



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“SÍNTESIS PARCIAL DE FLAVONOIDES A PARTIR DE LA
NARINGINA EXTRAÍDA DE LA CÁSCARA DE TORONJA
(*Citrus paradisi*)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MÓNICA FERNANDA MARTÍNEZ CORONADO

DIRIGIDA POR:

DR. ELOY RODRÍGUEZ DE LEÓN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2022.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“SÍNTESIS PARCIAL DE FLAVONOIDES A PARTIR
DE LA NARINGINA EXTRAÍDA DE LA CÁSCARA DE
TORONJA (*Citrus paradisi*)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MÓNICA FERNANDA MARTÍNEZ CORONADO

DIRIGIDA POR:

DR. ELOY RODRÍGUEZ DE LEÓN

SINODALES

Dr. Eloy Rodríguez de León
DIRECTOR

Dr. Mamadou Moustapha Bah
SINODAL

E. I. A. Areli Rodríguez Ontiveros
SINODAL

M. en C. Alejandro Núñez Vilchis
SINODAL

Firma

Firma

Firma

Firma

Agradecimientos

A la *Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro* por el financiamiento otorgado para la realización de una parte de este trabajo a través del Fondo “Química Somos Todos 2021” y por brindarme los recursos y herramientas necesarios para formarme en esta profesión.

Al director de esta tesis, *Dr. Eloy Rodríguez de León*, por la dedicación, apoyo y motivación que brindó para la realización de este trabajo, por su guía y confianza ofrecida desde el inicio y por haber formado parte de mi educación profesional.

A mis sinodales la *E.I.A. Areli Rodríguez Ontiveros*, quien me ha ofrecido infinidad de conocimientos y le dedicó un gran tiempo a mi educación. Gracias por guiarme estos años, por permitirme trabajar a su lado y por brindarme un espacio de confianza y cariño.

Al *M. en C. Alejandro Núñez Nélchis*, por recordarme el amor que le tengo a la Química, por compartir sus conocimientos y por su orientación y atención durante estos años. Gracias por impulsarme en los últimos años de mi carrera.

Y el *Dr. Mamadou Mustapha Bah*, por su apoyo y revisión de este trabajo, además de sus valiosas sugerencias.

También quiero agradecer a mis *amigos*, que siempre me han brindado apoyo para seguir esforzándome día a día, que me han acompañado en mis derrotas, mis logros y en mi cansancio y me ayudaron a levantarme y superar mis obstáculos.

Por último, quiero agradecer a mi *familia*, porque ellos me han acompañado durante todos mis años de educación y gracias a su esfuerzo y sacrificio pude terminar mi educación profesional. Gracias por su apoyo incondicional, por su comprensión, paciencia y por ser un pilar importante en mi vida.

RESUMEN

Los flavonoides son compuestos naturales presentes en una gran cantidad de plantas. La familia de los flavonoides puede dividirse en seis grandes grupos: los flavanoles, las antocianinas, los flavonoles, las isoflavonas, las flavonas y las flavanonas. La cáscara de los frutos del género *Citrus*, comúnmente conocidos como cítricos, es rica en ácidos fenólicos y flavonoides. Entre los frutos que componen al género *Citrus* se encuentra el limón, la lima, la bergamota, la naranja y la toronja. Esta última destaca por poseer una cantidad significativa de la 7-O-glucosilflavanona conocida como naringina (**1**). En la actualidad, al consumir un cítrico, la cáscara y la semilla no son utilizadas, lo que implica un desperdicio de aproximadamente un 60% del total del fruto. Asimismo, existe una creciente necesidad de reutilizar y optimizar los recursos naturales con la intención de reducir el impacto ambiental. En este sentido, en el presente proyecto, se aprovecharon los residuos de la cáscara de toronja (*Citrus paradisi*) para extraer la flavanona naringina mediante metodologías sencillas y amigables con el ambiente (microondas y ultrasonido). Para el proceso de extracción se utilizó un diseño experimental 2k completo y centrado y se evaluaron dos distintos disolventes (metanol y etanol). Los resultados obtenidos de las extracciones se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y para comprobar si existe una diferencia significativa entre los tratamientos se realizó la prueba de Tukey. La cantidad de naringina extraída se cuantificó mediante cromatografía de líquidos acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Estos resultados muestran que en las extracciones realizadas utilizando metanol como disolvente y ultrasonido como técnica de extracción, se obtuvieron cantidades de naringina comparables con la técnica de extracción por reflujo (método tradicional).

