

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“SEMISÍNTESIS DE FLAVONOIDES NATURALES A PARTIR DE LA HESPERIDINA EXTRAÍDA DE LA CÁSCARA DE NARANJA (*Citrus sinensis*)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

CAMILA MARTÍNEZ CHÁVEZ

DIRIGIDA POR

Dr. ELOY RODRÍGUEZ DE LEÓN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024.

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"SEMISÍNTESIS DE FLAVONOIDES NATURALES A PARTIR DE LA HESPERIDINA EXTRAÍDA DE LA CÁSCARA DE NARANJA (*Citrus sinensis*)"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

CAMILA MARTÍNEZ CHÁVEZ

DIRIGIDA POR

Dr. ELOY RODRÍGUEZ DE LEÓN

SINODALES

Dr. ELOY RODRÍGUEZ DE LEÓN
DIRECTOR _____ Firma

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH
SINODAL _____ Firma

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
SINODAL _____ Firma

Dr. EDMUNDO MATEO MERCADO SILVA
SINODAL _____ Firma

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que estuvieron presentes durante mi etapa universitaria y mostraron interés en mi proyecto de tesis, no me queda más que decir: ¡Gracias!

A mis padres, Rubén Martínez y Mónica Chávez, por haberme impulsado a estudiar una carrera en ciencias y por ayudarme a descubrir el valor que tiene el realizar una tesis de licenciatura.

Gracias a mi asesor, Eloy Rodríguez, quien siempre mostró la mejor disposición para apoyarme en mi proyecto de investigación y me abrió las puertas de su laboratorio.

A mis amigas de la licenciatura: Hanna Iturria, Aline Sotelo, Guadalupe Montoya y Guadalupe Serrato. Gracias por todas las veces que estudiamos juntas, por los buenos momentos y por siempre ser tan buen equipo de trabajo. La universidad no habría sido la mismo sin ustedes.

Gracias a mi novio, Abel Solís, quién me recordó por qué amo la ciencia y mostró su total apoyo y admiración hacia mi proyecto.

ÍNDICE GENERAL

Contenido Página

ÍNDICE GENERAL ii

ÍNDICE DE FIGURAS iv

ÍNDICE DE TABLAS vi

ÍNDICE DE ESQUEMAS vii

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN 1

II. ANTECEDENTES 2

II.1. La naranja 2

II.2. El albedo 2

II.3. Producción de la naranja en México 3

II.4. Flavonoides 3

II.5. Hesperidina 4

II.5.1. Farmacocinética de la hesperidina 5

II.5.2. Actividades farmacológicas de la hesperidina 6

II.5.2.1. Actividad cardiovascular 6

II.5.2.2. Actividad antioxidante 7

II.5.2.3. Efectos neuroprotectores 7

II.6. Hesperetina 8

II.7. Diosmina 9

II.8. Diosmetina 10

II.9. Chalcona de hesperidina 11

III. OBJETIVOS 14

III.1. Objetivo general 14

III.2. Objetivos particulares 14

IV. METODOLOGÍA 15

IV.1. Extracción de la hesperidina a partir de la cáscara de naranja 15

IV.2. Análisis y cuantificación de la hesperidina extraída y de los flavonoides sintetizados mediante HPLC-DAD 15

IV.3. Transformación de hesperidina a hesperetina (reacción de hidrólisis) 16

IV.4. Transformación de hesperidina a diosmina 16

IV.5. Transformación de hesperetina a diosmetina 16

IV.6. Transformación de hesperidina a chalcona de hesperidina 17

IV.7. Transformación de hesperetina a chalcona de hesperetina 17

IV.8. Caracterización estructural mediante RMN 17

V. RESULTADOS 19

V.1. Extracción de la hesperidina del albedo de la cáscara de naranja 19

V.2. Obtención de hesperetina a partir de hesperidina 22

V.3. Obtención de diosmina a partir de hesperidina 26

V.4. Obtención de diosmetina a partir de hesperetina 33

V.5. Mejor ruta para la obtención de diosmetina 37

V.6. Obtención de las chalconas de hesperidina y hesperetina 38

VI. CONCLUSIONES 42

VII. REFERENCIAS 43

VIII. ANEXOS 1

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Anatomía de la naranja. 2

Figura 2. Estructura de la hesperidina. 5

Figura 3. Estructura química de la hesperetina. 9

Figura 4. Estructura química de la diosmina. 10

Figura 5. Estructura química de la diosmetina. 11

Figura 6. Estructura química de la dihidrochalcona de hesperidina. 12

Figura 7. Estructura de la metil chalcona de hesperidina. 13

Figura 8. Curva de calibración de la hesperidina. 19

Figura 9. Cromatograma de la hesperidina extraída del albedo de la cáscara de naranja. 20

Figura 10. Espectro de RMN de H^1 (500 MHz, piridina-d_5) de la hesperidina. 21

Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, piridina-d_5) de la hesperidina. 22

Figura 12. Cromatograma y espectro UV-Vis de la hesperetina obtenida a partir de hesperidina. 24

Figura 13. Espectro de RMN de H^1 (500 MHz, piridina-d_5) de la hesperetina. 25

Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, piridina-d_5) de la hesperetina. 26

Figura 15. Cromatogama y espectro UV-Vis de la diosmina obtenida a partir de la hesperidina. 28

Figura 16. Espectros UV-vis de la hesperidina y la diosmina. 29

Figura 17. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, piridina-d_5) de la diosmina. 30

Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, piridina-d_5) de la diosmina. 31

Figura 19. Espectro de RMN bidimensional HSQC (500 MHz, piridina-d_5) de la diosmina. 32

Figura 20. Cromatogama y espectro UV-Vis de la diosmetina obtenida a partir de la hesperetina. 34

Figura 21. Espectro de RMN de H^1 (500 MHz, piridina-d_5) de la diosmetina. 35

Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, piridina-d_5) de la diosmetina. 36
Figura 23. Espectro de RMN bidimensional HMBC (500 MHz, piridina-d_5) de la diosmetina. 37
Figura 24 . Cromatograma de la chalcona de hesperidina, experimento 6 de la Tabla 5. 41
Figura 25. Cromatograma de chalcona de hesperetina. Experimento 2 de la Tabla 6. 41

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Gradiente de la fase móvil. 16
Tabla 2. Cuantificación de la hesperidina extraída a partir el albedo de naranja. 20
Tabla 3. Condiciones de hidrólisis para la obtención de hesperetina. 23
Tabla 4. Condiciones de reacción para la obtención de diosmina. 27
Tabla 5. Condiciones de reacción para la obtención de diosmetina. 34
Tabla 6. Condiciones de reacción para la obtención de la chalcona de hesperidina. 40
Tabla 7. Condiciones de reacción para la obtención de la chalcona de hesperetina. 40

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Página

Esquema 1. Obtención de hesperetina mediante la hidrólisis de la hesperidina. 23
Esquema 2. Síntesis de diosmina a partir de hesperidina. 27
Esquema 3. Síntesis de diosmetina a partir de hesperetina. 33
Esquema 4. Rutas para la obtención de diosmetina 38
Esquema 5. Esquema de obtención de chalconas de hesperidina y hesperetina. 39

RESUMEN

En nuestro país, desde el año 2013, la mezcla de los flavonoides diosmina y hesperidina ha sido aprobada como un medicamento, para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la circulación venosa tales como: la isquemia de extremidades inferiores, várices, las úlceras por decúbito, hemorroides, insuficiencia venosa crónica y la claudicación intermitente. Por su parte, la diosmetina (aglicona de la diosmina) ha demostrado tener efectos biológicos importantes, entre los que destacan su actividad antibacteriana, anti-inflamatoria y anticancerígena principalmente contra la leucemia mieloide. La cáscara de la naranja (*Citrus sinensis*) es una fuente significativa del flavonoide hesperidina, razón por la cual puede ser aprovechada para extraer este importante compuesto. Actualmente, cuando se consume un fruto cítrico como la naranja, toronja, lima y limón, la cáscara no es utilizada, lo que representa un desecho de aproximadamente el 62 % del fruto. En la actualidad, existe una imperante necesidad de aprovechar y reutilizar los recursos naturales al máximo con los objetivos principales de disminuir los costos de producción y el impacto ambiental provocado por la explotación de estos. En el presente trabajo, se aprovechó la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) para extraer, mediante un método verde (extracción asistida por ultrasonido), a la hesperidina, de la cual se obtuvo un rendimiento de 432.9±18.9 µg por gramo de albedo. La hesperidina se usó como materia prima para obtener, por medio de semisíntes, moléculas con efecto farmacológico comprobado: hesperetina, diosmina y diosmetina. Para estas transformaciones, se obtuvo un porcentaje de conversión del 99 %. Cada una de las reacciones fue monitoreada por HPLC-DAD y los productos fueron caracterizados mediante RMN, lo que permitió confirmar la naturaleza química de dichos compuestos. A partir de la hesperidina y de su aglicona, la hesperetina, se evaluaron distintas condiciones de reacción para obtener la chalcona de hesperidina y la chalcona de hesperetina, respectivamente. Sin embargo, dichas chalconas no lograron ser sintetizadas.

I. INTRODUCCIÓN

México es uno de los principales países productores de naranjas a nivel global. A nivel nacional, su producción representa el 56.3 % del total de cítricos cultivados anualmente (Ortiz y col., 2023). Sin embargo, sus residuos como cáscaras, semillas y pulpas, suelen estar desaprovechados y si acaso, se usan para alimentación del ganado o compostaje, a pesar de que estos subproductos son ricos en fibras dietéticas, flavonoides, polifenoles, aceites esenciales y polisacáridos. El uso de tecnologías que permitan la extracción de estos compuestos bioactivos es conveniente para revalorizarlos y darles alguna aplicación en la química medicinal, ya sea como moléculas puras o como material de partida en reacciones de semisíntesis. La hesperidina es un flavonoide obtenido del albedo de la naranja. Se obtiene mediante extracción etanólica y ha demostrado tener propiedades farmacológicas interesantes. Además de ello, puede ser usada como molécula de partida para la obtención de otros flavonoides, tales como la diosmina, la hesperetina, la diosmetina y las chalconas de la hesperidina y de la hesperetina, las cuales también se han reportado con actividad biológica,. Si bien alguna de las reacciones de semisíntesis de estas moléculas ya están reportadas, se busca obtener la ruta semisintética más optimizada en tiempos y concentración de reactivos para mejorar la eficiencia y el rendimiento de los productos.

II. ANTECEDENTES

II.1. La naranja

La naranja es un alimento altamente nutritivo, fuente de compuestos fitoquímicos como la vitamina C, flavonoides y carotenoides, que también le confieren propiedades antioxidantes (Chanson-Rolle y col., 2016). Es comúnmente consumido fresco, en jugos y mermeladas. Sus subproductos (cáscara y semillas) generalmente se desechan en el medio ambiente, aumentando la cantidad de residuos orgánicos en la naturaleza. La industria utiliza estos desechos para la producción de pectina, melaza, fibras, aceites y alimentos para animales; sin embargo, estos subproductos contienen altos niveles de compuestos activos y fitoquímicos como aceites esenciales, vitamina C, azúcares, flavonoides, carotenoides, fibras dietéticas, polifenoles, entre otros que pueden ser aprovechados (Maqbool y col., 2023).

II.2. El albedo

El albedo (Figura 1), es la capa blanca y esponjosa de los cítricos. Este no solo es una buena fuente de fibra dietética, sino también una fuente de componentes bioactivos como vitamina C, flavonoides y otros antioxidantes (Escobedo y col., 2014).

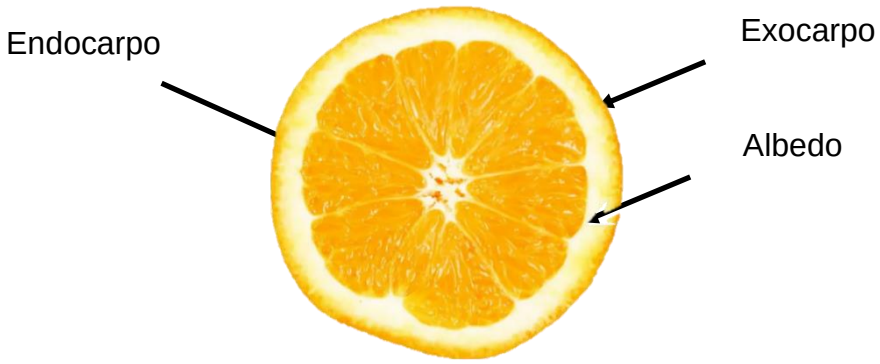


Figura 1. Anatomía de la naranja.

II.3. Producción de la naranja en México

La naranja es el cítrico más cultivado en México y Veracruz es el principal productor a nivel nacional. Este estado cuenta con más de la mitad de la producción total de naranjas con un reparto del 52.1 % en tan solo el primer semestre del año 2022 (enero a julio), lo cual equivale a 1,861,230 toneladas, seguido de Tamaulipas con un 20.6 % y San Luis Potosí con un 6.2 %. La producción total a nivel nacional en este periodo de tiempo fue de 3,570,135 toneladas, posicionando a México como el quinto productor a nivel internacional (SADER, 2022).

La producción de cítricos aporta el 2,78 % al Producto Interno Bruto (PIB) agrícola nacional, y la naranja aporta el 1,15 % según la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER, 2022). Las variedades de naranja cultivadas en México incluyen Valencia, Navel-lane-late y Navelina. La variedad Valencia es la que más se produce (SADER, 2016).

II.4. Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas; estos son responsables de algunos roles importantes para su supervivencia tales como el crecimiento, la protección contra la luz UV, hongos, y microorganismos o insectos. También tienen propiedades quelantes, así como de inhibición enzimática y de proliferación, inducción de apoptosis, entre otros (Ma y col., 2020). Son una familia de compuestos naturales conformada por seis grupos: las antocianinas, los flavonoles, los flavanoles, las flavonas, las isoflavonas y las flavanonas (Panche y col., 2016). Sin embargo, en los cítricos, solo se han encontrado los siguientes cuatro grupos: flavanonas, flavonas, flavonoles y antocianinas (Barreca y col., 2020). Todas ellas descienden de un esqueleto básico de 2-fenil-1,4-benzopirona y cada clase se distingue por características químicas estructurales particulares. Sus concentraciones varían dependiendo de los factores naturales a los que se ven expuestos, por lo que es difícil estimar el contenido exacto de flavonoides en los

productos naturales y se manejan por rangos dependiendo de la especie en la que se encuentren.

Además, los flavonoides son moléculas bioactivas que poseen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anti alergénicas, antifúngicas, antimicrobianas, citotóxicas, hepato-protectoras y antivirales (Ma y col., 2020). Es por ello que se ha impulsado la investigación de dichas moléculas, para poder hacer uso de ellas y optimizar su obtención. Hostetler y col. (2017) reportan que los flavonoides pueden prevenir enfermedades mediante tres mecanismos: por su acción en el lumen o epitelio intestinal, por su acción en los tejidos periféricos y por acción indirecta, por ejemplo, beneficiando a la microbiota.

Una de las actividades más relevantes de los flavonoides es mejorar el tono venoso y la disminución de la permeabilidad capilar. De hecho, la mayoría de los tratamientos flebotónicos para estos padecimientos están hechos de flavonoides micronizados que son extraídos de fuentes naturales o se obtienen por semisíntesis a partir de ellos (Steinbruch y col., 2020).

II.5. Hesperidina

La hesperidina (3,5,7–trihidroxiflavanona-7-ramnoglucósido) es una flavanona cuya estructura de aglicona (hesperetina o metil eriodictiol) está unida a la rutinosa [6-*O*-(α-*L*-ramnopiranosil)-*D*-glucopiranosa] o [6-*O*-(α-*L*-ramnosil)-*D*-glucosa], (Figura 2) (Pyrzynska, 2022). Se encuentra en la cáscara de algunos cítricos como el limón, naranja, mandarina, toronja, entre otros (Wdowiak y col., 2022). La concentración de hesperidina es alta en *Citrus sinensis* (15,25 ± 8,21 mg/100 g de peso de fruta fresca) y *Citrus reticulate* (19,26 ± 11,56 mg/100 g de peso de fruta fresca) (Schluesener & Li, 2016).

La hesperidina tiene un peso molecular de 610.67 g/mol, su punto de fusión va de 258 °C a 262 °C, es muy soluble en piridina, poco soluble en metanol y casi insoluble en acetona, benceno, cloroformo y agua. Puede formar complejos con metales (Garg y col., 2001).

La hesperidina exhibe propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antihipercolesterolémicas, antihipertensivas, diuréticas, neuroprotectoras, anticancerígenas, antimicrobianas, antioxidantes, entre otras (Víctor y col. 2020). Grag y col. (2001) mencionan que la hesperidina modula las poblaciones bacterianas de la microflora al promover el crecimiento de las bacterias benéficas como son los filos firmicutes y bacteroidetes. La hesperidina es también importante para la absorción y retención de vitamina C; incluso su deficiencia está ligada a algunos padecimientos como debilidad capilar, dolor de extremidades y calambres en las piernas (Al-Ashaal & El-Sheltawy, 2011). Además, es importante mencionar que su uso es muy seguro debido a que no se acumula y tiene pocos efectos adversos, incluso puede usarse durante el embarazo (Wdowiak y col., 2022).

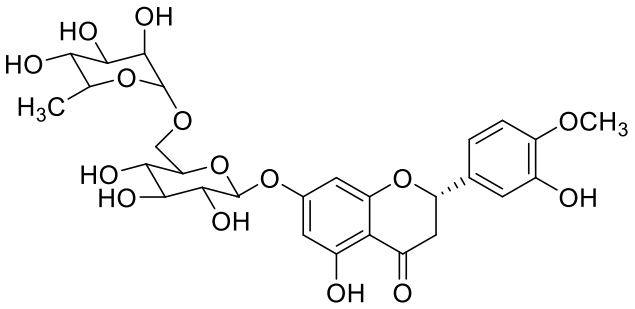


Figura 2. Estructura de la hesperidina.

