects of Daflon 500 mg on their release. *Angiology*, 45, 554-559.
- JIMÉNEZ-CUESTA, M.; CUQUERELLA, J.; MARTÍNEZ-JÁVEGA, J.M. 1981. Determination of a color index for *Citrus* fruit degreening. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 750-753.
- KANES, K.; TISSERAT, B.; BERHOW, M., & VANDERCOOK, C. 1992. Phenolic composition of various tissues of rutaceae species. *Phytochemistry*, 32, 967-974.
- KINSELLA, J.E. et al. 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 47 (4): 85-90.
- KOMORI, A. et al. 1994. Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 23 (6): 186-190.
- KOYUNCU, H.; BERKARDA; BAYKUT, F.; SOYBIR, G.; ALATLI, C.; GÜL, H., & ALTUN, M. 1999. Preventive effect of hesperidin against inflammation in CD-1 mouse skin caused by tumour promoter. *Anticancer Research*, 19, 3237-3242.
- LONCAMPT, M.B.; GUARDIOLA, N.; SICOT, M.; BERTRAND, L.; PERDRIX, A., & DUHAULT, J. 1989. Protective effect of a purified flavonoids fraction against reactive oxygen radicals. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 39, 882-885.

- LOUSSERT, R. 1989. Les agrumes. 1 Arboriculture, 113 pp. 2 Production, 158. Technique et Documentation Lavoisier. París.
- MEYER, A. (1998). The 1998 top 100 R&D Survey. *Food Processing* 58 (8): 32-40.
- MEYER, O.C. 1994. Safety and security of Daflon 500 mg in venous insufficiency and in haemorrhoidal disease. *Angiology*, 45, 579-584.
- MIDDLETON, E.J., & KANDASWAMI, C. 1986. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: the flavonoids: advances in research since 1986. Harborne, J.B. (Ed) London, Chapman & Hall, 619-652.
- MIDDLETON, E.J., & KANDASWAMI, C. 1992. Effects of flavonoides on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.*, 43, 1167-1179.
- MIYAKE, Y., YAMAMOTO, K., & OSAWA, T. (1997a). Isolation of eriocitrin (eryodictiol-7-rutinoside) from lemon fruit (*Citrus limon* BURM.f.) and its antioxidative activity. *Food Sci. Technol. Int. Tokio*, 3, 84-89.
- MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; MORIMITSU Y., & OSAWA, T. 1998. Characterization of antioxidative flavonoid glycosides in lemon fruit. *Food Sci. Technol.. Int. Tokyo*, 4: 48-53.
- MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; MORIMITSU, Y., & OSAWA, T. (1997b). Isolation of C-glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4619-4623.
- MONFORTE, M.T.; TROVATO, A.; KIRJARAINEN, S.; FORESTIERI, A.M.; GALATI, E.M., & LOCURTO, R.B. 1995. Biological effects of hesperidin a *Citrus* flavonoid. (Note II): Hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco.*, 9, 595-599.
- MONSELISE, S.P. 1977. *Citrus* fruit development: endogenous systems and external regulation. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 2: 664-668.
- MOSS, G.I.; STEER, B.T.; KRIEDEMANN, P.E. 1972. The regulatory role of inflorescence leaves in fruit setting by sweet orange (*Citrus sinensis*). *Physiol. Plant.*, 27: 432-438.
- NAIR, P. P. et al. 1984. Diet, nutrition intake, and metabolism in populations at high and low risk for colon cancer. Dietary cholesterol, beta-sitosterol, and stigmasterol. *Amer. J. of Clin. Nutr.* 40 (4 Suppl): 927-30.
- NAVARRO, L.; PINA, J.A.; JUÁREZ, J.; BALLESTER, J.F.; ARREGUI, J.M. 1982. El programa de mejora sanitaria de variedades de agrrios en España. *Información Agraria*, 6-7: 7-11.
- NEFF, J., y HOLMAN, J.R. 1997. How the latest products toe the fine line between foods and drugs. *Food Proc.* 58 (4): 23-26.
- ORTIZ, J.M.; GARCÍA-LIDÓN, A. 1982. Portainjertos de limonero. *Comunicaciones I.N.I.A. Serie: Producción Vegetal*, N° 47, 18 pp.
- ORTIZ, J.M.; A. GARCÍA-LIDÓN, A.; PORRAS, I. 1990. Efeito do porta enxerto sobre aqualidade de frutos de limoes Espanhois. *Seminário Internacional de Citros. Sao Paulo*. 99-110.