A partir del compuesto **1**, se obtuvieron mediante síntesis parcial los flavonoides naringenina (**2**), rhoifolina (**3**) y apigenina (**4**) (compuestos con mayor valor agregado). Las transformaciones (% de conversión) fueron monitoreadas mediante HPLC-DAD. Los análisis cromatográficos indican que la hidrólisis de los azúcares en la naringina, para la obtención de la naringenina, se logra con un 99% de conversión. Mientras que, la síntesis parcial de la rhoifolina a partir de la naringina y de la apigenina a partir de la naringenina se logran con un 70% y 99% de conversión respectivamente. En ese sentido, el rendimiento global obtenido para la obtención del compuesto **4** vía la rhoifolina es del 69.3 % y vía la naringenina de un 98 %, por lo tanto, esta última ruta es la más conveniente para la síntesis parcial de la apigenina. Finalmente, se confirmó la naturaleza química de los compuestos **1**, **2** y **4** mediante el estudio de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C .

ÍNDICE GENERAL

Contenido

	Página
RESUMEN	1
ÍNDICE GENERAL	2
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 El género <i>Citrus</i>	10
2.2 La toronja.....	11
2.2.1 Producción y variedades	12
2.3 Flavonoides	13
2.3.1 Flavonoides presentes en los cítricos (citroflavonoides)	15
2.4 Naringina	17
2.4.1 Efectos biológicos de la naringina.....	17
2.5 Naringenina	19
2.5.1 Biosíntesis de naringenina	19
2.5.2 Efectos farmacológicos de la naringenina.....	19
2.6 Apigenina.....	20
2.6.1 Métodos para la obtención de la apigenina.....	21
2.6.2 Efectos farmacológicos de la apigenina	21
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS	24
4.1 General	24
4.2 Particulares.....	24

5. METODOLOGÍA.....	25
5.1 Materiales y equipos	25
5.2 Diseño experimental 2^k completo y centrado y análisis estadístico	25
5.3 Extracción de la naringina mediante microondas y ultrasonido	26
5.4 Obtención de la prunina y naringenina mediante reacciones de hidrólisis catalizada por ácido a partir de la naringina	28
5.5 Obtención de la flavona rhoifolina a partir de la naringina	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6.1 Extracción de la naringina a partir de la cáscara de toronja	29
6.1.1. Extracción por el método convencional.....	31
6.1.2. Extracción mediante el uso de las microondas	32
6.1.3. Extracción utilizando ultrasonido.....	34
6.1.4. Comparación entre los distintos métodos de extracción	35
6.2 Caracterización de la naringina	36
6.3 Hidrólisis ácida de la naringina para la obtención de la naringenina	38
6.4 Caracterización de la naringenina	40
6.5 Síntesis parcial de la rhoifolina a partir de la naringina.....	42
6.6 Síntesis parcial de la apigenina a partir de la naringenina.....	44
6.7 Caracterización de la apigenina.....	46
6.8 Análisis de la mejor ruta de síntesis para la obtención de la apigenina.....	47
7. CONCLUSIONES.....	49
8. BIBLIOGRAFÍA	51
9. ANEXOS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Frutos comunes en el género <i>Citrus</i> .	10
2	Componentes de la toronja (<i>Citrus paradisi</i>).	11
3	Principales Estados productores de toronja en México.	12
4	Principales productores de toronja a nivel global.	13
5	Estructuras de los diferentes flavonoides.	15
6	Flavonoides glicosilados más comunes presentes en los cítricos.	16
7	Flavonoides más comunes en cítricos en su forma de aglicona.	16
8	Cromatograma de la de naringina utilizada como estándar.	29
9	Cromatograma de la mezcla de estándares.	30
10	Curva de calibración de naringina.	31
11	Diagrama de superficie de las pruebas realizadas en microondas con metanol como disolvente.	33
12	Diagrama de superficie de las pruebas realizadas en microondas y con etanol.	34
13	Comparación de las diferentes condiciones de extracción.	36
14	Espectro de ^1H de RMN de la naringina.	37
15	Espectro de ^{13}C de RMN de la naringina.	38
16	Cromatograma de la reacción de hidrólisis llevada a cabo en 2 horas y con una concentración de ácido 1.5 N (Tabla 14, experimento 3).	40
17	Espectro de ^1H de RMN de la naringenina.	41
18	Espectro de ^{13}C de RMN de la naringenina.	42
19	Cromatograma de la transformación de naringina a rhoifolina a las 3 horas de reacción.	43
20	Cromatograma de la transformación de naringina a rhoifolina a las 24 horas de reacción.	44
21	Cromatograma de la transformación de naringenina a apigenina a las 2 horas de reacción.	45

22	Cromatograma de la transformación de naringenina a apigenina a las 24 horas de reacción.	46
23	Espectro de ^1H de RMN de la apigenina.	47