II.5.1. Farmacocinética de la hesperidina

Se sabe que la hesperidina tiene baja solubilidad en agua, baja permeabilidad de membrana y en consecuencia una biodisponibilidad limitada (menor del 25 %) (Grag y col., 2001). Tiene una vida media de 6 horas y su biodisponibilidad también es altamente variable debido a que se hidroliza a su aglicona hesperetina, la cuál es su forma activa por ser la que puede entrar más fácilmente a circulación sistémica y ejercer su efecto farmacológico; también es capaz de cruzar barrera hematoencefálica y efectuar una actividad neuroprotectora directa (Li y col., 2008). Además, la hesperidina tiene un buen perfil de toxicidad con una dosis letal media de 4,837.5 mg/kg de peso corporal, de acuerdo con un estudio realizado en ratas Sprague-Dawley (Li y col., 2019).

II.5.2. Actividades farmacológicas de la hesperidina

Como se ha mencionado, la hesperidina tiene remarcables actividades biológicas y farmacológicas. A continuación, se mencionan los mecanismos de las más importantes.

II.5.2.1. Actividad cardiovascular

Es usado como fármaco flebotónico en pacientes que sufren de problemas venosos como fragilidad y permeabilidad capilares. Garg y col. (2001) reportan que la capacidad que tiene la hesperidina para combatir la fragilidad capilar se debe a su efecto inhibitorio en la enzima hialuronidasa, cuyo principal papel es el degradar las moléculas de ácido hialurónico que en esta zona causa permeabilidad y debilitamiento capilar. Las consecuencias de no tratar estas condiciones son la aparición de várices, hipertensión, insuficiencia venosa crónica, hemorroides, úlceras y moretones (Garg y col., 2001). Actualmente, en el mercado existen medicamentos a base de hesperidina y otro flavonoide llamado diosmina en una relación 1:9, entre sus efectos se encuentran el evitar la distensión venosa, disminución de la síntesis de prostaglandinas, atrapar radicales libres, regular la actividad del complemento y mejorar el drenaje linfático (Nicolaides & Struckman, 1994). En realidad, todos los efectos antes mencionados están relacionados, ya que el flavonoide tiene acción antiinflamatoria debido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas PGE2, PGF2-alfa y tromboxano B, a su vez esto evita que el complemento se active y propicie un tráfico membranal, aumentando la permeabilidad de membrana y ocasionando la distensión venosa. Su efecto antioxidante también evita la activación de mecanismos inflamatorios causados por radicales libres, la oxidación de lípidos de membrana y la fuga de líquido citoplasmático hacia el espacio intercelular, evitando la formación de edemas (Nicolaides & Struckman, 1994).

Así mismo, Pyrzynska (2022) reporta un efecto cardioprotector, gracias a que baja la presión diastólica, los niveles de glucosa y el perfil lipídico, que en conjunto reducen la agregación plaquetaria y previenen infartos.

II.5.2.2. Actividad antioxidante

En los flavonoides, la capacidad antioxidante va en función de la posición de los grupos hidroxilo disponibles. En el caso de la hesperidina, el grupo OH unido al carbono de la posición 3´ es importante para dicha actividad (Choi y col., 2022). Se reporta una actividad antioxidante “moderada” de un 36.65 % contra el radical DPPH en comparación con el 99.33 % de la vitamina C (Al-Ashaal & El-Sheltawy, 2011).

La actividad antioxidante de la hesperidina funciona mediante dos mecanismos, el directo que es atrapando radicales libres, e indirectamente inhibiendo enzimas prooxidantes, aumentando la acción de las enzimas antioxidantes (catalasa y superóxido dismutasa) y quelando metales de transición reactivos. Con respecto a este último punto, se ha reportado que la hesperidina tiene mayor potencial para quelar el hierro que la deferoxamina, un fármaco con el nombre comercial “Desferin” que se prescribe como quelante para el hierro excedente (Pyrzynska, 2022).

II.5.2.3. Efectos neuroprotectores

Los flavonoides como la hesperidina y su aglicona tienen efectos neuroprotectores, por su ya mencionada actividad antioxidante, antiinflamatoria, la capacidad de mejorar el flujo sanguíneo y la facilidad que tienen de atravesar la barrera hematoencefálica. Entre sus efectos, se resalta una mejora en enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer cuando se administra como tratamiento *in vivo* e *in vitro* en células de neuroblastoma SK-N-SH (Roohbakhsh y col.,2014).

Así mismo, Huang y col. (2012) reportan que una deficiencia de flavonoides se ha relacionado con la demencia y el Alzheimer. La agregación de beta amiloides en esta enfermedad desregula el metabolismo de la glucosa en las células neuronales, debido a que se acumulan en sus transportadores y en los receptores de insulina, dañando la sinapsis y promoviendo la autofagia; la hesperidina y hesperetina mejoran el metabolismo de la glucosa ejerciendo un efecto neuroprotector al evitar acumulación de beta amiloides, además de que su actividad antioxidante regula la neurotoxicidad generada por los radicales libres y el peróxido de hidrógeno generado

por el estrés celular. La hesperetina tiene incluso mayores efectos neuroprotectores que la hesperidina de acuerdo con lo observado en células corticales de rata (Cho, 2006).

Así mismo, es importante mencionar que se ha reportado que la hesperidina tiene efectos antidepresivos mediados por la activación del receptor 5-HT_{1A} serotoninérgico (Roohbakhsh y col., 2014).

II.6. Hesperetina

La hesperetina (Figura 3), como se mencionó en el punto 2.5, es la aglicona de la hesperidina, por lo tanto, pertenece también a las flavanonas. Si bien puede obtenerse mediante semisíntesis, la hesperetina aparece en el plasma 3 horas después de haber ingerido hesperidina (Pyrzynska, 2022), ya que la microbiota intestinal la produce mediante catálisis enzimática usando la enzima α-rhamnosidasa secretada principalmente por *Bifidobacterium pseudocatenultum* (Wdowiak y col., 2022). Tiene las mismas propiedades bioactivas que la hesperidina e incluso con mejores resultados gracias a que se absorbe y metaboliza más fácilmente.

La hesperetina destaca en el tratamiento de dislipidemias. Wilcox y col. (2001) reportaron que la hesperetina puede disminuir hasta en un 74 % la secreción de ApoB (lipoproteína que transporta colesterol LDL, VLDL e IDL) en la línea celular HepG2 y una disminución del 84 % en la esterificación del colesterol. También, se ha reportado que la hesperetina mejora la salud ósea por su actividad osteoblástica (formación de hueso) al aumentar los marcadores osteogénicos BMP-2, BMP-4, Runx2 (Ortiz y col., 2022).

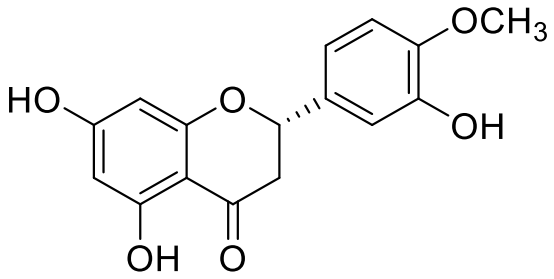


Figura 3. Estructura química de la hesperetina.

II.7. Diosmina

La diosmina (3′,5,7-trihidroxi-4′ -metoxiflavona-7-rutinósido) cuya estructura se observa en la Figura 4, es un glucósido de flavona obtenido de frutos cítricos (Victor y col., 2020). Se ha reportado que tiene propiedades bioactivas, por lo que resulta de gran interés para su aplicación terapéutica, sobre todo se ha destacado por ser tratamiento para hemorroides, úlceras venosas (várices), insuficiencia venosa y otros problemas circulatorios (Zaragozá y col., 2021). La diosmina actúa en sinergia con la hesperidina para el tratamiento de dichos desórdenes venosos y puede encontrarse disponible en algunas farmacias con el nombre de Daflon o su versión genérica.

Además de ello, la diosmina tiene otras actividades farmacológicas como antiinflamatoria, antioxidante, antidiabético, anticancerígena, protección hepática, neuroprotectora, renoprotectora y protección retinal (Zheng y col., 2022). Si bien muchos de estos estudios se han llevado a cabo de forma experimental en ratas, ratones e *in vitro*, no deja de ser un buen candidato a fármaco para tratamiento de diversas patologías. Además, tiene un buen perfil toxicológico que lo posiciona como un tratamiento seguro y efectivo (Huwait & Mobashir, 2022).

Farmacológicamente hablando, la diosmina no se absorbe fácilmente, al consumirse se hidroliza a diosmetina (su aglicona) por medio de las enzimas α-glucosidasa y β-glucosidasa para su posterior absorción (Russo, Chandradhara & De Tommasi, 2018).

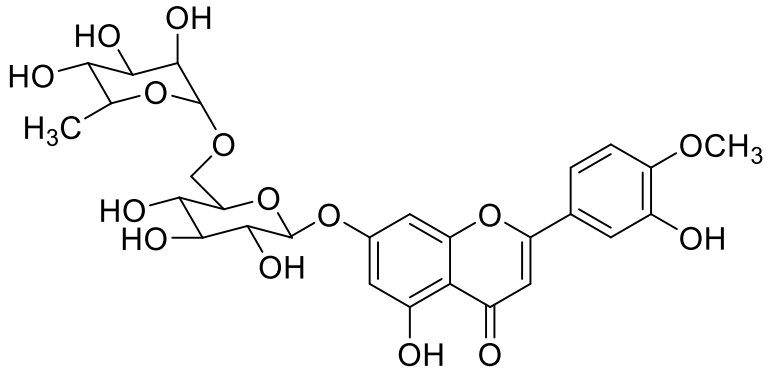


Figura 4. Estructura química de la diosmina.

II.8. Diosmetina

La diosmetina (3', 5, 7-trihidroxi-4'-metoxiflavona) es la aglicona del glucósido flavonoide diosmina, que se puede encontrar en especies de cítricos y hojas de olivo (Meirinhos y col., 2005). Se ha reportado que la diosmetina (Figura 5) posee diferentes propiedades biológicas, como actividades anticancerígenas, antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias. Se ha demostrado que la diosmetina tiene un potente efecto antiproliferativo en células tumorales, incluidas las células de cáncer de mama MDA-MB 468, en células de carcinoma de cuello uterino y en células de carcinoma hepatocelular HepG2 (Choi y col., 2019).

Actualmente, no hay una fuente natural de la que se puedan obtener buenos rendimientos de diosmetina, y de acuerdo con el índice de precios promedio de los Estados Unidos, el precio de este compuesto es de $3,337 dólares por kilogramo, mientras que al hacerlo por semisíntesis se obtienen buenos rendimientos con precios de $3 dólares por kilogramo partiendo de otros flavonoides como la hesperidina (Victor y col., 2020).

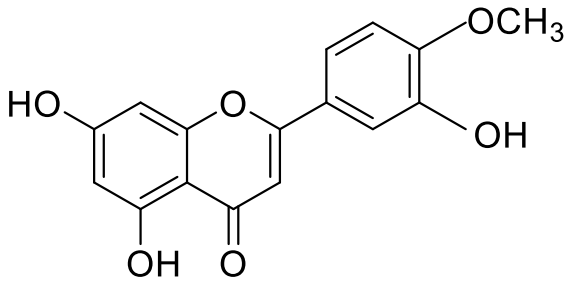


Figura 5. Estructura química de la diosmetina.

II.9. Chalcona de hesperidina

El nombre chalcona proviene del griego *chalkos* que significa “bronce”. Estas moléculas fueron nombradas así por el color que presentan. Son estructuras prioritarias en la química medicinal por ser la única familia de flavonoides que carece del anillo C heterocíclico y por ser precursores intermediarios de todos los demás flavonoides. La estructura de las chalconas se encuentra en un gran número de productos naturales y la mayoría poseen actividades biológicas, entre las que se destacan estrogénicas, antifúngicas, antibacterianas, antivirales y antiinflamatorias (Le Bail y col., 2001).

Las chalconas tienen un esqueleto general de 1,3-diaril-2-propen-1-ona que pueden ser *cis* o *trans* (Zhuang y col., 2017); son consideradas fitoestrógenos por ser estructuralmente similares a los estrógenos y andrógenos. Tienen la capacidad de pasar membranas celulares y de interaccionar con receptores y enzimas como el receptor de estrógenos, la aromatasa y la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, todos ellos involucrados en la biosíntesis de las hormonas esteroideas (Le Bail y col., 2001).

La dihidrochalcona de hesperidina (Figura 6) tiene propiedades vasoprotectoras, antioxidantes, analgésicas y antiinflamatorias. Además, se encuentra presente en la industria alimentaria como un edulcorante semisintético bajo en calorías con un

poder endulzante aproximadamente 1500 veces mayor que la sacarosa y con un valor calórico menor a 0.002 kcal/g (Ortiz y col., 2022).

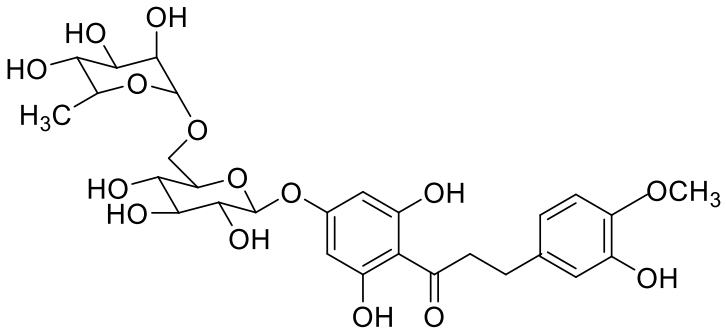


Figura 6. Estructura química de la dihidrochalcona de hesperidina.

La chalcona de hesperidina es más soluble en agua que la hesperidina, lo cual incrementa su biodisponibilidad, estabilidad metabólica y puede ser mejor absorbida por los tejidos diana. Cuando se encuentra metilada como hesperidina metil chalcona (Figura 7), es incluso aún más soluble y sigue siendo tan segura como la hesperidina a dosis altas y exposición prolongada según lo reportado por Bussmann y col. (2022). Se ha demostrado que la hesperidina metil chalcona es una excelente alternativa antiinflamatoria ante los AINES que causan daño renal por uso prolongado, pues tiene efectos antiinflamatorios y nefroprotectores. En cuanto a sus mecanismos antiinflamatorios, actúa al inhibir la transcripción del factor nuclear proinflamatorio κB (NFκB) y otras citocinas proinflamatorias, mediante la inducción de la citocina antiinflamatoria IL-10 y la inducción del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), una proteína que controla la expresión de genes citoprotectores contra el daño causado por los radicales libres y activando una respuesta antioxidante (Bussmann y col., 2022).

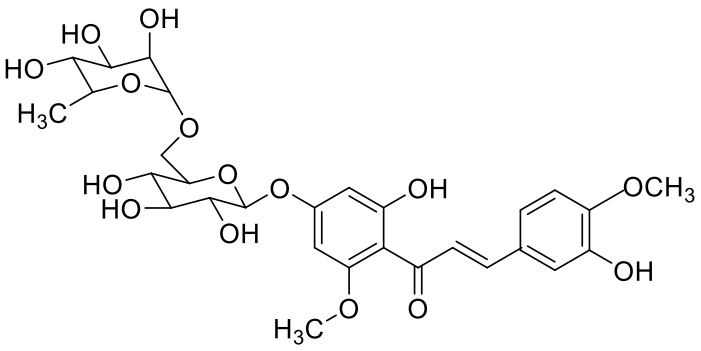


Figura 7. Estructura de la metil chalcona de hesperidina.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Realizar la semisíntesis de los flavonoides diosmetina, hesperetina, diosmina, chalcona de hesperidina y chalcona de hesperetina a partir de la hesperidina extraída de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*).

III.2. Objetivos particulares

- Obtener el flavonoide hesperidina a partir del albedo de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) mediante extracción asistida por ultrasonido.
- Realizar la semisíntesis de la flavona hesperetina a partir de la hesperidina mediante hidrólisis ácida.
- Realizar la síntesis parcial de diosmina y diosmetina mediante una reacción de oxidación a partir de hesperidina y hesperetina, respectivamente.
- Realizar la semisíntesis de la chalcona de hesperidina y la chalcona de hesperetina mediante una catálisis básica a partir de hesperidina y hesperetina, respectivamente.
- Efectuar la caracterización de los productos obtenidos por medio de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

IV. METODOLOGÍA

IV.1. Extracción de la hesperidina a partir de la cáscara de naranja

A partir de los residuos de la cáscara de naranja se separó el albedo (parte blanca) del flavedo (parte exterior). El albedo se cortó en pequeños trozos de alrededor de 5 mm. La extracción se realizó con un equipo de ultrasonido de la marca Branson y se mantuvo la temperatura constante a 35 °C. Se utilizaron 6.5 g de albedo y 43 ml de etanol en una primera extracción de 5 minutos, se recuperó el disolvente y se efectuó una segunda extracción con 13 ml más durante otros 5 minutos (Martínez y col., 2022).

Los extractos obtenidos se juntaron y fueron analizados y cuantificados mediante HPLC.

IV.2. Análisis y cuantificación de la hesperidina extraída y de los flavonoides sintetizados mediante HPLC-DAD

El análisis y la cuantificación de la hesperidina extraída se realizó mediante HPLC acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD). Para este análisis, se utilizó como fase estacionaria una columna C_{18} (150 x 4.6 mm, 5 µm) y como fase móvil un gradiente de agua acidulada con ácido acético (0.0125N), con acetonitrilo, a un flujo de 1 ml/min (Tabla 1) (Martínez y col., 2022). Para la cuantificación de la hesperidina extraída, se preparó una curva de calibración por estándar externo con un estándar comercial de hesperidina, usando las siguientes concentraciones: 15, 75, 125 y 175 µg/ml.

Para cada una de las transformaciones realizadas, se determinó su porcentaje de conversión siguiendo el método cromatográfico descrito.

Tabla 1. Gradiente de la fase móvil.