- ORTIZ, J.M.; GARCÍA-LIDÓN, A.; TADEO, J.L.; FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA. 1984. Rootstock effect on fruit and juice characteristics of lemons. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 1: 50-53.
- ORTUÑO, A.; ARCAS, M.C.; BENAVENTE-GARCÍA, O., & DEL RÍO, J.A. 1999. Evolution of polymethoxyflavones during development of tangelo Nova fruits. *Food Chemistry*, 66, 217-220.
- ORTUÑO, A.; ARCAS, M.C.; BOTÍA, J.M.; FUSTER, M.D., & DEL RÍO, J.A. 2002. Increasing resistance against *Phytophthora citrophthora* in Tangelo Nova fruits by modulating polymethoxyflavones levels. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2836-2839.
- ORTUÑO, A.; BOTÍA, J.M.; FUSTER, M.D.; PORRAS, I.; GARCÍA LIDÓN, A., & DEL RÍO, J.A. 1997. Effect of Scoparone (6,7-Dimethoxycoumarin) biosynthesis on the resistance of tangelo Nova, *Citrus paradisi* and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2740-2743.
- ORTUÑO, A.; REYNALDO, I.; FUSTER, M.D.; BOTÍA, J.M.; GARCÍA-PUIG, D.; SABATER, F.; GARCÍA-LIDÓN, A.; PORRAS, I., & DEL RÍO, J.A. 1997. *Citrus* cultivars with high flavonoid contents in the fruits. *Scientia Horticulturae*, 68, 231-236.
- PARK, G.L.; AVERY, S.M.; BYERS, J.L., & NELSON, D.B. 1983. Identification of bioflavonoids from *Citrus*. *Food Technol.*, 37, 98-105.
- PORRAS, I.; ALCOLEA, V.; GARCÍA-IZQUIERDO, F.; SÁNCHEZ-BAÑOS, M.; GARCÍA-LIDÓN, A.; CONESA, A. 2001. Estudio comparativo de la producción del limonero Fino 49 sobre los patrones (*Citrus macrophylla* Wester) y naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.). *Levante Agrícola*, 40 (1): 60-65.
- PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, M.; GARCÍA-LIDÓN, A. 2000. Limonero Verna: Clones selectos. *Levante Agrícola*, 39 (2): 141-148.
- PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, M.; PÉREZ, F. 2001. Citricultura en la Región de Murcia. *Agrícola Vergel*, 20(5): 238-251.
- POTTER, J.D. y STEINMETZ, K. 1996. Vegetables, fruits and phytoestrogens as preventive agents. *IARC Sci. Publ.* 139: 61-90.
- PRALORAN, J.C. 1977. *Los Agrios*. Ed. Blume. Barcelona. 520 pp.
- PREABRAZHENSKAYA, M. N., et al. 1993). Ascorbigen and other indole-derived compounds from brassica vegetables and their analogs as anticarcinogenic and immunomodulating agents. *Pharmacol. Ther.* 60: 301-313.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J., & PAGANDA, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- ROOSE, M.; KUPPER, R. 1992. Effects of citrus rootstocks freeze tolerance in California. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 1: 256-258.
- ROOSE, M.L. 1996. Performance of 4 scions on 21 rootstocks in California. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 1: 141-144.
- RUSSO, F. 1985. Tassonomia del genere *Citrus* e dei generi affini interessanti la coltivazione. En *Trattato di Agrumicoltura*, 83-116. P. Spina (ed.). Edagricole. Bologna.

- RUSSO, F.; SPINA, P. 1985. Varietá coltivate. En Trattato di Agrumicoltura, 117-156. P. Spina (ed.). Edagricole. Bologna.
- SALAH, N.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G.; TIJBURG, L.; BOLWELL, G.P.; RICE EVANS, C. 1995. Polyphenolic flavonols as scavenger of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. Arch. Biochem. Biophys. 2: 339-346.
- SAUNT, J. 1992. Variedades de cítricos en el Mundo Edipublic. Valencia.
- SCHNEIDER, H. 1968. The anatomy of Citrus. En: The *Citrus* Industry, II (1): 1-85. W. Reuther, L.D. Batchelor y H.J. Webber (eds.), Univ. Calif., Div. Agr. Sci., California.
- SCHNEIDER, H.; PLATT, R.G.; BITTERS, W.P.; BURNS, R.M. 1978. Diseases incompatibilities that cause decline in lemons. Citrograph, 63: 219-221.
- SCHNEIDER, H.; SAKOVICH, N.J. 1984. Compatible rootstocks for lemon trees. Citrograph, 70 (1): 17-24.
- SINCLAIR, W.B. 1984. The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits. Univ. of California, 946 pp.
- SLOAN, E. 1996. The top 10 trends to watch and work on. Food Technol. 50 (7): 55-71.
- SO, F.V. et al. (1996). Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. Nutr. Cancer 26 (2): 167-181.
- SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E.E. 1996. Biology of Citrus. Cambridge University Press. 230 pp.
- STEINMETZ, K.A. y POTTER, J.D. 1991. Vegetables, fruits and cancer. I. Mechanisms. Cancer Causes Control 2: 325-357.
- STEINMETZ, K.A. y POTTER, J.D. 1991. Vegetables, fruits and cancer. II. Mechanisms. Cancer Causes Control 2: 427-442.
- SUMATHI, R. et al. 1993. Effect of DL-alpha-lipoic acid on tissue lipid peroxidation and antioxidant systems in normal and glycollate treated rats. Pharmacol. Res. 27(5-6):309-318.
- TADI, P.P. 1992. Anticarcinogenic, antitumor, and antifungal properties of allium sativum (garlic). Diss. Abstr. Int. 52-08B: 4144.
- TANAKA, T.; MAKITA, H., & MORI, H. 1996. Chemoprotection of 4-NOO-induced oral carcinogenesis by dietary flavonoids diosmin and hesperidin. *Recent Advances in Gastroenterological Carcinogenesis I*. pp. 1167-1170.
- TING, S.V.; ATTAWAY, J.A. 1971. *Citrus* fruit. En: The Biochemisstry of fruits and their products. Hulme, A.C., Ed., Academic Press: London 2: 107-169.
- WOLLENWEBER, E. 1994. The Flavonoids. In: "Advances in research since 1986", Ed., J.B. Harborne. Chapman and Hall, London, pp. 259-335.