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema		Página
1	Biosíntesis de naringenina.	19
2	Hidrólisis catalizada por ácido a partir de la naringina.	38
3	Reacción de oxidación catalizada por yodo para la obtención de la rhoifolina.	42
4	Reacción de oxidación catalizada por yodo para la obtención de la apigenina.	44
5	Rutas para la obtención de apigenina.	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Principales productores de toronja en México.	13
2	Proteínas y enzimas moduladas por la naringina.	18
3	Efectos farmacológicos de la naringenina.	20
4	Efectos farmacológicos de la apigenina.	22
5	Gradiente de elución para el análisis de los flavonoides.	25
6	Diseño experimental para la optimización de las condiciones de extracción.	26
7	Condiciones para la extracción de naringina por medio de microondas.	27
8	Concentraciones de naringina empleadas y áreas bajo la curva obtenidas para la curva de calibración.	30
9	Condiciones utilizadas en la extracción por reflujo.	32
10	Condiciones utilizadas en las pruebas en microondas con metanol.	32
11	Condiciones utilizadas en las pruebas en microondas con etanol.	33
12	Condiciones utilizadas en la extracción por ultrasonido.	35
13	Reacciones de hidrólisis catalizada por ácido a partir de la naringina.	39
14	Reacciones de oxidación catalizada por yodo y base a partir de la naringina.	43
15	Reacciones de deshidrohalogenación catalizada por yodo y base a partir de la naringenina.	45

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de utilizar materias primas renovables para la obtención de productos con alto valor agregado, en lugar de recursos no renovables como el petróleo, es una actividad que contribuye enormemente a lograr un desarrollo sostenible. Actualmente, entendemos como desarrollo sostenible (sostenibilidad) aquel desarrollo capaz de satisfacer las necesidades actuales de las personas sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras.

En la actualidad, la gran mayoría de los principios activos de los medicamentos comercializados a nivel mundial son obtenidos a través de síntesis química. Esto último implica que los materiales para la obtención de un determinado ingrediente activo sean derivados del petróleo y que en su desarrollo tengan una elevada huella de carbono. En ese sentido, el aprovechar los recursos naturales renovables y de preferencia endémicos de una región implica una gran disminución en el impacto ambiental de un determinado producto.

Nuestro país se destaca por ser uno de los principales países megadiversos debido a su amplia gama de recursos naturales y valores culturales. Asimismo, los recursos naturales representan una fuente importante de compuestos con efectos benéficos para la salud humana. Un recurso potencialmente aprovechable, abundante y ampliamente producido en el país es el residuo de los cítricos (principalmente la cáscara de toronja y de naranja) generado a partir de la industria alimentaria y de los pequeños comerciantes a nivel local (juguerías). Actualmente, al consumir un cítrico, la cáscara y la semilla no son utilizadas, lo que implica un desperdicio de aproximadamente un 60% del total del fruto, por lo cual el aprovechamiento de estos recursos representa una oportunidad para extraer compuestos de amplio valor agregado, como la naringina y sus derivados, los cuales son moléculas con utilidad en la industria farmacéutica y alimentaria. También, es de destacarse que México ocupa el tercer lugar a nivel mundial como productor de toronja. La producción anual promedio de este cítrico es de aproximadamente 400,000 toneladas métricas, siendo el Estado de Veracruz el principal productor a nivel nacional.

En el presente proyecto, se reutilizaron y transformaron los desechos de la cáscara de la toronja (*Citrus paradisi*) generados por la industria alimentaria para extraer, utilizando el ultrasonido y las microondas (fuentes de energía alternativas y ecológicas), el flavonoide naringina y a partir de éste, transformarlo en compuestos con un alto valor agregado (síntesis parcial). Asimismo, el presente proyecto también se enfocó en el desarrollo de una vía menos contaminante y que persigue los principios de la química verde para producir los citroflavonoides naringenina, rhoifolina y apigenina.

2. ANTECEDENTES

2.1 El género *Citrus*

El género *Citrus*, comúnmente conocido como cítricos, designa a las especies de arbustos y/o arboles de entre 5 y 15 m de altura, cuyos frutos poseen un elevado contenido de ácido cítrico. Este género contiene tres especies y numerosos híbridos cultivados; entre estos se encuentran el limón, la lima, la bergamota, la naranja y la toronja (Figura 1) (Talon y col., 2020).



Figura 1. Frutos comunes en el género *Citrus*.

Los frutos del género *Citrus* poseen importancia debido a que contienen una gran cantidad de compuestos antioxidantes tales como la vitamina C y algunos fitoquímicos como los flavonoides. Estos últimos destacan por tener efectos benéficos en la salud humana al prevenir distintos tipos de cáncer y el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas (Talon y col., 2020).