TIEMPO (minutos)	FLUJO (ml/min)	AGUA ACIDULADA (%)	CH_3CN (%)
0	1	95	5
2	1	95	5
5	1	85	15
20	1	50	50
25	1	95	5
35	1	95	5

IV.3. Transformación de hesperidina a hesperetina (reacción de hidrólisis)

En un matraz bola de 25 ml, se colocaron 0.25 mmoles de hesperidina y se adicionaron 10 ml de una disolución acuosa de ácido sulfúrico (1.5 N). La mezcla se calentó a 90 °C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se detuvo la agitación y se dejó a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionaron 20 ml de una disolución saturada de bicarbonato de sodio. Finalmente, se extrajo la fase orgánica con tres lavados de 5 ml de acetato de etilo cada uno; la fase orgánica se concentró al vacío con ayuda de un rota-evaporador (Martínez y col., 2022).

IV.4. Transformación de hesperidina a diosmina

En un matraz bola de 25 ml limpio, seco y provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.25 mmoles de hesperidina, 0.25 mmoles de yodo y 5 ml de piridina. Esta mezcla se agitó y se calentó a 95 °C durante 24 horas. Posteriormente, se le añadieron 50 mg de metabisulfito de sodio disuelto en 5 ml de agua y 5 ml de ácido clorhídrico al 1 %. Por último, la diosmina se extrajo con tres lavados de 5 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se evaporó con ayuda de un evaporador rotatorio (Victor y col., 2020).

IV.5. Transformación de hesperetina a diosmetina

En un matraz bola de 25 ml limpio, en condiciones anhidras y provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.25 mmoles de hesperetina, 0.25 mmoles de yodo y 5 ml

de piridina. Esta mezcla se agitó y se calentó a 95 °C durante 24 horas. Posteriormente, se añadieron 50 mg de metabisulfito de sodio disuelto en 5 ml de agua y 5 ml de ácido clorhídrico al 1 %. Por último, la diosmetina se extrajo con tres lavados de 5 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se evaporó con ayuda de un evaporador rotatorio (Víctor y col., 2020).

IV.6. Transformación de hesperidina a chalcona de hesperidina

En un matraz bola de 25 ml limpio, seco y provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.25 mmoles de hesperidina y 10 mmoles de hidróxido de sodio. Se usaron agua y metanol en una relación 1:1 como disolventes. Esta mezcla se agitó y se calentó a 40 °C durante 10 min. Transcurrido este tiempo se detuvo la agitación y se dejó atemperar (Le Bail y col., 2001). Posteriormente, se le adicionaron 20 ml de una disolución de ácido cítrico 10 mmol para neutralizar. Finalmente, se extrajo la fase orgánica con tres lavados de 5 ml acetato de etilo cada uno; la fase orgánica se concentró al vació con ayuda de un rota-evaporador.

IV.7. Transformación de hesperetina a chalcona de hesperetina

En un matraz bola de 25 ml limpio, seco y provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.25 mmoles de hesperetina y 10 mmoles de hidróxido de sodio. Se usaron agua y propilenglicol en una relación 1:1 como disolventes. Esta mezcla se agitó y se calentó a 40 °C durante 10 min. Transcurrido este tiempo se detuvo la agitación y se dejó atemperar a temperatura ambiente (Le Bail y col., 2001). Posteriormente, se le adicionaron 20 ml de una disolución de ácido acético glacial 10 mmol para neutralizar. Finalmente, se extrajo la fase orgánica con tres lavados de 5 ml de acetato de etilo cada uno; la fase orgánica se concentró al vació con ayuda de un rota-evaporador.

IV.8. Caracterización estructural mediante RMN

La caracterización química de los flavonoides extraídos y sintetizados se realizó utilizando un espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN) de 500 MHz.

Para este análisis, se pesaron 15 mg del compuesto a caracterizar y se disolvieron en 0.6 ml de piridina o de metanol deuterados. La mezcla se colocó en un tubo para RMN y se registraron sus espectros unidimensionales de ^{1}H, ^{13}C y APT, así como los espectros bidimensionales en modalidad COSY, HSQC y HMBC (Martínez y col., 2022).

V. RESULTADOS

V.1.Extracción de la hesperidina del albedo de la cáscara de naranja

La hesperidina fue extraída del albedo de la naranja por medio de ultrasonido. La cuantificación de este compuesto se elaboró usando una curva de calibración obtenida mediante HPLC (Figura 8).

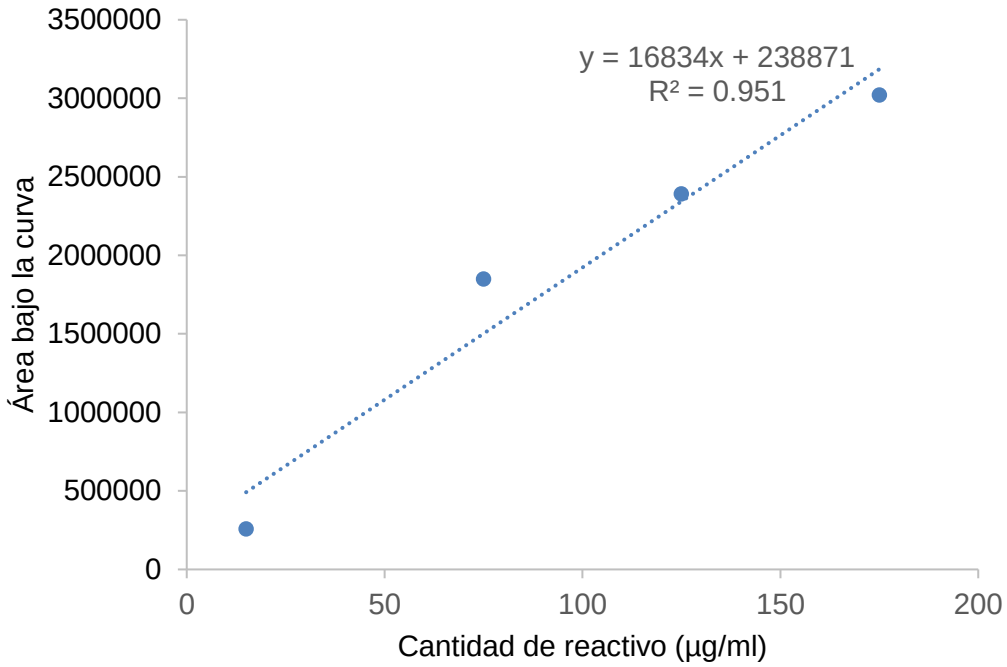


Figura 8. Curva de calibración de la hesperidina.

A través de la extracción asistida por ultrasonido se obtuvieron 432.9 ± 18.9 µg de hesperidina por cada gramo de albedo fresco. La cantidad de hesperidina por muestra se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Cuantificación de la hesperidina extraída a partir del albedo de naranja.

Muestras	Área bajo la curva	Cantidad (µg/ml)	Cantidad (µg/g de albedo)
1	1229304	58.83	452.6
3	1182380	56.04	431.1
4	1146704	53.92	414.8
Promedio			432.9
Desviación estándar			18.9

En la Figura 9, se aprecia un cromatograma representativo de las muestras extraídas donde se observa un solo pico con un tiempo de retención de 14.24 minutos y su espectro de UV con un máximo de absorción de 284.3 nm.

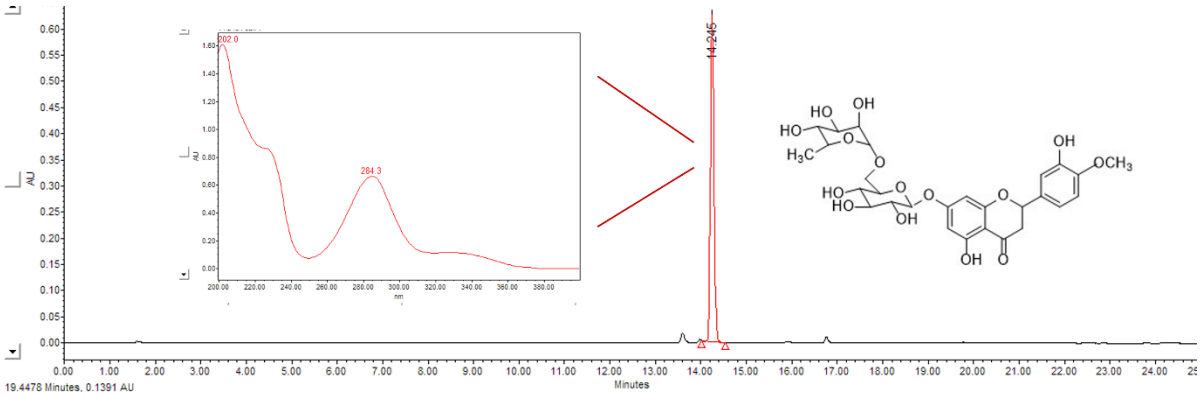


Figura 9. Cromatograma de la hesperidina extraída del albedo de la cáscara de naranja.

Se caracterizó a la hesperidina mediante RMN. En el espectro de H^1 (Figura 10) las señales correspondientes a los hidrógenos unidos a los carbonos en las posiciones 2, 3 (a y b), 6 y 8 son las señales características de las flavanonas. Los protones en el C-3 generan dos señales (a y b) debido a que ambos son adyacentes a un carbono quiral. En la estructura de la hesperidina destaca la señal de los hidrógenos unidos al metoxilo (OCH_3) que se observa como un singulete y que integra para tres hidrógenos. También se observa entre 4.0 y 5.5 ppm los picos correspondientes a

los hidrógenos de los azúcares (señales etiquetadas por los números en color verde y azul), a excepción de la señal 6”” que por ser un CH_3 se encuentra en el campo más alto entre 0. 7 y 1.5 ppm. Las señales de los hidrógenos C-1” y C-1”” se encuentran ligeramente desplazadas a campo bajo por estar adyacentes a dos oxígenos.

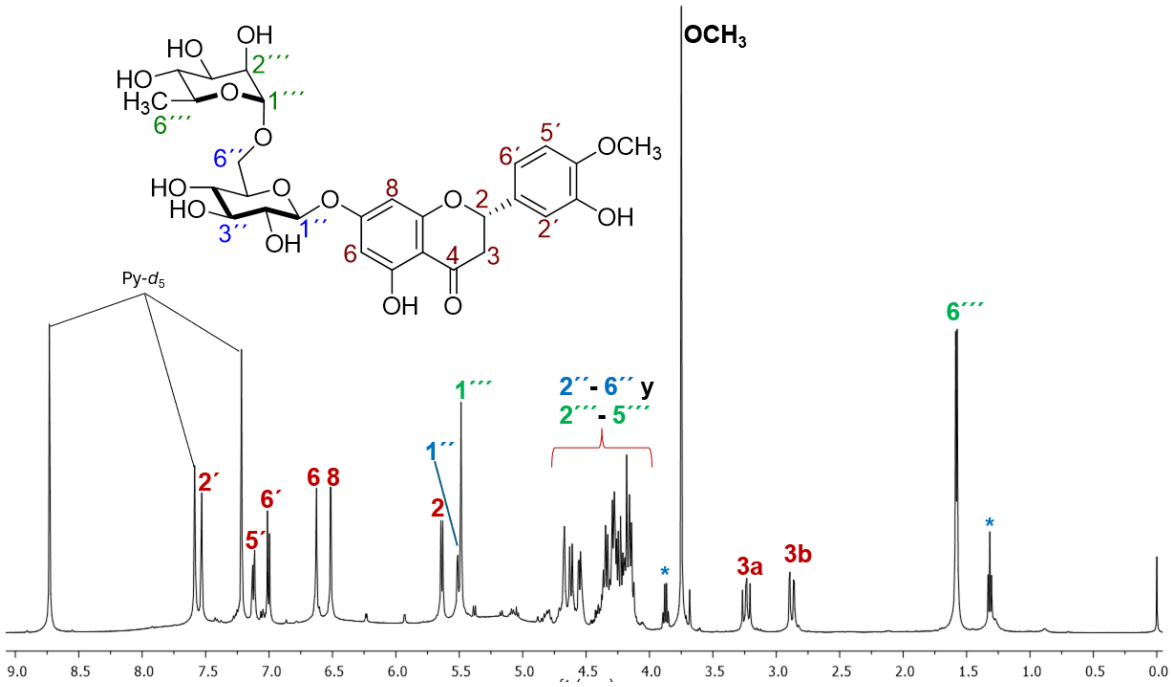


Figura 10. Espectro de RMN de H^1 (500 MHz, piridina-d_5) de la hesperidina.

En cuanto al espectro de ^{13}C (Figura 11), la señal C-4 cercana a 200 ppm es característica del grupo carbonilo. Las señales de los azúcares se encuentran entre 65 y 85 ppm por haber un enlace carbono-oxígeno, a excepción de los C-1” y 1”” que se encuentran ligeramente desplazados a campo bajo por ser doblemente oxigenados; y del C- 6”” que por ser un CH_3 se encuentra a campo alto con una señal cercana a los 18 ppm. Normalmente los aromáticos aparecen entre 110 y 140 ppm; sin embargo, en la hesperidina sus señales aparecen entre 95 y 170 ppm, esta diferencia en desplazamiento se debe a que los carbonos 5,7 y 9 no solo son

aromáticos, sino que también se encuentran adyacentes a oxígeno. La señal del metoxilo se encuentra cercana a las 55 ppm.

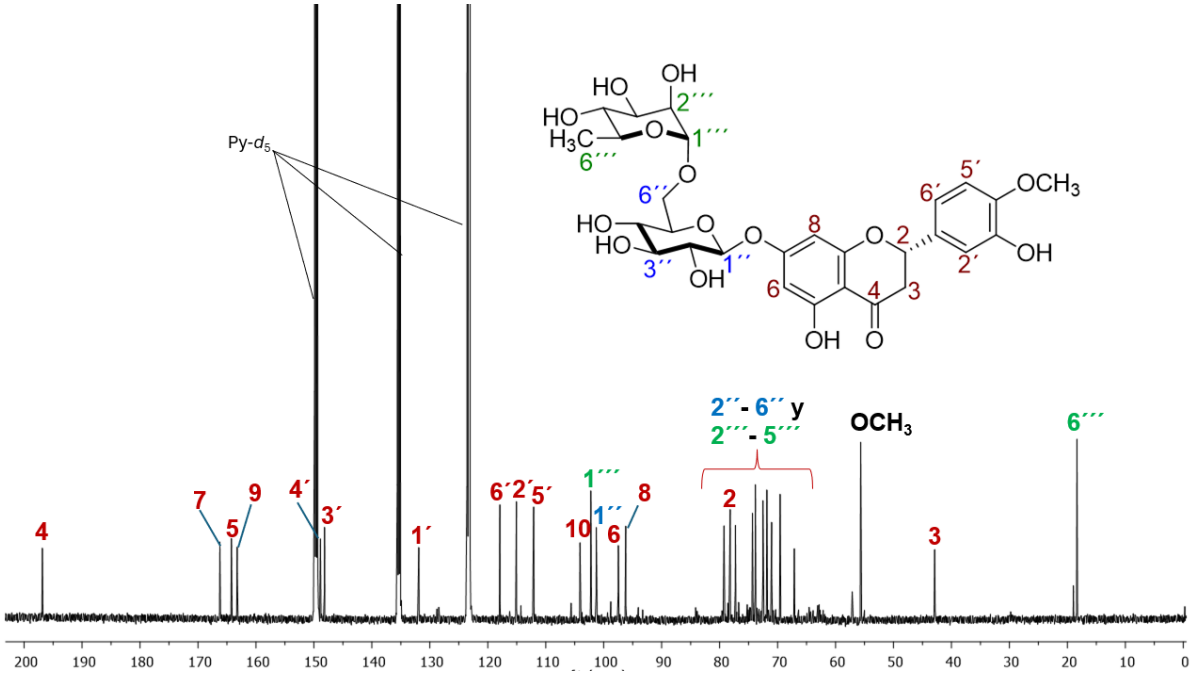
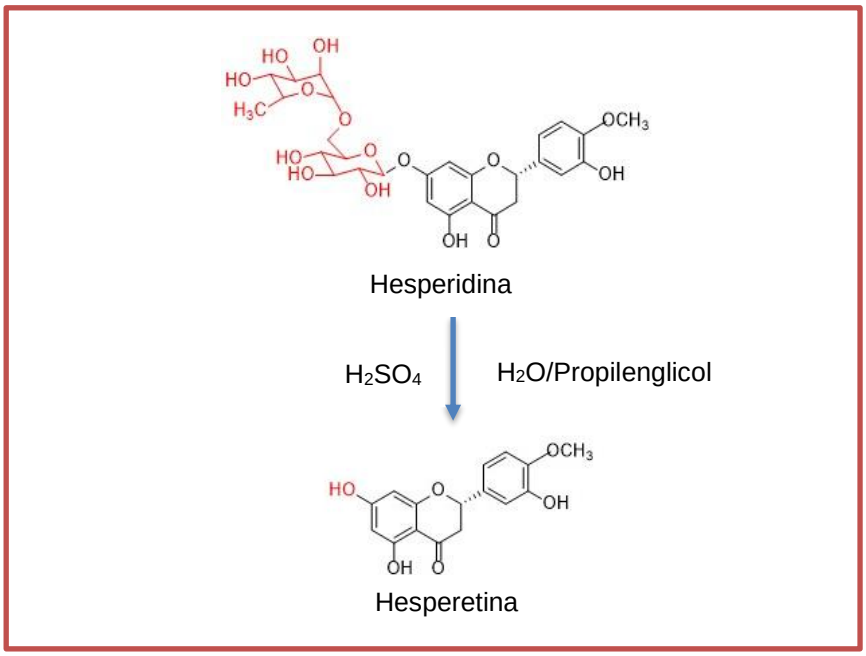


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, piridina-d_5) de la hesperidina.

V.2. Obtención de hesperetina a partir de hesperidina

La hesperetina es la aglicona de la hesperidina, es decir, posee su misma estructura sin los dos azúcares que van unidos a ella mediante un enlace *O*-glucosídico, que, por ser un éter, puede romperse mediante hidrólisis ácida. En el Esquema 1, se representa la reacción; en la parte superior se encuentra la hesperidina con sus dos azúcares en rojo y en la parte inferior se muestra la hesperetina con un hidroxilo color rojo en la posición donde anteriormente se encontraban los azúcares.