2.2 La toronja

La toronja (*Citrus paradisi*) (Figura 2) es un cítrico con un sabor característico. Contiene una gran variedad de vitaminas y minerales esenciales. El árbol de toronja es conocido como cidro; pertenece a la familia de las rutáceas y llega a medir de 5 – 6 m de alto; tiene flores blancas de 4 pétalos. Por su parte, el fruto de la toronja posee la forma de globo con un diámetro de entre 10 y 15 cm. Todos los frutos del género *Citrus* se componen de dos partes principales, la corteza y los segmentos. La corteza está formada por el epicarpio o flavedo, que forma parte de la superficie coloreada y por el mesocarpio o albedo, parte interna blanquecina de tejido lazo de la corteza de los frutos cítricos (Figura 2). El endocarpo, también conocido como pulpa, es la parte comestible de los cítricos y se compone de segmentos (de la Rosa-Hernández y col., 2016). Los carotenoides, vitaminas, aceites esenciales, celulosas, carbohidratos solubles, flavonoides y aminoácidos son las sustancias más importantes presentes en el flavedo y albedo (Llanes y col., 2007).

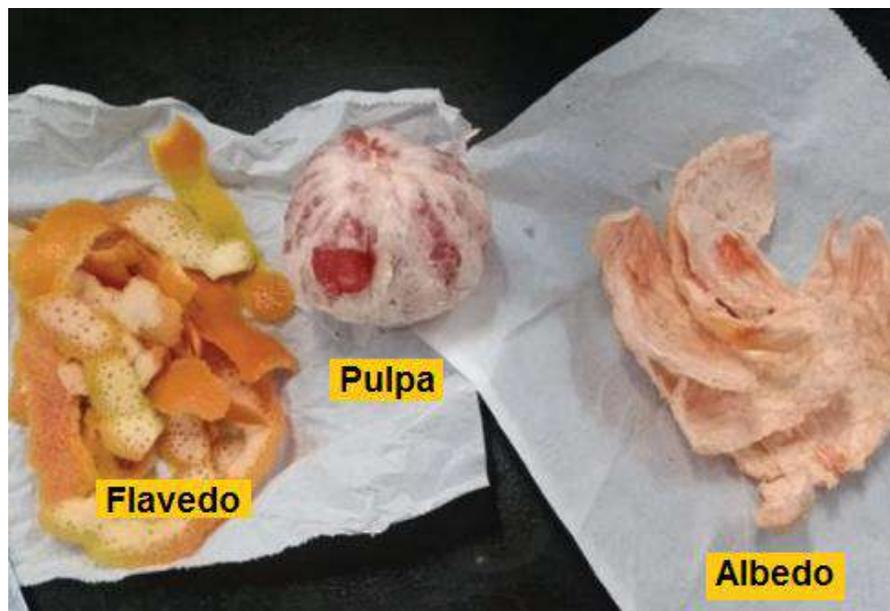


Figura 2. Componentes de la toronja (*Citrus paradisi*) (Imagen tomada de: Victor y col., 2021).

2.2.1 Producción y variedades

En nuestro país, los estados de Veracruz y Michoacán son los mayores productores de toronja (Figura 3), donde la superficie plantada y la producción han ido aumentando en los últimos años (USDA, 2020).



Figura 3. Principales Estados productores de toronja en México.

Hay tres tipos de toronja plantados en México: pulpa roja, rosa y blanca (Tabla 1). La pulpa roja es principalmente exportada como fruta fresca y en rodajas peladas a Estados Unidos y Europa. La pulpa rosa se consume fresca y su demanda se ha ido reduciendo, ya que se prefiere las variedades de la pulpa roja. Mientras que la pulpa blanca se utiliza para la producción de jugo y en rodajas peladas (USDA, 2020).

Los principales productores de toronja a nivel mundial son China y Estados Unidos, quedando México como el tercer productor mundial (Figura 4). Sudáfrica cuenta con una producción similar a la de México, mientras que Turquía, Israel y la Unión Europea tienen las producciones más bajas de este cítrico.

Tabla 1. Principales productores de toronja en México.

Estado	Producción (toneladas)	% del total	Variedad de pulpa
Veracruz	273,562	60	Rosa Roja Blanca
Michoacán	73,255	16	Rosa Roja
Tamaulipas	34,445	8	Rosa Roja Blanca
Nuevo León	24,834	5	Rosa Roja
Yucatán	9,551	2	Rosa
Otros	40,674	9	Rosa
Total	456,321	100	



Figura 4. Principales productores de toronja a nivel global.

2.3 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las frutas, vegetales y semillas. Tienen diversos efectos bioquímicos y antioxidantes favorables asociados a efectos benéficos para la salud y poseen diferentes aplicaciones farmacéuticas y cosméticas (Panche y col., 2016). Estos compuestos se caracterizan por poseer un esqueleto común de difenilpiranos, con la estructura general $C_6-C_3-C_6$. Los anillos de fenilo se

denominan A y B y están unidos a través de un anillo de pirano (anillo C). Los anillos A y C se numeran del 2 al 10 y el anillo B desde el 1' al 6' (Figura 5).

La familia de los flavonoides puede clasificarse en seis grupos: flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianidinas, isoflavonas y flavanoles (Figura 5) (Grotewold, 2006). Las flavanonas, como la naringina, se caracteriza por poseer un grupo carbonilo en el carbono de la posición 4 (C4) y un centro quiral en el carbono 2 (C2). El centro quiral presente en las flavanonas de origen natural posee exclusivamente una configuración S. Los flavanoles, como las catequinas, poseen dos centros quirales, en C2 y en el carbono 3 (C3), por lo cual existen cuatro estereoisómeros. La (+)-catequina y la (-)-epicatequina son los estereoisómeros más comunes en la naturaleza. Este tipo de compuestos tienden a formar polímeros conocidos como taninos condensados. Los flavonoles, por su parte, se caracterizan por poseer un grupo carbonilo en C4, un doble enlace entre el C2 y C3 y un grupo hidroxilo (OH) unido al C3. Un ejemplo de este tipo de moléculas es la quercetina. Las flavonas, como la apigenina, poseen un doble enlace entre el C2 y C3, además de un grupo carbonilo en C4. Sin embargo, estos compuestos, a diferencia de los flavonoles, carecen del OH en el C3. Asimismo, las isoflavonas, como la genisteína o la daidzeína, poseen un doble enlace entre C2 y C3 y el grupo carbonilo en C4, al igual que las flavonas. La gran diferencia entre las flavonas e isoflavonas radica en el hecho de que el anillo B se encuentra unido al C3 en lugar de estar unido al C2. Finalmente, las antocianinas se caracterizan por poseer un grupo OH en la posición 3 y su anillo C es heteroaromático (ion pirilio), por lo tanto, carecen del grupo carbonilo en C4 (Figura 5).

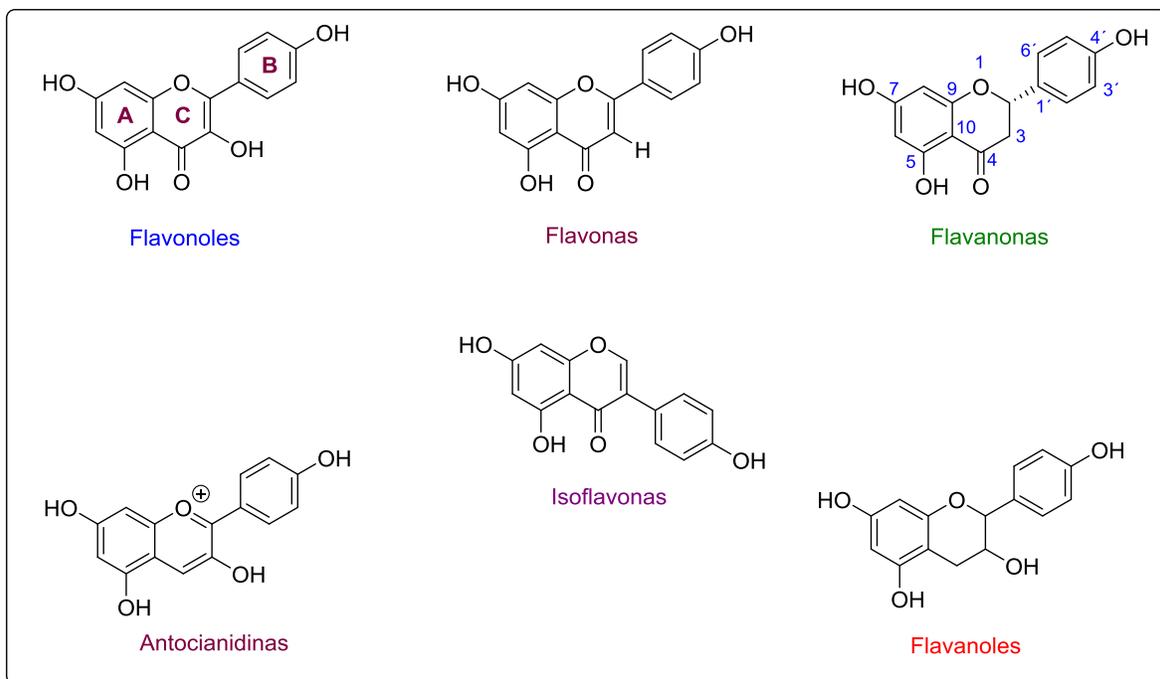


Figura 5. Estructuras de los diferentes flavonoides.

2.3.1 Flavonoides presentes en los cítricos (citroflavonoides)

La cáscara y las semillas de los cítricos son muy ricas en compuestos fenólicos y flavonoides. Sin embargo, la cáscara es más rica en flavonoides que las semillas. Los flavonoides presentes en los cítricos son principalmente flavanonas y se encuentran unidos a azúcares en la posición 7 del esqueleto de éstos (7-O-glicosilflavanonas). La naringina (1), neohesperidina (5), neoeriocitrina (6) son los flavonoides más abundantes en todos los frutos cítricos (Figura 6). La composición de flavonoides varía entre los distintos frutos. Por ejemplo, en la semilla de limón, se encuentra principalmente la hesperidina (7) y la eriocitrina (8), mientras que su cáscara es rica en neoeriocitrina, y neohesperidina (Figura 6) (Tripoli y col., 2007).