Esquema 1. Obtención de hesperetina mediante la hidrólisis de la hesperidina.

Se realizaron varios experimentos para encontrar las mejores condiciones de hidrólisis. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 100 °C, por 3 horas y usando ácido sulfúrico 1.5 N; lo que se evaluó en las distintas pruebas fue el disolvente utilizado como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de hidrólisis para la obtención de hesperetina.

Experimento	Disolvente	H_2SO_4 [N]	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)
1	Agua	1.5	3	SR
2	Agua	1.5	3	SR
3	Metanol	1.5	3	SR
4	Propilenglicol/agua 6:4	1.5	3	100 %

SR = sin reacción

El calor de reacción aumenta la solubilidad de la hesperidina en agua y en metanol; sin embargo, no es suficiente para que pueda reaccionar con el ácido y se lleve a cabo la hidrólisis de los azúcares. La mejor condición para esta reacción se encontró al usar como disolvente la mezcla propilenglicol con agua en una proporción 6:4, ya que la hesperidina es muy soluble en éste (Garg y col., 2001). El producto de la reacción de hidrólisis se analizó mediante HPLC con las condiciones descritas en la metodología (Ver punto IV.2) y se comparó su tiempo de retención (19.6 min) con un estándar comercial de hesperetina. El rendimiento obtenido de la hidrólisis ácida de la hesperidina fue del 100 %. En la Figura 12 puede observarse el cromatograma con un solo pico a un tiempo de retención de 19.68 minutos y el espectro UV-vis muestra que dicho compuesto posee una longitud de onda de máxima absorbancia de 288 nm; la diferencia encontrada con respecto al tiempo de retención de la materia prima y el producto es indicativa de que hubo una transformación química, pues la hesperidina eluye a los 14.24 minutos (Figura 9).

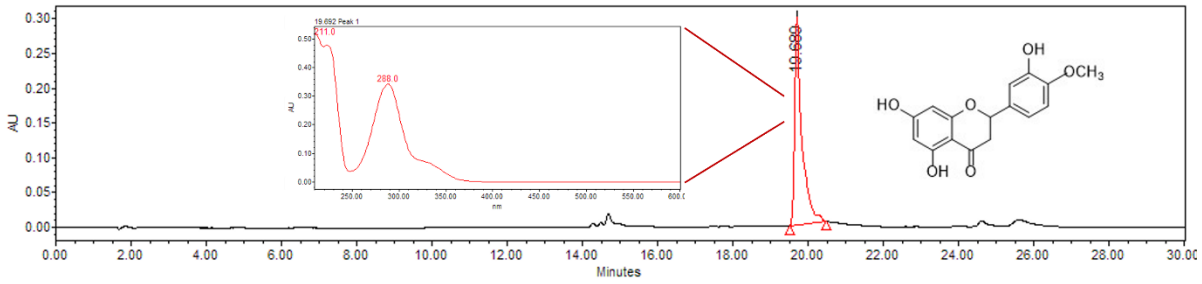


Figura 12. Cromatograma y espectro UV-Vis de la hesperetina obtenida a partir de hesperidina.

Para corroborar la identidad del producto, la hesperetina fue caracterizada mediante espectroscopia de RMN. La Figura 13 muestra su espectro de protón H^1, si lo comparamos con el espectro H^1 de la hesperidina (Figura 10), se observa muy similar con la excepción de que carece de las señales correspondientes a sus azúcares.

Entre 5.8 y 7 ppm aparecen los hidrógenos de los aromáticos. El hidrógeno del C2 aparece como un doble de dobles cercano a 5.4 ppm. Los hidrógenos del C3 (a y b)

se muestran como 2 señales por estar adyacentes a un carbono quiral y el metoxilo se encuentra alrededor de 3.9.

.

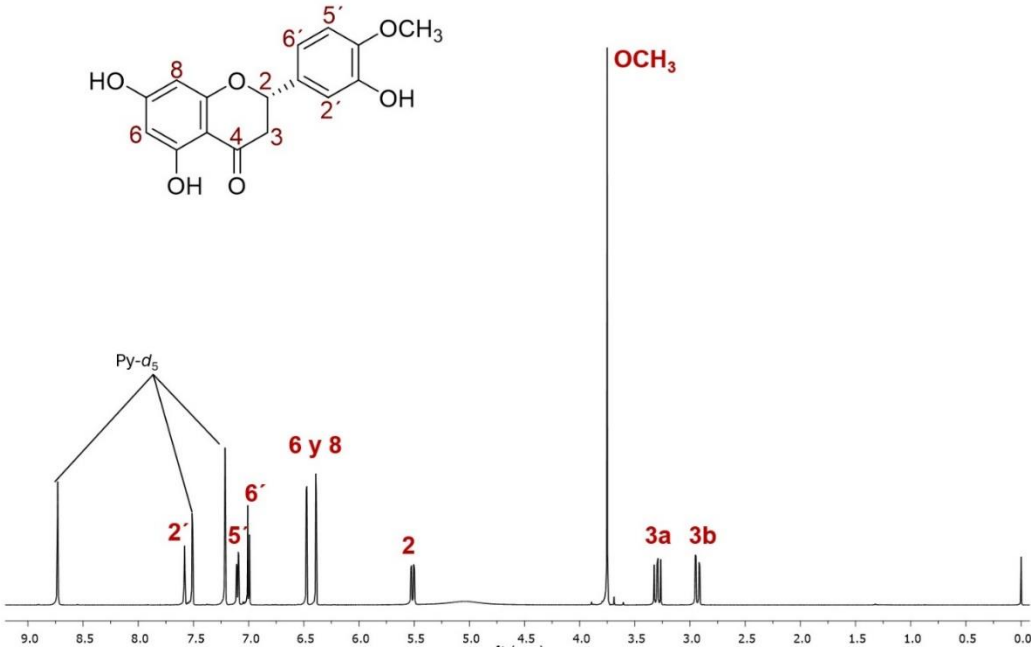


Figura 13. Espectro de RMN de H^1 (500 MHz, piridina-d_5) de la hesperetina.

En la Figura 14, puede apreciarse el espectro de ^{13}C de la hesperetina. En él, se destaca el C4 perteneciente al grupo carbonilo, ubicado en el campo más bajo del espectro. Los carbonos aromáticos se encuentran normalmente entre 110 y 160 ppm, sin embargo, en este espectro el rango se extiende ligeramente a 100-170 ppm debido a la presencia de oxígeno en la molécula que desplazan las señales a campo bajo. La señal del metino (C2) se observa cercana a 80 ppm y la del metileno (C3) aparece en la región del campo más alto del espectro, alrededor de 45 ppm. La señal del metoxilo se encuentra en 55 ppm, típica de un carbono monooxigenado.

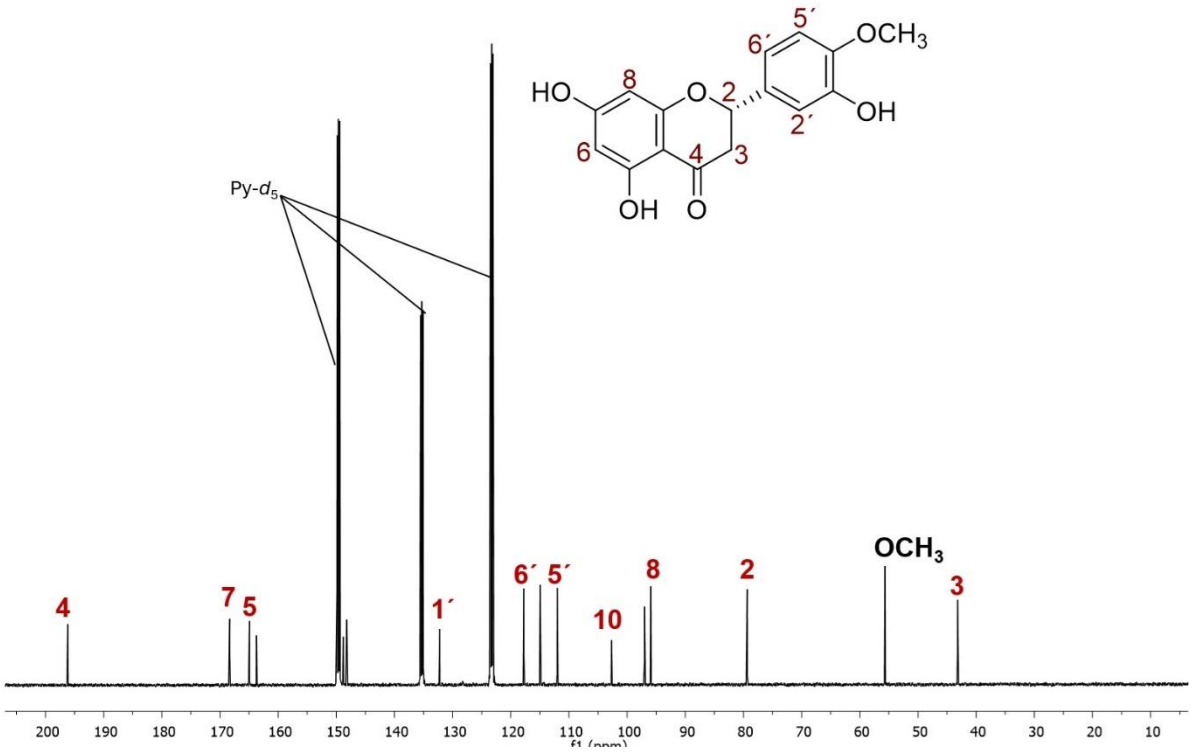
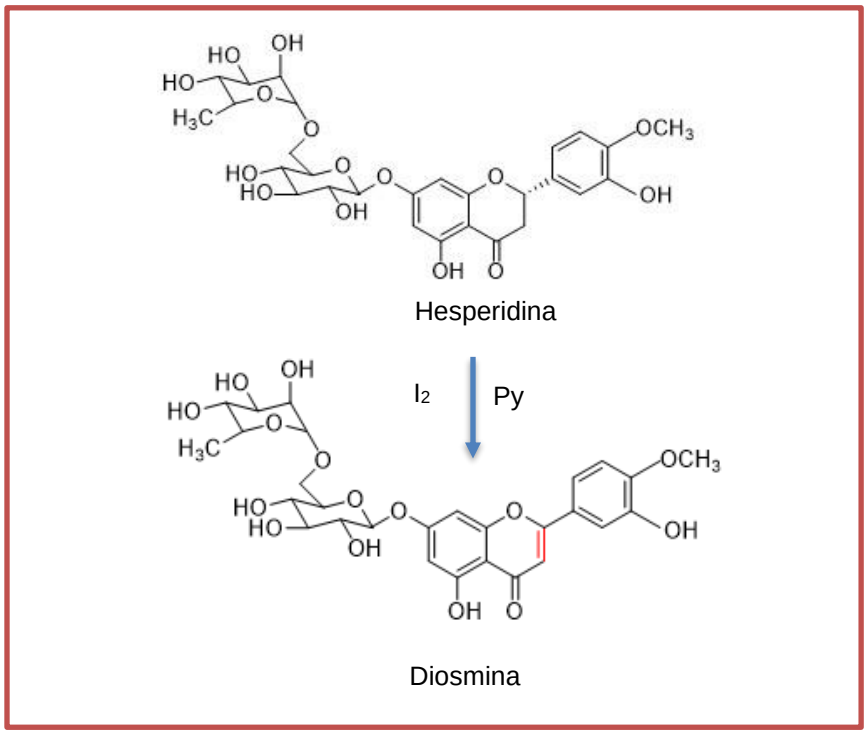


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, piridina-d_5) de la hesperetina.

V.3.Obtención de diosmina a partir de hesperidina

También se logró obtener la diosmina a partir de la oxidación de la hesperidina. Se eligió yodo como reactivo por ser altamente oxidante y relativamente fácil de manipular por encontrarse en estado sólido a diferencia de los otros halógenos. La piridina se utilizó como disolvente por dos razones principales: la primera razón es que por ser una base orgánica, ayuda a que ocurra la reacción de deshidrohalogenación (López, 2021), la segunda razón y la más importante, es que la hesperidina es altamente soluble en ella.

La diosmina tiene una estructura muy similar a la hesperidina, salvo que tiene un doble enlace entre el carbono 2 y el 3 en el anillo C (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis de diosmina a partir de hesperidina.

Para lograr la semisíntesis de este compuesto, se realizaron los experimentos mostrados en la Tabla 4. En ambos casos se utilizó yodo (I_2) como oxidante disuelto en piridina y la temperatura a la cual ocurrió la reacción fue a 95 °C. La diferencia en rendimiento pudo haberse debido a una ligera presencia de agua en el experimento número 1, pues esta reacción debe realizarse en condiciones anhidras.

Tabla 4. Condiciones de reacción para la obtención de diosmina.

Experimento	Disolvente	Tiempo de reacción (h)	Conversión (%)
1	Piridina	24 h	75 %
2	Piridina	24 h	100 %

El avance de cada una de las reacciones realizadas en este trabajo se siguió mediante HPLC. En la Figura 15, se aprecia el cromatograma donde se observa un pico con un tiempo de retención de 14.1 minutos.

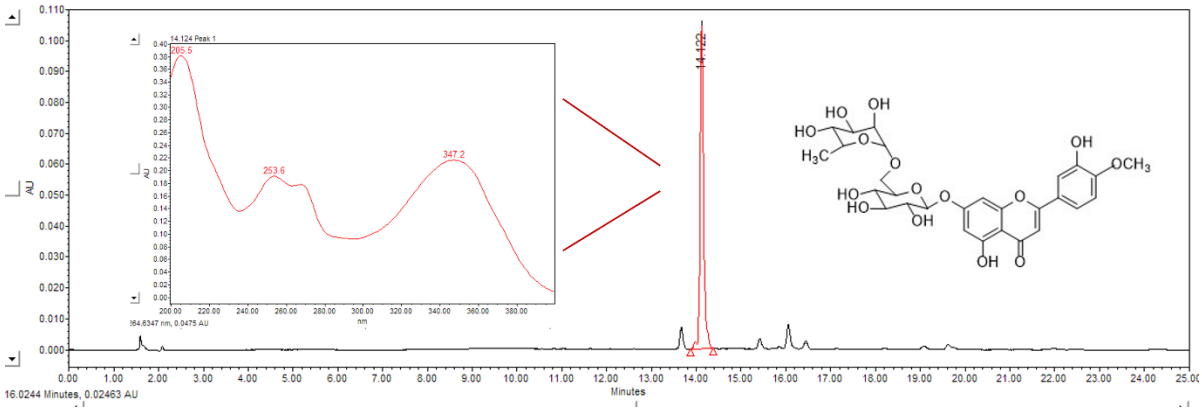


Figura 15. Cromatogama y espectro UV-Vis de la diosmina obtenida a partir de la hesperidina.

Cabe resaltar que, debido a la similitud estructural de ambas moléculas (diosmina y hesperidina) y por ende una polaridad similar, su tiempo de retención en el análisis cromatográfico (14.12 minutos) es muy cercano y puede confundirse con el de la hesperidina que es de 14.2 minutos. Sin embargo, esta posible confusión en cuanto al tiempo de retención puede ser resuelta al obtener el espectro de UV-Vis para cada pico cromatográfico. La Figura 16 muestra los espectros de ambas moléculas. En ella, puede apreciarse que la hesperidina posee una $\lambda_{máx.}$ de 284.3 nm, mientras que la diosmina presenta un efecto batocrómico con una $\lambda_{máx.}$ de 347.2 nm; este desplazamiento es consecuencia de aumentar la conjugación.

Hesperidina

Diosmina

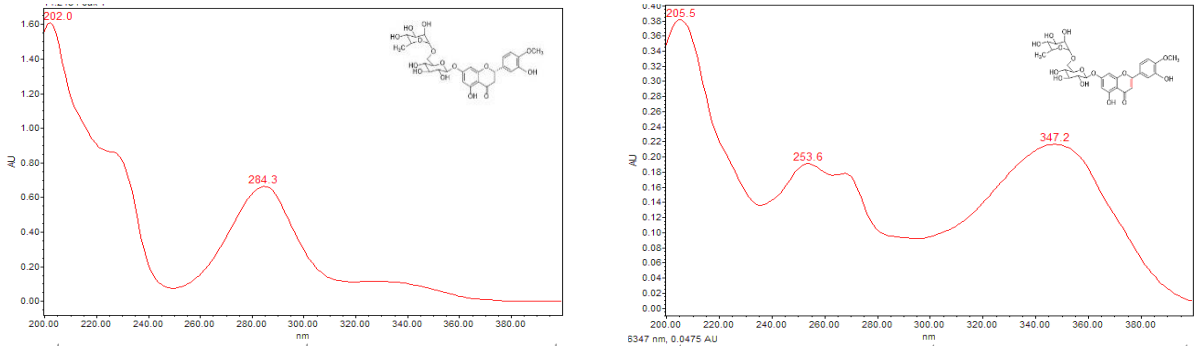


Figura 16. Espectros UV-vis de la hesperidina y la diosmina.

Para confirmar que el producto de reacción fuera diosmina, se realizó su caracterización mediante RMN. En la Figura 17 se muestra el espectro de H^1. A diferencia de la hesperidina (Figura 10), la diosmina carece de la señal del hidrógeno unido al C-2 debido a que su estructura es de una flavona. De igual forma, se observa una sola señal arílica a 6.8 ppm para el hidrógeno del C-3, mientras que en la hesperidina se observaban dos señales de los hidrógenos diastereotópicos. El pico del metoxilo se encuentra a 3.8 ppm y las señales de los azúcares entre 4 y 6 ppm. Los hidrógenos aromáticos se muestran entre 6.8 y 8 ppm.