Asimismo, la naringina ha sido encontrada en la cáscara y la semilla del limón y de mandarina, pero no se ha detectado en el jugo de estos cítricos.

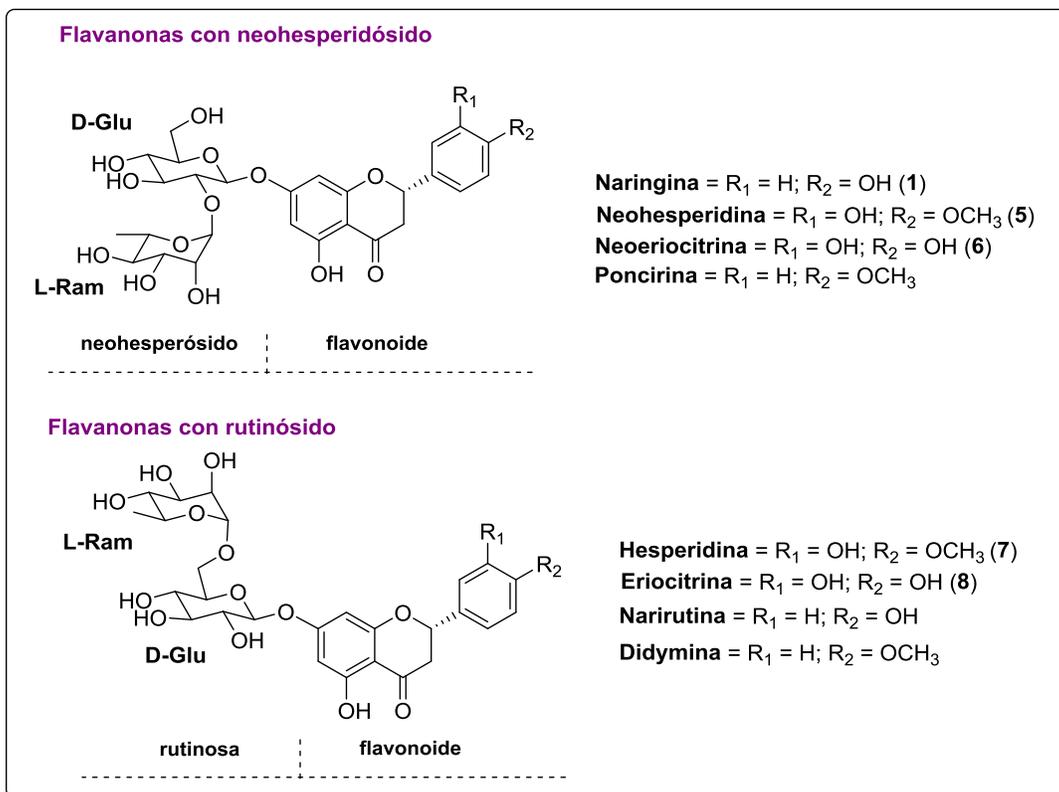


Figura 6. Flavonoides glicosilados más comunes presentes en los cítricos.

Respecto a los flavonoides libres de azúcar (agliconas), se han encontrado principalmente a las flavanonas: naringenina (2), la hesperetina (9), la isosakuranetina (10) y el heridictiol (11) (Figura 7). Asimismo, se han reportado a las flavonas y flavanoles tales como la apigenina (4), luteolina (12), diosmetina (13), quercetina (14) y el kaempferol (15) (Figura 7) (Tripoli y col., 2007).

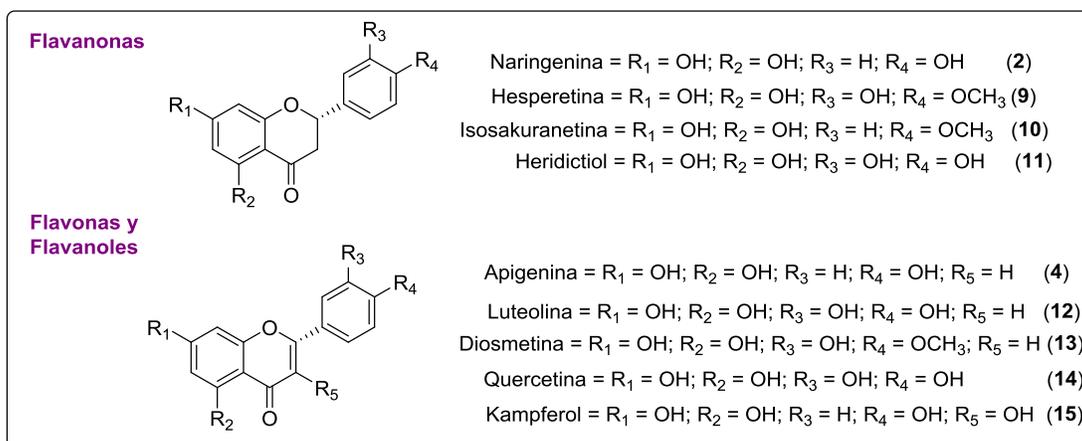


Figura 7. Flavonoides más comunes en cítricos en su forma de aglicona.

2.4 Naringina

La naringina (Figura 6) es un flavonoide que se forma a partir de la flavanona naringenina y el disacárido neohesperidósido (Chen y col., 2016). Las cáscaras de pomelo (*Citrus grandis*) y toronja (*Citrus paradisi*) son conocidas por tener una alta cantidad de naringina (Sudto y col., 2009). Su contenido en la fruta depende de diferentes factores como el estado de maduración de la fruta, la parte utilizada y el tiempo de secado.

La naringina ejerce acciones terapéuticas potenciales al modular diversas expresiones de proteínas y enzimas, por lo que posee propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antivirales, antialérgicas y antiinflamatorias (Wang y col., 2013).

2.4.1 Efectos biológicos de la naringina

Debido a que la naringina mejora la actividad de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, promueve la diferenciación osteogénica y la proliferación celular (Zhang y col., 2009) y puede ejercer efectos similares al estrógeno, al promover funciones osteoblásticas y suprimir la osteoclastogénesis (Pang y col., 2010).

Se ha demostrado que tiene un efecto significativo en la reparación ósea (Tabla 2), ya que aumenta la densidad mineral ósea (DMO) y la resistencia ósea, además de inhibir la excreción urinaria del calcio (Wong y col., 2013) en modelos de animales.

La naringina puede restringir la producción de células T normales mediante la translocación nuclear de NF- κ B en una línea celular de queratinocitos epidérmicos y es eficaz para reducir la expresión de factores de señalización asociados con la respuesta inflamatoria. Además, se ha demostrado que al formar un complejo con Cu (II) tiene una mayor actividad antiinflamatoria que la naringina libre sin reducir la viabilidad celular (Pereira y col., 2007).

También, actúa como un agente supresor de la formación de nuevos cánceres y como agente bloqueante al impedir que los compuestos cancerígenos lleguen a sitios críticos de iniciación (Benavente-García y Castillo, 2008). Inhibe la proliferación celular y promueve la apoptosis celular en la mayoría de las células

tumorales, además de reducir su migración e invasión. La naringina puede reducir el síndrome metabólico (Pu y col., 2012) y la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa.

Tabla 2. Proteínas y enzimas moduladas por la naringina.

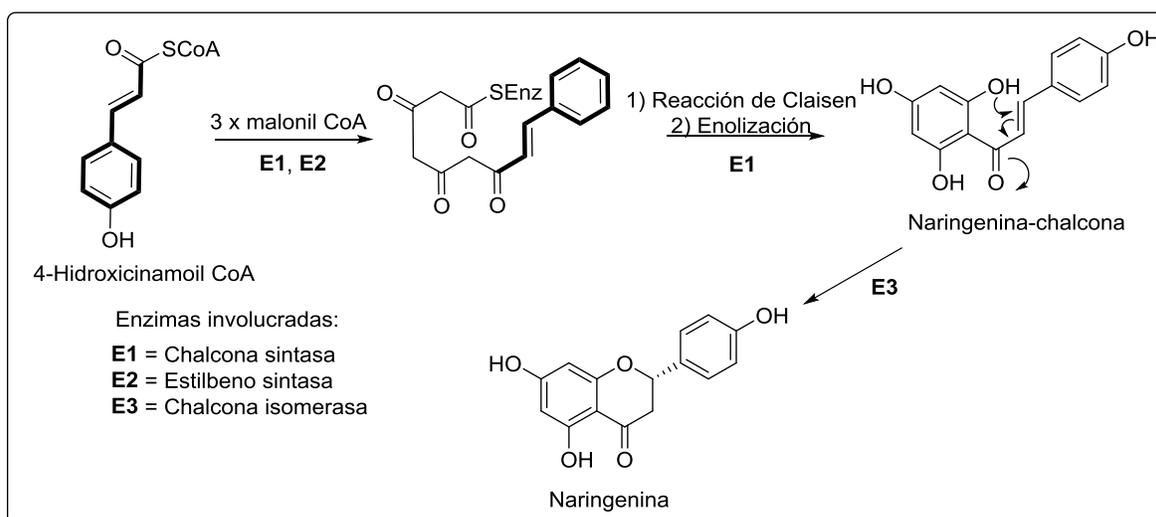
Actividad Farmacológica	Aumenta	Disminuye
Regeneración ósea	Fosfatasa alcalina Osteoprotegerina Osteocalcina Osteopontina	3-Hidróxi-3-metil CoA reductasa (HMG-CoA). Receptor activador del ligando NF-κB (RANKL). Fosfatasa ácida resistente al tartrato. Quinasa regulada por señales extracelulares.
Antiinflamatoria	Superóxido dismutasa Lipoxin A4	Interleucina 6 (IL-6). Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α). Interferon-γ (IFN- γ). Óxido nítrico sintetasa (iNOS). Interleucina 8 (IL-8) Leucotrieno B4 Mieloperoxidasa.
Anticancerígeno	P21 miR-126 Caspasas p53	Vía β-catenina. Molécula de adhesión celular vascular-1.
Síndrome metabólico	AMPK	Ácido graso sintasa. Glucosa-6-fosfatasa. HMG-CoA reductasa. Colesterol plasmático. Triglicéridos.
Estrés oxidativo	HO-1 Malondialdehído cerebral.	GSH SOD
Enfermedades del SNC	Malondialdehído. Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial. Autofosforilación de la proteína quinasa II dependiente de Calmodulina.	GSH SOD Acetilcolinesterasa. TNF-α Proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos.