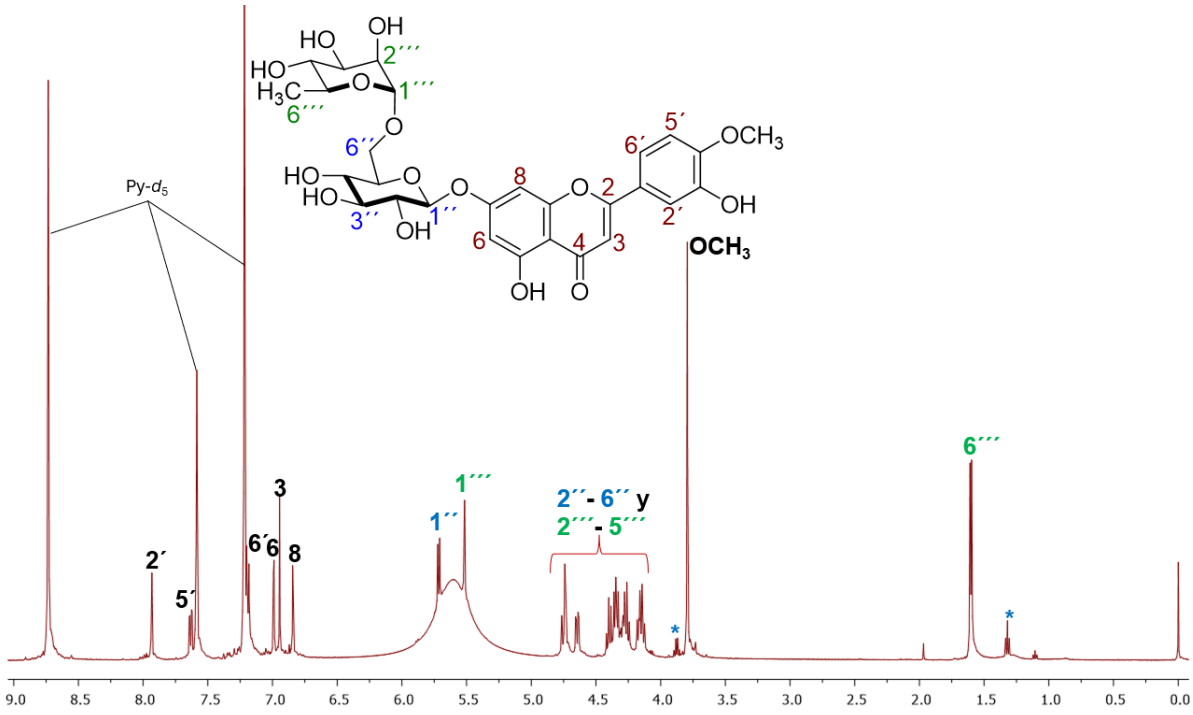


Figura 17. Espectro de RMN de H^1 (500 MHz, piridina-d_5) de la diosmina.

En cuanto al espectro ^{13}C (Figura 18), las señales que cambian con respecto al de la hesperidina (Figura 11) son las del carbono 2 y 3 que se desplazan de 78 y 42 ppm, a campo más bajo hacia 165 y 105 respectivamente, ya que, ahora se encuentran dentro de un sistema de dobles enlaces conjugados.

El resto de las señales tienen un comportamiento muy similar, resaltando la presencia de azúcares entre 65 y 80 ppm, las señales de los aromáticos entre 85 y 165 ppm, el carbonilo a 184 ppm y el metoxilo cercano a 55 ppm.

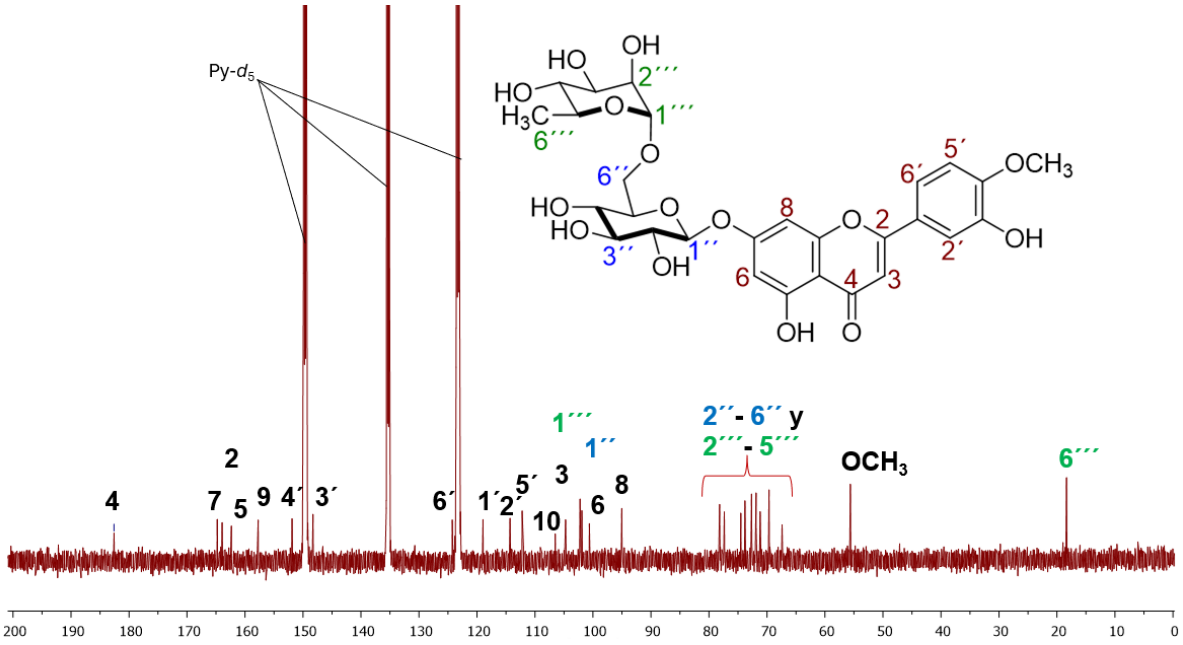


Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, piridina-d_5) de la diosmina.

Se incluyó también un espectro bidimensional HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) (Figura 19). En él, se resaltan dos señales, la del C6´´´ y la del metoxilo. Para la del C6´´´, podemos observar el punto de convergencia entre el carbono que se encuentra en el eje *y* a 18 ppm y sus hidrógenos en el eje *x* (f2) alrededor de 1.6 ppm; ambas se muestran como líneas color azules. En el caso del metoxilo, el punto de intersección se da entre la señal del carbono cercano a 55 ppm encontrado en el eje *y* (f1), y su hidrógeno en el eje *x* a 3.8 ppm, como lo muestran las líneas negras.

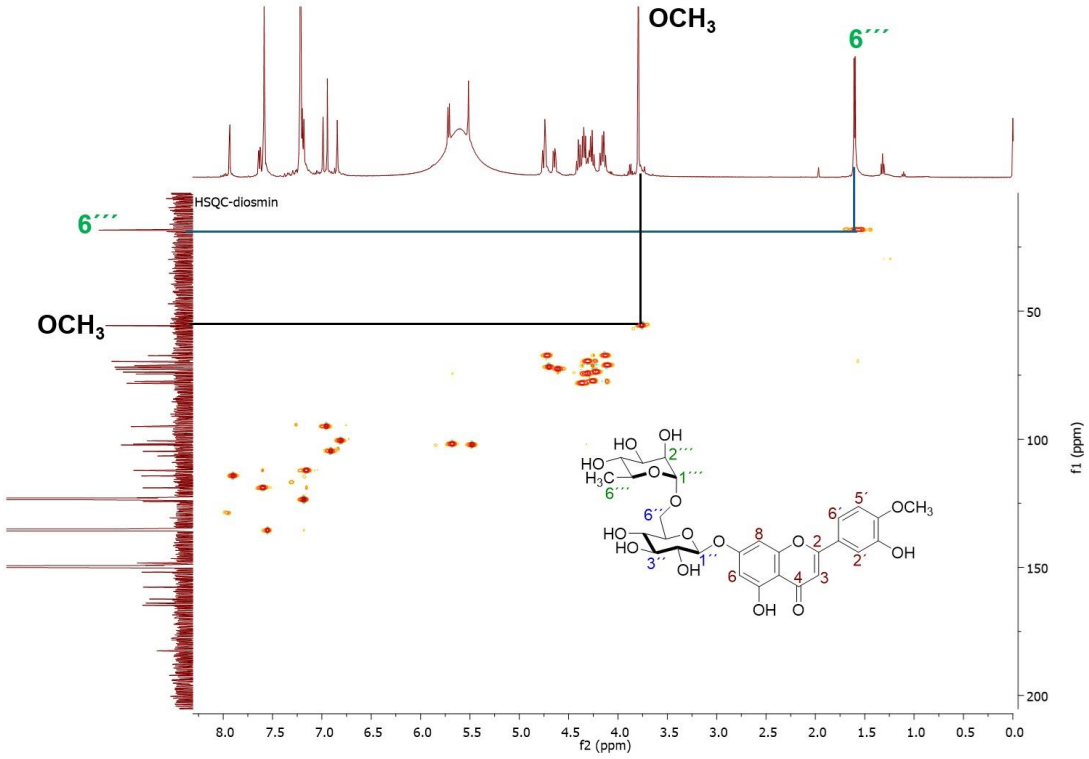
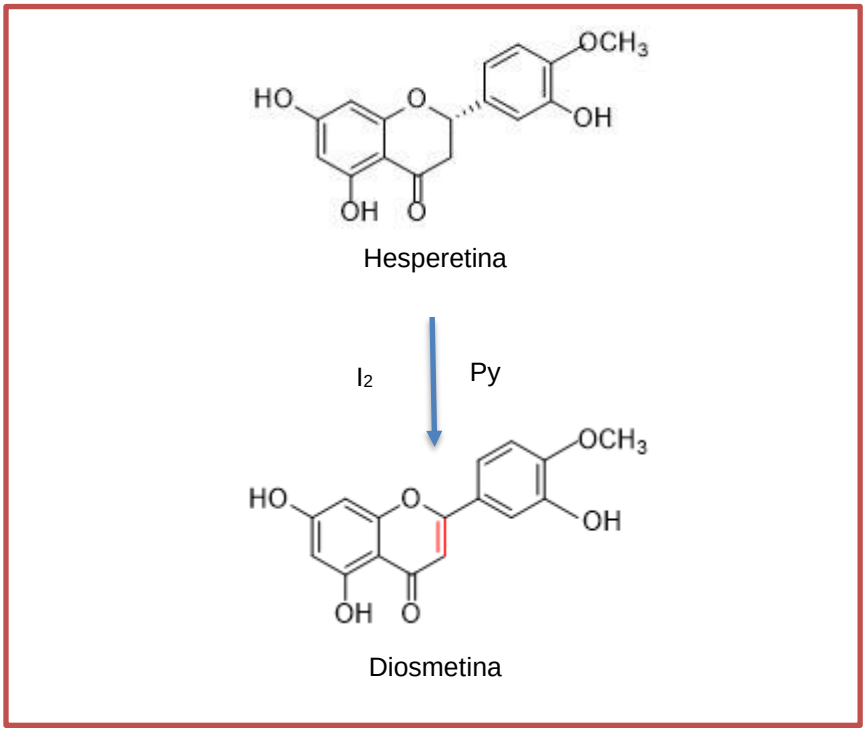


Figura 19. Espectro de RMN bidimensional HSQC (500 MHz, piridina-d_5) de la diosmina.

V.4.Obtención de diosmetina a partir de hesperetina

La metodología para la síntesis de diosmetina es muy similar a la de la diosmina, a excepción de que su precursor es la hesperetina. El esquema 3 representa la reacción y en él se observa que los carbonos 2 y 3 de la hesperetina sufren una oxidación, dando lugar a un doble enlace que se observa en color rojo.



Esquema 3. Síntesis de diosmetina a partir de hesperetina.

Para la obtención de diosmetina se usó también yodo (I_2) como oxidante y piridina como disolvente. Derivado de los resultados positivos obtenidos en la semisíntesis de la diosmina, se utilizó el mismo tiempo de reacción (24 horas) (Tabla 5), para la cual se obtuvo un porcentaje de conversión del 100 %. Con la intensión de optimizar el tiempo de reacción, se evaluaron otras condiciones con menor tiempo: 16 y 12 horas. Sin embargo, el porcentaje de conversión disminuyó conforme lo hizo el tiempo de la reacción (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de reacción para la obtención de diosmetina.

Experimento	Disolvente	Tiempo de reacción (h)*	Rendimiento (%)
1	Piridina	24 h	100 %
2	Piridina	16 h	70 %
3	Piridina	12 h	30 %

*Todas las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de 95 °C.

Para confirmar que se hubiese obtenido diosmetina se analizó mediante HPLC. El cromatograma de la Figura 20 muestra un pico a los 20.12 minutos y al extraer su espectro UV-Vis se observa un valor de $\lambda_{máx}$ de 344.1 nm. Al realizar el análisis comparativo entre la hesperetina, la cual tiene un tiempo de retención similar (19.68 min) y una $\lambda_{máx}$ a 288 nm, contra la diosmetina se comprobó que, aunque poseen un tiempo de retención muy cercano, el desplazamiento batocrómico producto de la oxidación comprueba que se transformó toda la materia prima.

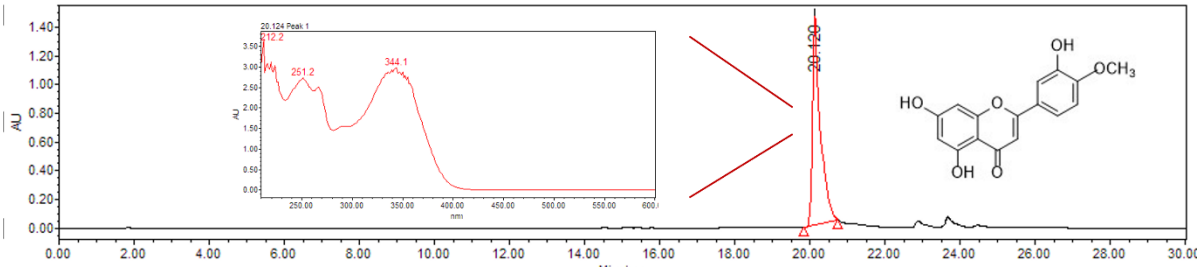


Figura 20. Cromatogama y espectro UV-Vis de la diosmetina obtenida a partir de la hesperetina.

El compuesto obtenido de esta transformación también fue caracterizado por RMN.

La Figura 21 muestra el espectro H^1. En él, se muestran las señales de los aromáticos entre 6.5 y 8 ppm, mientras que el grupo metoxilo aparece alrededor de 3.8 ppm. Los valores de los desplazamientos son prácticamente iguales a los que presenta la

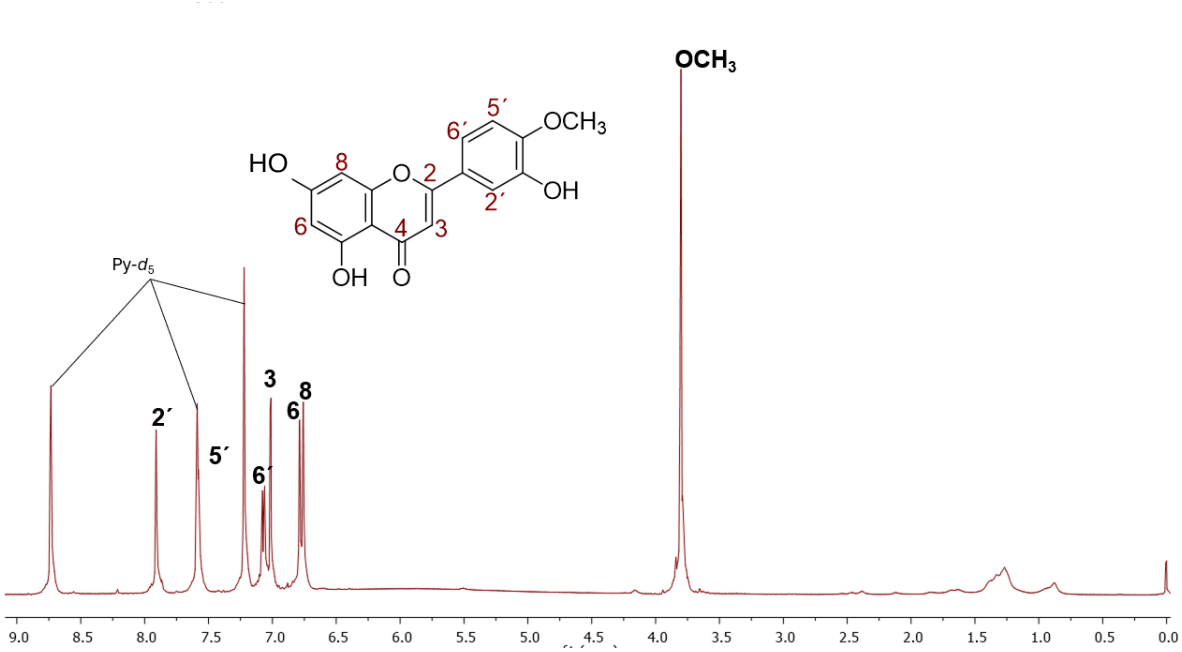


Figura 21. Espectro de RMN de H^1 (500 MHz, piridina-d_5) de la diosmetina.

diosmina (Figura 16); sin embargo, la diosmetina carece de las señales de los azúcares.

El espectro de ^{13}C se muestra en la Figura 22. De éste, se puede recalcar que el carbono 2 aparece a campo bajo muy cercano a los carbonos 5, 7, 9, 4´y 3´; pues todos ellos comparten un ambiente químico similar por estar dentro de un sistema conjugado y adyacentes a oxígenos. El resto de las señales pertenecen a los carbonos de los bencenos, a excepción de la señal del OCH_3, y la señal del C-4 que se encuentran en extremos opuestos, la primera a campo alto por ser un metilo y la segunda a campo bajo por pertenecer a un carbono carbonílico.

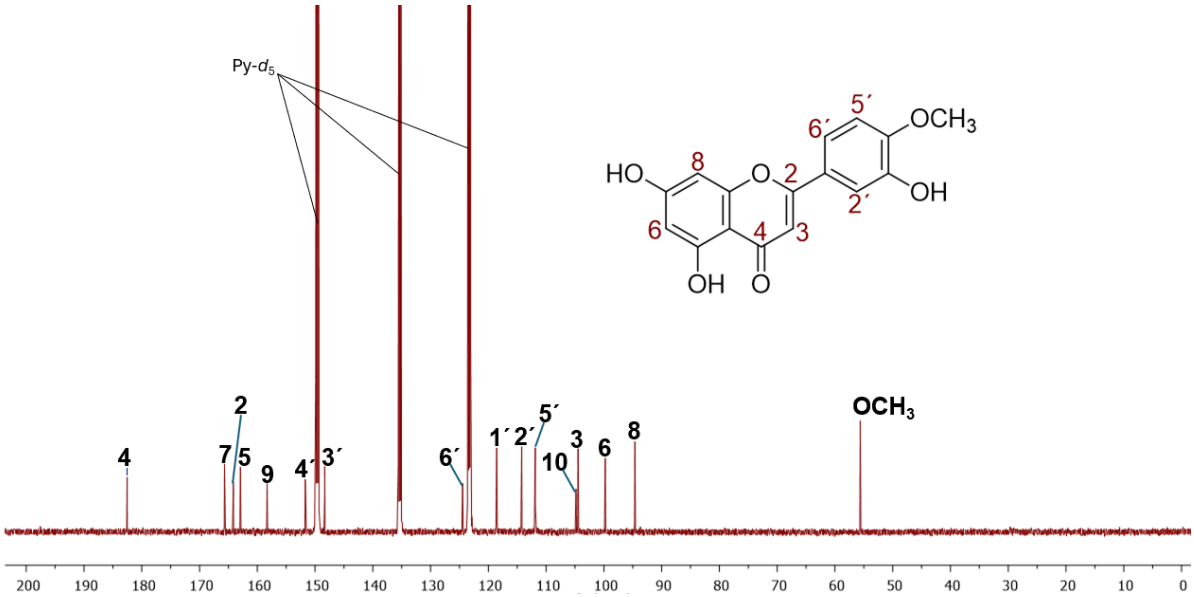


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, piridina-d_5) de la diosmetina.

Para corroborar la identidad de los hidrógenos, se usó un espectro bidimensional HMBC (*Heteronuclear Mutiple Bond Correlation*) (Figura 23). El C-4 resaltado en el eje *y* nos proporciona información sobre los hidrógenos que están cercanos a él y las líneas negras muestran los puntos de intersección entre el carbono y los hidrógenos que se encuentran a 2 y 3 enlaces de distancia. El hidrógeno 2´ pertenece a un aromático, se encuentra a tres enlaces de distancia y a campo más bajo (cercano a 7.8 ppm) por ser el más cercano a un hidroxilo. El H-5´ está enlazado a un aromático, se encuentra a dos enlaces de distancia y se desplaza ligeramente (alrededor de 7.6 ppm) por ser también cercano al oxígeno del metoxilo; el H-6´ está a 3 enlaces de distancia, es aromático y se observa cercano a 7 ppm; finalmente, los hidrógenos del metoxilo se encuentran en el campo más alto del espectro de H^1 a 3.8 ppm y a 2 enlaces de distancia del C-4´.

Otro carbono representativo del HMBC es el C-4, encontrado en el eje *y,* y fácilmente identificable por la señal representativa del carbonilo. Este nos proporciona la

información únicamente del H-3, debido a que es el único cercano a él. La línea azul muestra la intersección entre el carbono y el hidrógeno.

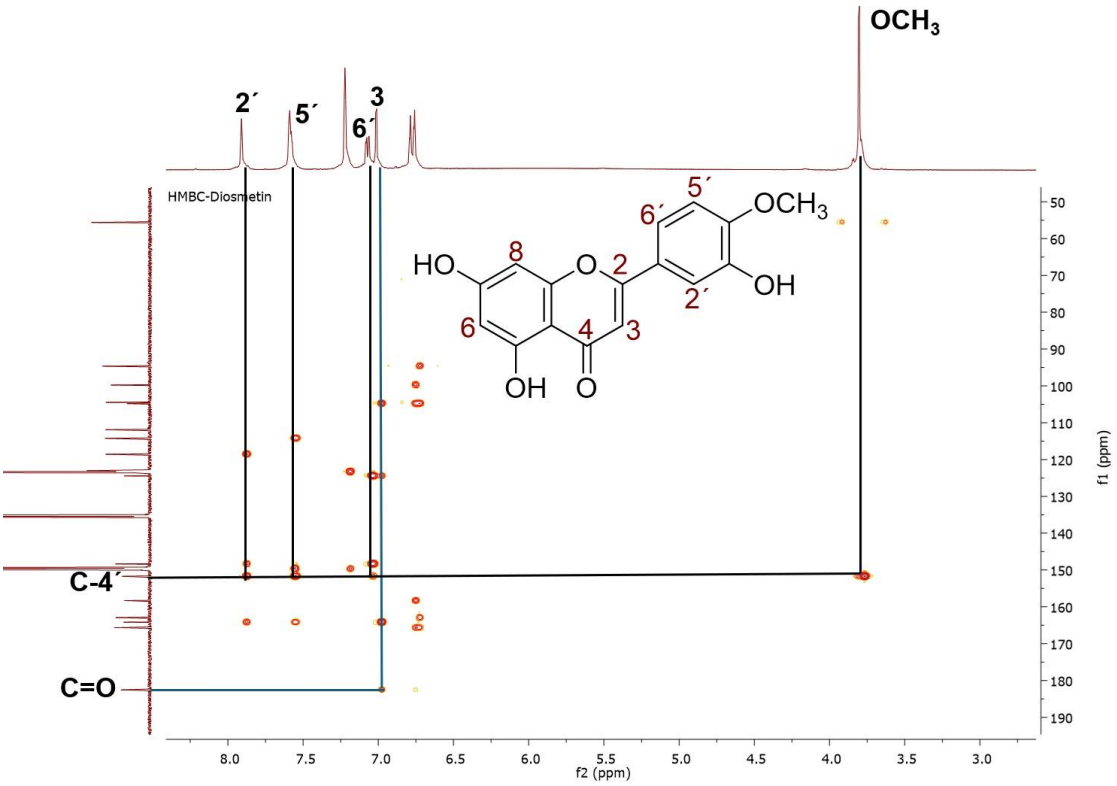
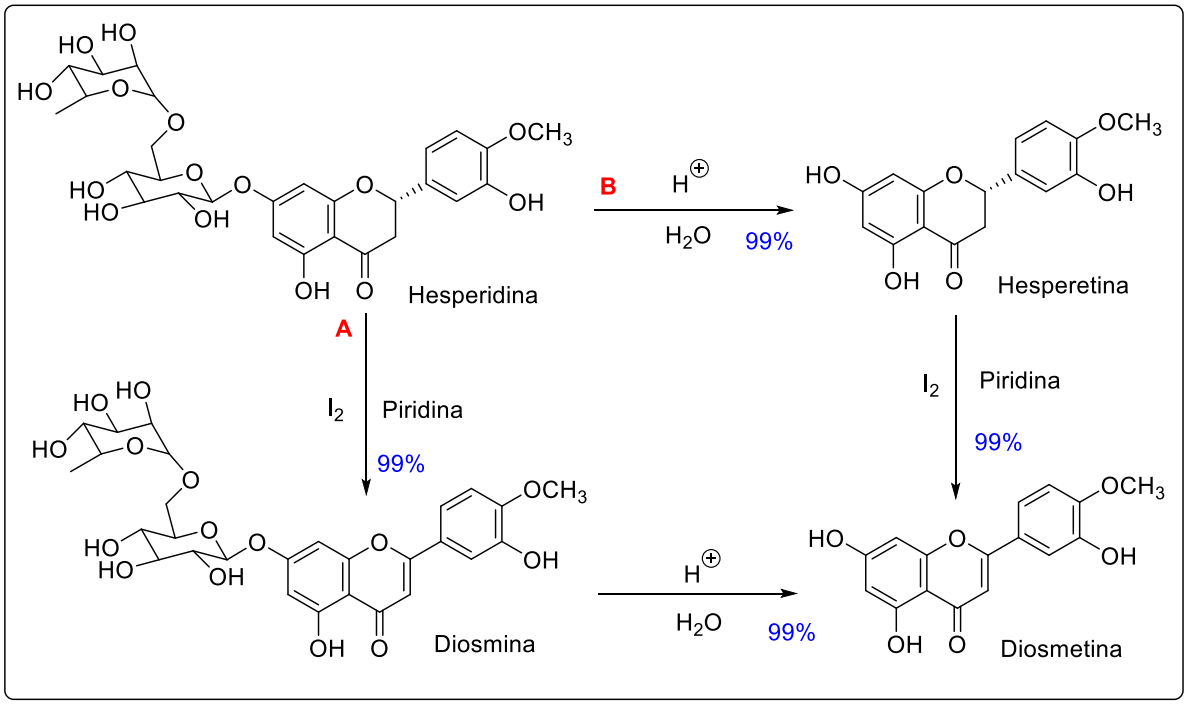


Figura 23. Espectro de RMN bidimensional HMBC (500 MHz, piridina-d_5) de la diosmetina.

V.5.Mejor ruta para la obtención de diosmetina

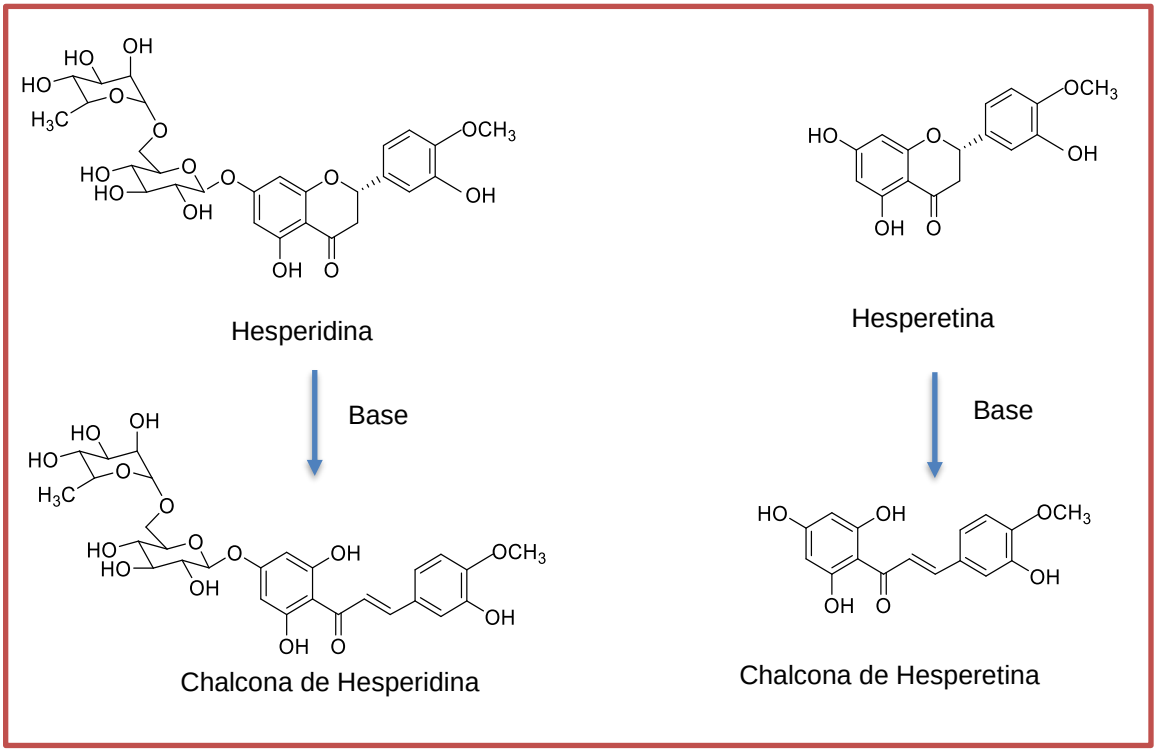
A partir de las distintas reacciones llevadas a cabo (hidrólisis y oxidación) es importante mencionar cuál es la ruta óptima para lograr la semisíntesis de la diosmetina (Esquema 4). Analizando la ruta A (*vía* diosmina), se encontró que el rendimiento global es el mismo que cuando se sigue la ruta B (vía hesperetina), siendo del 99 %. En ese sentido, es indistinto iniciar con la hidrólisis de la hesperidina que primero llevar a cabo la oxidación, seguida de la hidrólisis y/o una oxidación consecutiva. Sin embargo, se puede destacar que, de manera experimental, es más fácil tratar con la hesperetina que con la hesperidina, por la susceptibilidad que tiene ésta a hidrolizarse. En ese sentido, es más accesible seguir la ruta B.



Esquema 4. Rutas para la obtención de diosmetina.

V.6.Obtención de las chalconas de hesperidina y hesperetina

Las chalconas son derivados de flavonoides ya que no poseen el anillo C. En este trabajo, se realizaron distintas pruebas para sintetizar la chalcona de hesperidina y la de hesperetina a partir de hesperidina y hesperetina respectivamente. Para dichas transformaciones, se usaron distintas bases (Esquema 5). Sin embargo, no fue posible obtener las chalconas a pesar de haber evaluado distintas condiciones de reacción.



Esquema 5. Esquema de obtención de chalconas de hesperidina y hesperetina.

La Tabla 6 muestra las distintas condiciones de reacción que fueron evaluadas para obtener la chalcona de hesperidina. En la Tabla 7, se muestran las condiciones para la obtención de la chalcona de hesperetina. Como se observa en ambas tablas, se hizo un diseño experimental en el que se varió la base usada, la concentración de la base, el disolvente, la temperatura y el tiempo. Sin embargo, en ninguna de estas, se obtuvo un resultado exitoso.

Tabla 6. Condiciones de reacción para la obtención de la chalcona de hesperidina.

Experimento	Base	Concentración	Disolvente	T° (°C)	Tiempo (horas)
1	NaOH	0.5 mmol	Agua, etanol 1:1	90	0.5
2	NaOH	0.5 mmol	Agua, propilenglicol 1:1	130	1
3	NaOH	0.5 mmol	Agua, propilenglicol 1:1	130	2
4	NaOH	10 mmol	Sin disolvente	130	1
5	NaOH	10 mmol	Agua, propilenglicol 1:1	130	2
6	NaOH	10 mmol	Agua, propilenglicol 1:1	130	4
7	NaOH	5 mmol	Agua, propilenglicol 1:1	130	16
8	NaOH	01:20	Agua: Metanol	100	2
9	DBU	01:10	Agua: Metanol	100	2
10	NaOH	01:10	Agua: Metanol	40	10 min
11	KOH	01:10	Agua: Etanol	40	10 min

Tabla 7. Condiciones de reacción para la obtención de la chalcona de hesperetina.

Experimento	Base	Concentración	Disolvente	T (°C)	Tiempo (h)
1	NaOH	0.5 mmol	Agua, propilenglicol 1:1	130	1
2	NaOH	10 mmol	Agua, propilenglicol 1:1	130	4
3	NaOH	01:20	Metanol:Agua	100	16

En las Figuras 24 y 25 se observan algunos cromatogramas de los productos obtenidos y sus respectivos espectros UV-Vis. En dichos cromatogramas se observan mayoritariamente la materia prima y el producto de la hidrolisis ácida. Los

demás picos, debido a la baja concentración inyectada en este análisis, son ruido y desgaste de la columna cromatográfica.

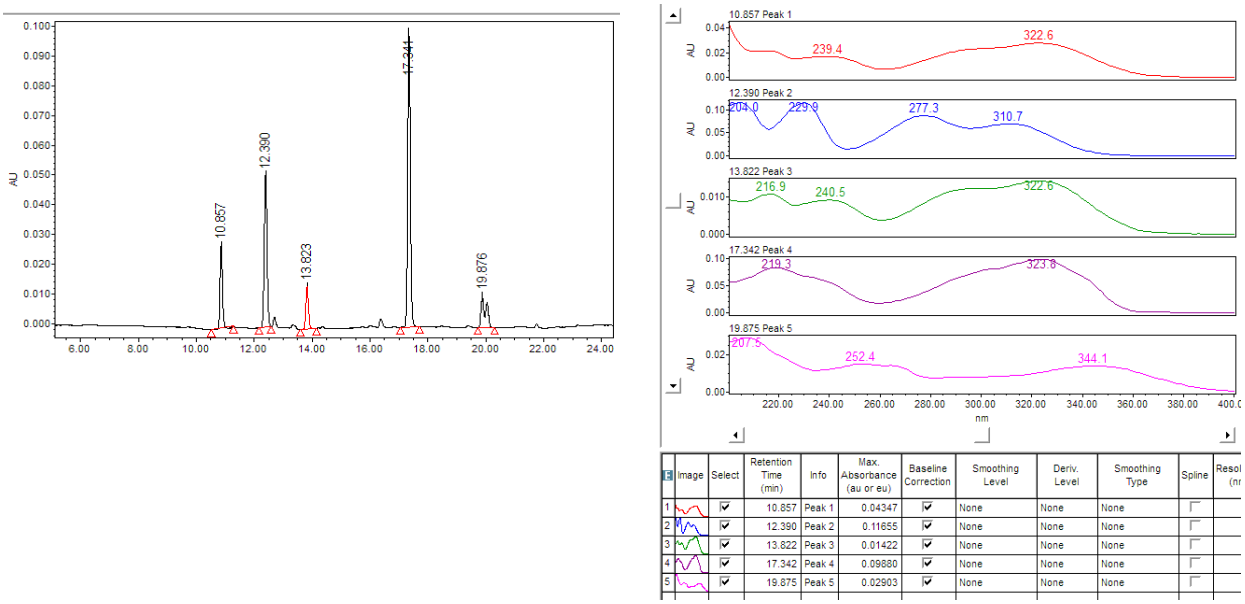


Figura 24 . Cromatograma de la chalcona de hesperidina, experimento 6 de la Tabla 5.

Tiempo de retención de hesperidina: 14.24. Tiempo de retención de hesperetina: 19.68

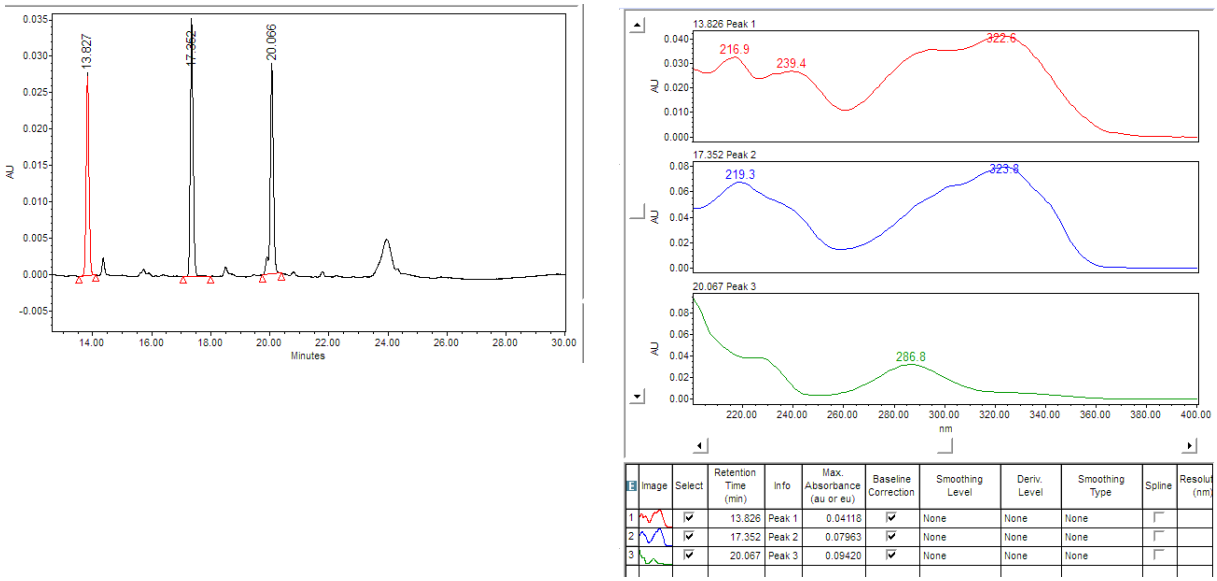


Figura 25. Cromatograma de chalcona de hesperetina. Experimento 2 de la Tabla 6.

Tiempo de retención de hesperidina: 14.24. Tiempo de retención de hesperetina: 19.68

VI. CONCLUSIONES

1. Se logró extraer el flavonoide hesperidina mediante ultrasonido a partir del albedo fresco de la naranja (*Citrus sinensis*).
2. La hesperidina es un precursor de fácil acceso para la obtención de otros flavonoides relevantes con actividad biológica comprobada.
3. Se logró la obtención de las agliconas de la hesperidina y diosmina mediante hidrólisis ácida. Asimismo, se lograron las semisíntesis de la diosmina a partir de la hesperidina y de la diosmetina a partir de la hesperetina, mediante una reacción de oxidación catalizada con yodo y piridina, con un 99 % de conversión.
4. La síntesis de las chalconas no fue exitosa, por lo que se recomienda a partir de las condiciones evaluadas en este trabajo realizar un diseño experimental para poder encontrar las condiciones óptimas de reacción.
5. Se confirmó la naturaleza química, mediante RMN de ^{1}H, ^{13}C y bidimensionales, de la hesperidina extraída, de la hesperetina, diosmina y diosmetina obtenidas mediante semisíntesis.

VII. REFERENCIAS

Al-Ashaal, H. A., & El-Sheltawy, S. T. (2011). Antioxidant capacity of hesperidin fromcitruspeel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. *Pharmaceutical Biology*, 49(3), 276–282.

Barreca, D., Mandalari, G., Calderaro, A., Smeriglio, A., Trombetta, D., Felice, M. R., & Gattuso, G. (2020). Citrus flavones: An update on sources, biological functions, and health promoting properties. *Plants,* 9(3), 288.

Bussmann, A. J. C,, Zaninelli, T. H., Saraiva-Santos, T., Fattori, V., Guazelli, C. F. S., Bertozzi, M. M., Andrade, K. C., Ferraz, C. R., Camilios-Neto, D., Casella, A. M. B., Casagrande, R., Borghi, S. M., & Verri, W. A. (2022). The flavonoid hesperidin methyl chalcone targets cytokines and oxidative stress to reduce diclofenac-induced acute renal injury: Contribution of the Nrf2 redox-sensitive pathway. *Antioxidants*, 11(7), 1261.

Chanson-Rolle, A., Braesco, V., Chupin, J., & Bouillot, L. (2016). Nutritional Composition of Orange Juice: A Comparative Study between French Commercial and Home-Made Juices. *Food and Nutrition Sciences*, 7, 252-261.

Cho, J. (2006). Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. *Archives of Pharmacal Research*, 29(8), 699–706.

Choi, J., Lee, D. H., Park, S. Y., & Seol, J. W. (2019). Diosmetin inhibits tumors development and block tumor angiogenesis in skin cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 117, 109091.

Choi, S. S., Lee, S. H., & Lee, K. A. (2022). A Comparative Study of Hesperetin, Hesperidin and Hesperidin Glucoside: Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antibacterial Activities In Vitro. *Antioxidants*, 11,1618.

Escobedo, Z., Gutiérrez, J., Valdez, A., Torres, J. A., Welti, J. (2014). Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted orange. *Journal of Functional Foods*, 6, 470-481.

Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J., & Singla, A. K. (2001). Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin: HESPERIDIN - CHEMISTRY AND PHARMACOLOGY. *Phytotherapy Research: PTR*, 15(8), 655–669.

Hostetler, G. L., Ralston, R. A., & Schwartz, S. J. (2017). Flavones: Food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.),* 8(3), 423–435.

Huang, S. M., Tsai, S.Y., Lin, J.A., Wu, C. H., & Yen, G. C. (2012). Cytoprotective effects of hesperetin and hesperidin against amyloid β-induced impairment of glucose

transport through downregulation of neuronal autophagy. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(4), 601–609.

Huwait, E., & Mobashir M. (2022). Potential and therapeutic roles of Diosmin in human diseases. *Biomedicines*, 10(5),1076.

Le Bail, J. C., Pouget, C., Fagnere, C., Basly, J. P., Chulia, A. J., & Habrioux, G. (2001). Chalcones are potent inhibitors of aromatase and 17b-hydroxysteroid dehydrogenase activities. *Life Sciences*, 68, 751–761.

Li, C., & Schluesener, H. (2016). Health-promoting effects of the Citrus Flavonone Hesperidin. *Food Science and Nutrition*, 57, 613-631.

Li, Y., Kandhareb, A. D., Mukherjeeb, A. A., & Bodhankarb, S. L. (2019). Acute and sub-chronic oral toxicity studies of hesperidin isolated from orange peel extract in Sprague Dawley rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology,* 105, 77-85.

Li, Y. M., Li, X. M., Li, G. M., Du, W. C., Zhang, J., Li, W. X., Xu, J., Hu, M., & Zhu, Z. (2008). In vivo pharmacokinetics of hesperidin are affected by treatment with glucosidase-like BglA protein isolated from yeasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 56(14), 5550–5557.

López, F. J. (2021) Procedimiento para la preparación de diosmina. Traducción de patente Europea, Oficina Española de patentes y marcas.

Ma, G., Zhang, L., Sugiura, M., & Kato, M. (2020). Chapter 24: Citrus and health. *Elsevier*, 495–511.

Maqbool, Z., Khalid, W., Atiq, H. T., Koraqi, H., Javaid, Z., Alhag, S. K., Al-Shuraym, L. A., Bader, D. M. D., Almarzuq, M., Afifi, M., & Al-Farga, A. (2023). Citrus Waste as Source of Bioactive Compounds: Extraction and Utilization in Health and Food Industry. *Molecules*, 28(4),1636.

Martínez, M. F., Rodríguez E., Núñez A., Rodríguez A., Bah, M. (2022). Síntesis parcial de citroflavonoides a partir de la naringina. *Nthe*, 58 – 66.

Nicolaides, A. N., & Struckman, J. R. (1994). The pharmacodynamic and clinical activities of Daflon 500 mg: Therapeutic effect of micronization. *Phlebology,* 9, 7–9.

Ortiz, A. de C., Fideles, S. O. M., Reis, C. H. B., Bellini, M. Z., Pereira, E. de S. B. M., Pilon, J. P. G.; de Marchi, M. Â., Detregiachi, C. R. P., Flato, U. A. P., Trazzi, B. F. de M., Pagani, B. T., Ponce, J. B., Gardizani, T. P., Veronez, F. de S., Buchaim, D. V., & Buchaim, R. L. (2022) Therapeutic effects of citrus flavonoids neohesperidin, hesperidin and its aglycone, hesperetin on bone health. *Biomolecules*, 12(5), 626.

Ortiz, R., Araujo, J. A., Centeno, G., & Sansores, M. (2023). Las cáscaras de naranja: ¿Desechos de la agricultura o riqueza farmacéutica?. *Herbario CICY*, 15, 160-164.

Pyrzynska, K. (2022) Hesperidin: A review on extraction methods, stability and biological activities. *Nutrients*, 14(12), 2387.

Roohbakhsh, A., Parhiz, H., Soltani, F., Rezaee, R., & Iranshahi, M. (2014). Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin--a mini-review. *Life Sciences*, 113(1–2), 1–6.

Russo, R., Chandradhara, D., & De Tommasi, N. (2018). Comparative bioavailability of two diosmin formulations after oral administration to healthy volunteers. *Molecules,* 23(9), 2174.

SADER. (2016). Naranja, protección de invierno. Recuperado el 10/09/2023 de https://www.gob.mx/agricultura/articulos/naranja-proteccion-de-invierno#:~:text=En%20el%20mundo%20existen%20muchas,%2Dlane%2Dlate%20y%20navelina.

SADER. (2022). Escenario mensual de productos agroalimentarios. Recuperado el 09/01/2024 de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/759456/Naranja_Agosto_2022.pdf

Steinbruch, M., Nunes, C., Gama, R., Kaufman, R., Gama, G., Suchmacher Neto, M., Nigri, R., Cytrynbaum, N., Brauer Oliveira, L., Bertaina, I., Verrière, F., & Geller, M. (2020). Is nonmicronized Diosmin 600 mg as effective as micronized Diosmin 900 mg plus Hesperidin 100 mg on chronic venous disease symptoms? Results of a noninferiority study. *International Journal of Vascular Medicine*, 1–9.

Victor, M., David, J. M., Cortez, M. V. M., Leite, J. L., & da Silva, G. S. B. (2020). A high-yield process for extraction of hesperidin from orange (*Citrus sinensis L. osbeck*) peels waste, and its transformation to diosmetin, A valuable and bioactive flavonoid. *Waste and Biomass Valorization,* 12(1), 313–320.

Wdowiak, K., Walkowiak, J., Pietrzak, R., Bazan-Woźniak, A., & Cielecka-Piontek, J. (2022). Bioavailability of hesperidin and its aglycone hesperetin—compounds found in citrus fruits as a parameter conditioning the Pro-Health potential (neuroprotective and antidiabetic activity)—Mini-Review. *Nutrients*, 14(13), 2647.

Wilcox, L. J., Borradaile, N. M., de Dreu, L. E., & Huff, M. W. (2001). Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *The Journal of Lipid Research*, 42(5), 725–734.

Zaragozá, C., Monserrat, J., Mantecón, C., Villaescusa, L., Álvarez-Mon, M. Á., Zaragozá, F., & Álvarez-Mon, M. (2021). Binding and antiplatelet activity of quercetin, rutin, diosmetin, and diosmin flavonoids. *Biomedecine & Pharmacotherapie,* 141(111867), 111867.

Zheng, Y., Zhang, R., Shi, W., Li, L., Liu, H., Chen, Z., & Wu, L. (2020). Metabolism and pharmacological activities of the natural health-benefiting compound diosmin. *Food & Function,* 11(10), 8472–8492.

Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C., & Miao, Z. (2017). Chalcone: A privileged structure in medicinal chemistry. *Chemical Reviews,* 117(12), 7762–7810.

VIII. ANEXOS

Cromatograma de la hesperidina extraída del albedo de naranja, muestra 3. 2

Reacción de hidrólisis de hesperidina con etanol sin éxito. 2

Espectro bidimensional COSY de la diosmetina. 3

Espectro bidimensional COSY de la diosmina. 3

Espectro bidimensional COSY de la hesperidina. 4

Espectro bidimensional HMBC de la diosmetina. 4

Espectro bidimensional HMBC de la hesperidina. 5

Espectro bidimensional HSQC de la diosmetina. 5

Espectro bidimensional HSQC de la diosmina. 6

Espectro bidimensional HSQC de la hesperidina. 6

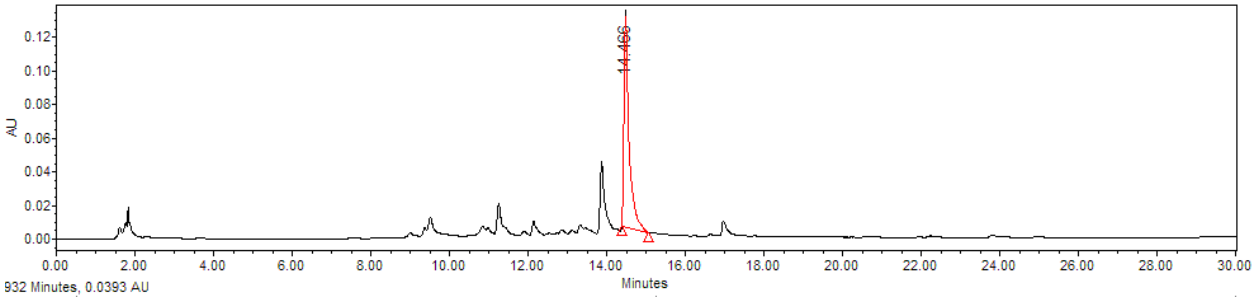


Figura 1. Cromatograma de la hesperidina extraída del albedo de naranja, muestra 3.

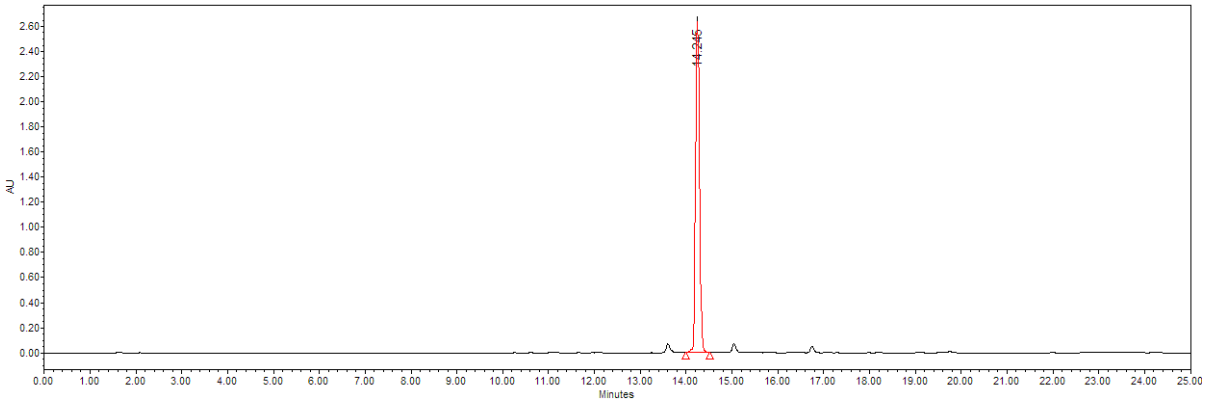


Figura 2. Reacción de hidrólisis de hesperidina con etanol sin éxito.

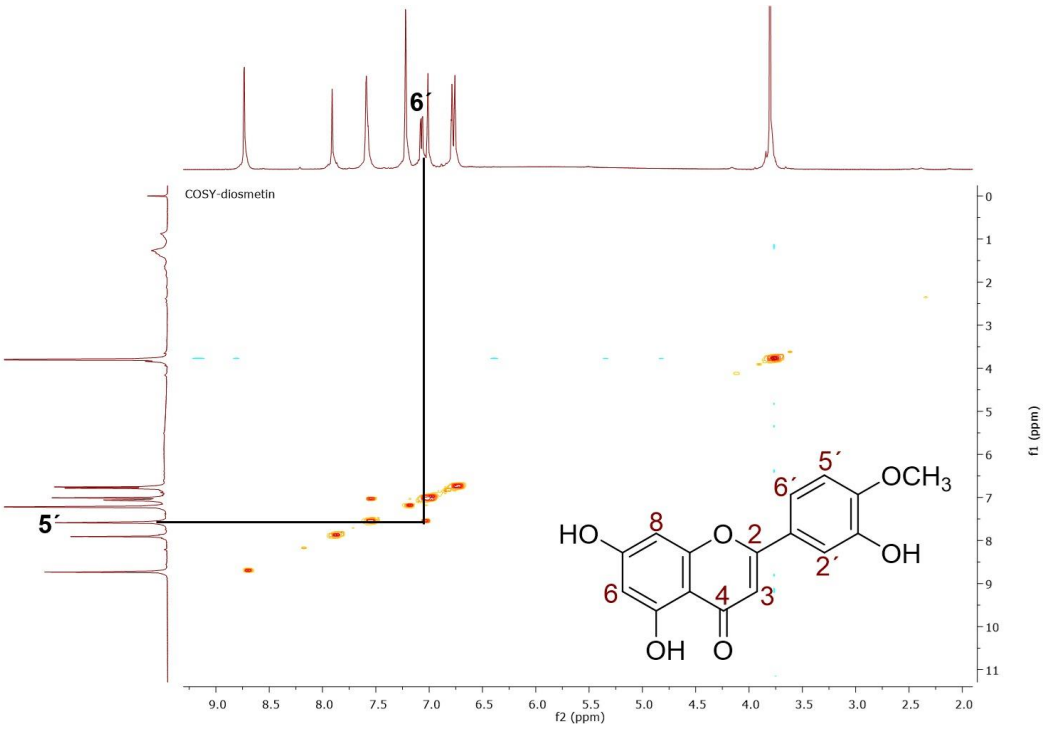


Figura 3. Espectro bidimensional COSY de la diosmetina.

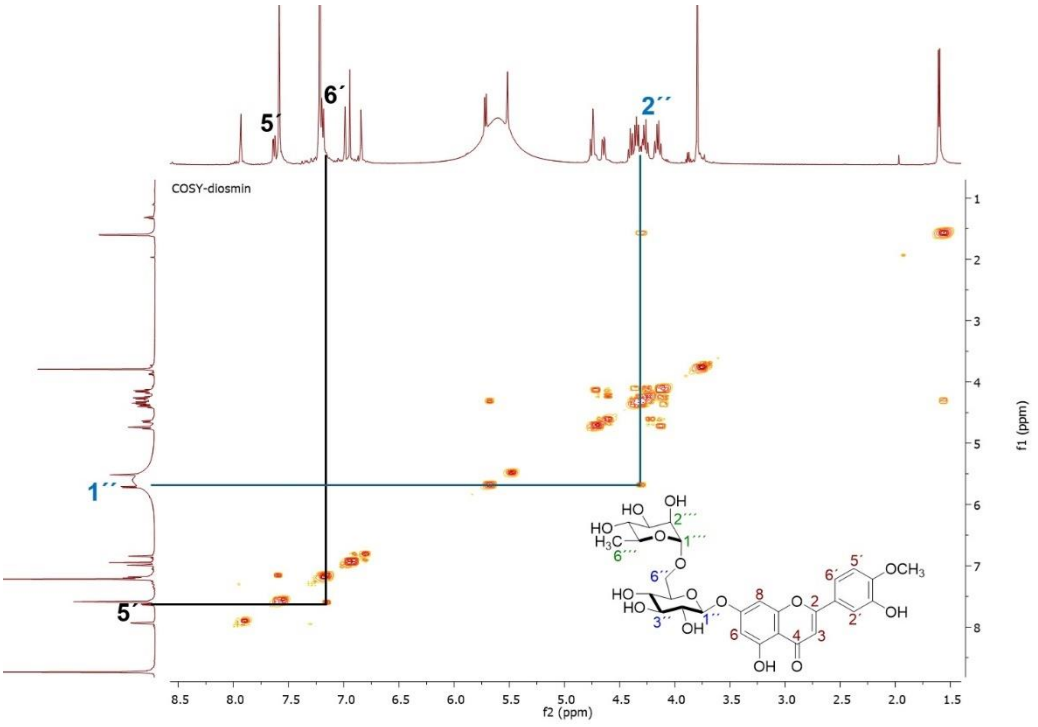


Figura 4. Espectro bidimensional COSY de la diosmina.

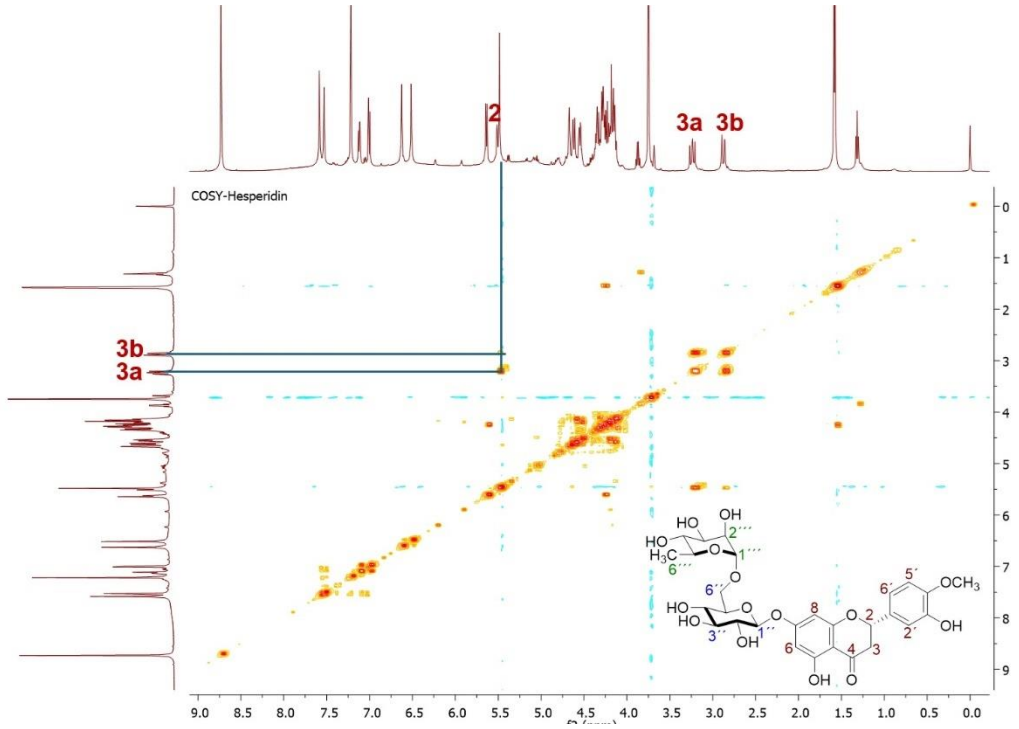


Figura 5. Espectro bidimensional COSY de la hesperidina.

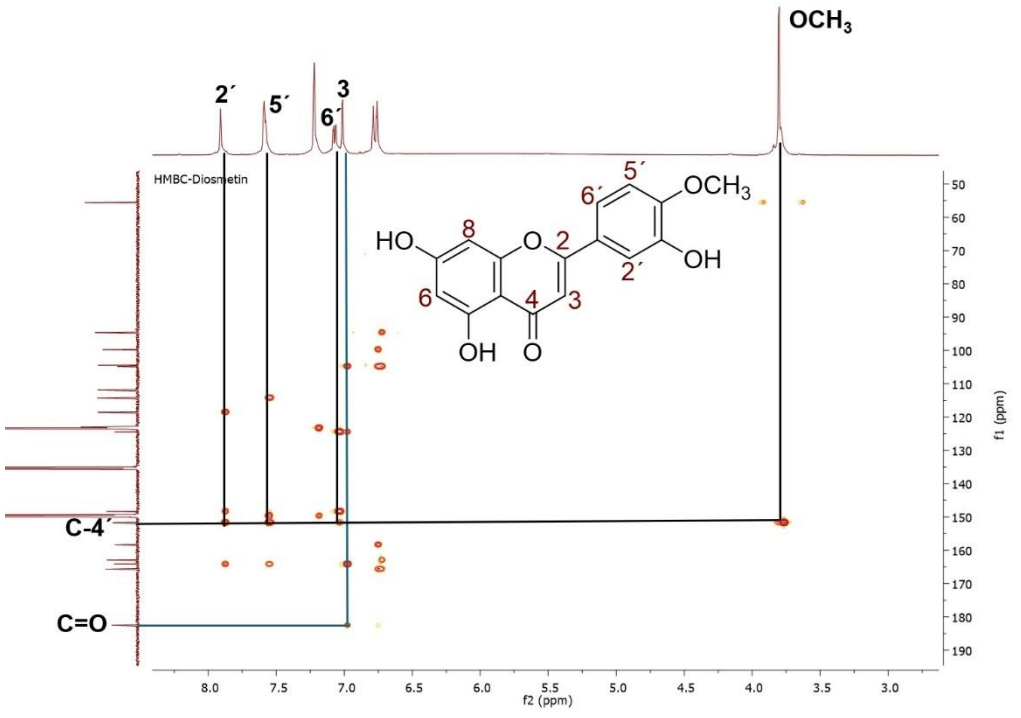


Figura 6. Espectro bidimensional HMBC de la diosmetina.

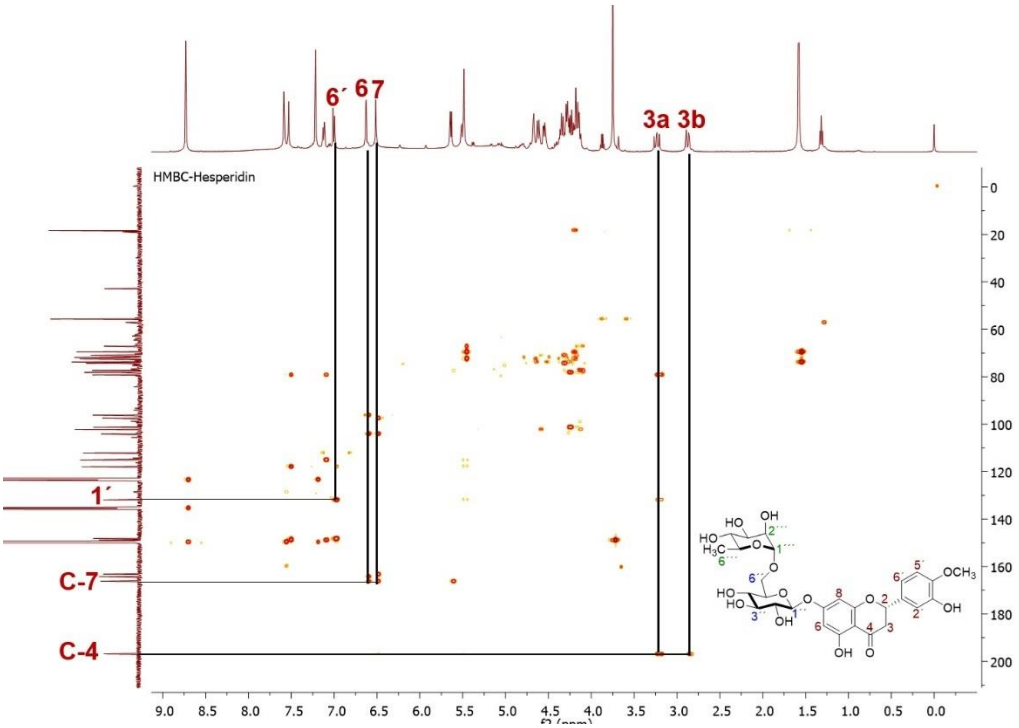


Figura 7. Espectro bidimensional HMBC de la hesperidina.

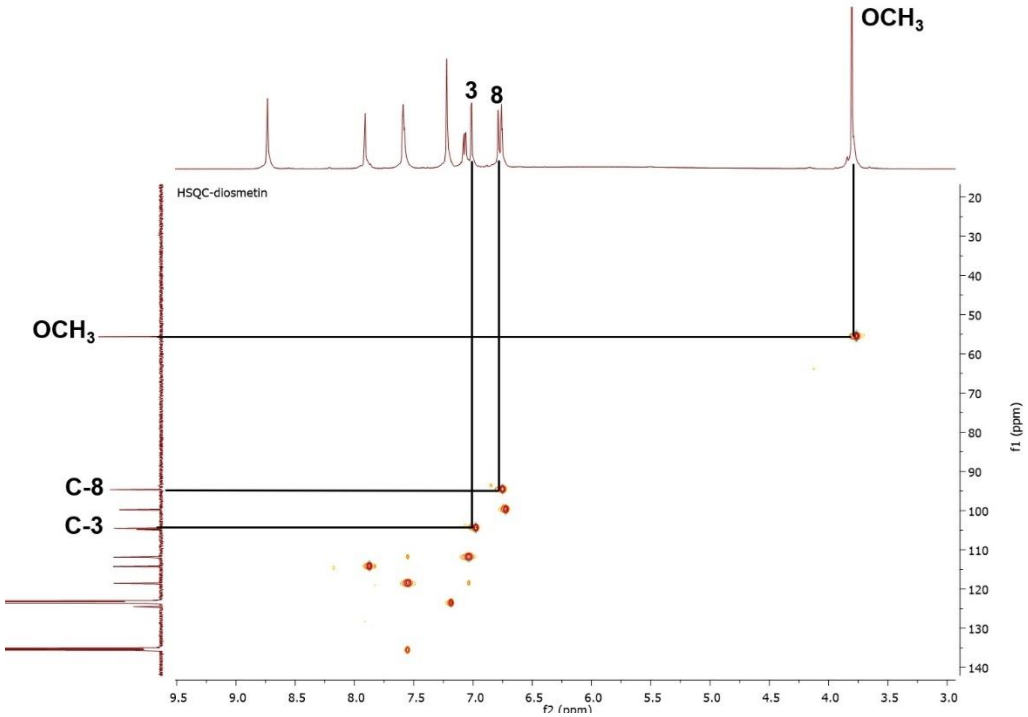


Figura 8. Espectro bidimensional HSQC de la diosmetina.

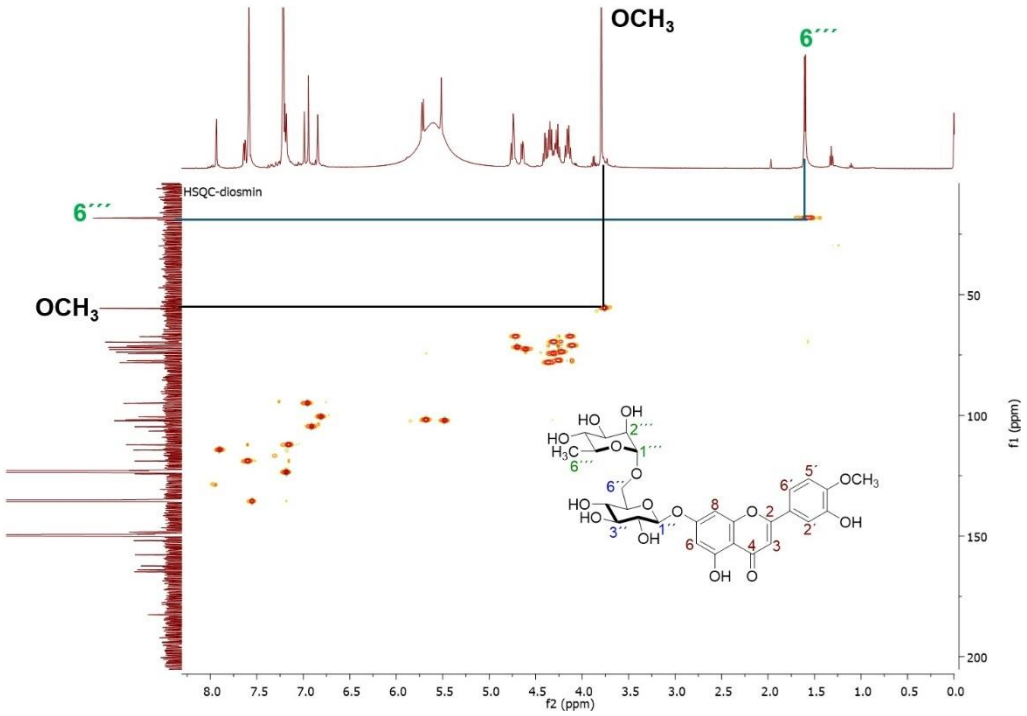


Figura 9. Espectro bidimensional HSQC de la diosmina.

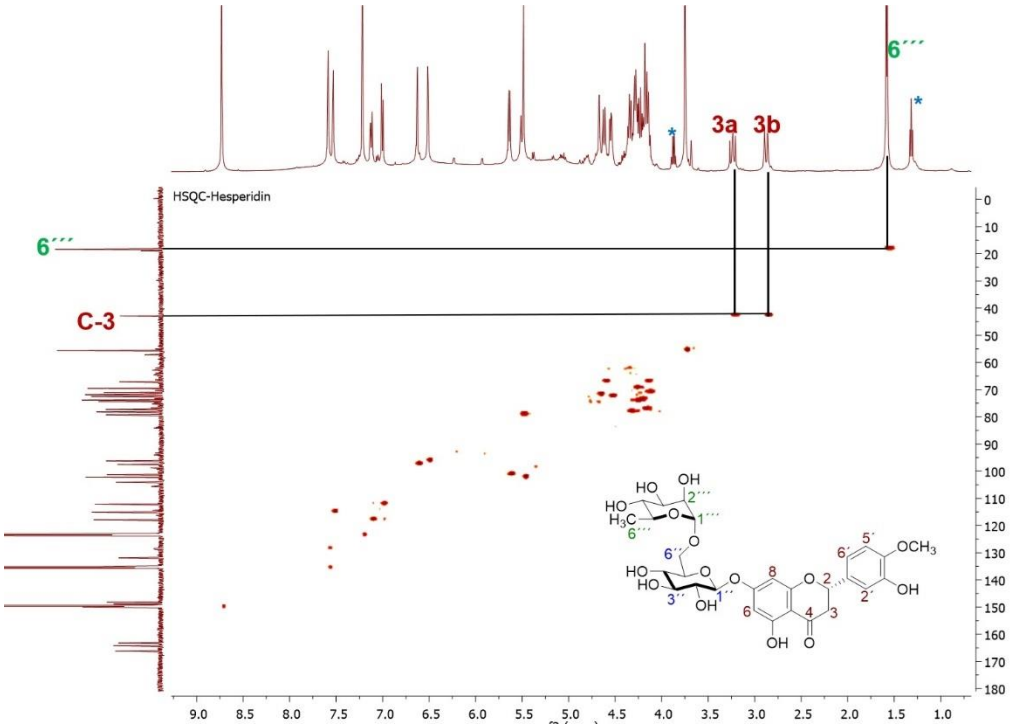


Figura 10. Espectro bidimensional HSQC de la hesperidina.

C.U., Querétaro, abril 17, 2024
No. de oficio. CBQ24/041

Dr. Eloy Rodríguez de León
Investigador responsable

Camila Martínez Chávez
Estudiante responsable

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Dra. Guadalupe García Alcocer
Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva
Colaboradores

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado **"Semisíntesis de flavonoides naturales a partir de la hesperidina extraída de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*)"**, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **exento de dictamen ético** debido a que el proyecto no incluye estudios con animales de experimentación ni sujetos humanos.

Cabe mencionar que el Dr. Mamadou Moustapha Bah, integrante del Comité, no participó en la evaluación del protocolo de investigación por presentar conflicto de interés. Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Iza Fernanda Pérez Ramírez

Presidente
Comité de Bioética de la Facultad de Química
Universidad Autónoma de Querétaro

Centro Universitario, Cerro de las Campanas s/n. Santiago de Querétaro, Qro. México C.P. 76010
Tel. 442 192 1267 correo: facquim@uaq.mx