2.5 Naringenina

Es uno de los flavonoides naturales más importantes que se encuentra mayormente en frutas del género *Citrus* y en tomates. La naringenina (Figura 7) es insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos, esta molécula es del tipo flavanona y se deriva de la hidrólisis de la naringina y ocupa una posición central como intermediario en la biosíntesis de flavonoides (Salehi y col., 2019).

2.5.1 Biosíntesis de naringenina

La naringenina, al igual que todos los flavonoides, se obtienen mediante la condensación del 4-Hidroxicinamoil CoA con tres unidades de malonil-CoA. La consecuente reacción de Claisen y enolización catalizada por la enzima chalcona sintasa produce la naringenina-chalcona. Finalmente, el ataque nucleofílico del fenol sobre el carbono β de la cetona α,β -insaturada de la chalcona produce el anillo heterocíclico característico de los flavonoides (Esquema 1) (Dewick, 2009).



Esquema 1. Biosíntesis de naringenina.

2.5.2 Efectos farmacológicos de la naringenina

Mediante diversos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha encontrado que la naringenina funciona como un agente hepatoprotector, antiaterogénico, antiinflamatorio, antimutagénico, anticanceroso y antimicrobiano, por lo que puede funcionar para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares,

gastrointestinales, neurológicas, metabólicas, entre otras (Karim y col., 2018). Algunos de sus efectos farmacológicos se mencionan en la tabla 3.

Tabla 3. Efectos farmacológicos de la naringenina.

Actividad Farmacológica	Efecto
Anti-Alzheimer	Mitigación de la peroxidación lipídica y apoptosis, atenuación del deterioro del aprendizaje y la memoria.
Anticancerígeno	Antiproliferativa, proapoptótica, inhibe el crecimiento celular, aumenta la fosforilación de AMP-activado por proteínquinasa.
Antidiabético	Potencia las respuestas de señalización intracelular a dosis bajas de insulina al sensibilizar los hepatocitos a la insulina, además disminuye la peroxidación lipídica.
Antiinflamatorio	Regulación descendente de ARNm de TNF- α y NF- κ B, disminuye la expresión de la caspasa-3, Bad, Bax, IL-6 y IL-1 β .
Antimicrobiano	Actividad antibacterial, aumenta la permeabilidad de la membrana bacteriana y cambio de la morfología celular.
Cardioprotector	Atenuación del remodelado cardíaco y disfunción cardíaca, urea en sangre, péptido natriurético tipo B, aldosterona, Angiotensina II, proteína C reactiva.
Pérdida de peso	Regulación descendente de genes implicados en la lipogénesis <i>de novo</i> , la lipólisis y la síntesis/almacenamiento de triglicéridos.

2.6 Apigenina

Es un producto natural perteneciente a la clase de las flavonas. La apigenina (Figura 7) es un sólido amarillo que se ha utilizado para teñir lana y es sintetizada como metabolito secundario en una gran variedad de plantas, vegetales y frutas, como el perejil, manzanilla, naranja, cebolla, apio, maíz, arroz, entre otras (Ali y col., 2017).

2.6.1 Métodos para la obtención de la apigenina

Se han desarrollado varios métodos para la síntesis de apigenina; sin embargo, el rendimiento total no ha sido satisfactorio. Yeole y colaboradores reportaron una ruta de tres pasos con un rendimiento total de 27.6%. Seija y colaboradores utilizaron una ruta de síntesis a través de la irradiación con microondas partiendo del β -cetoéster y obtuvieron un rendimiento total de 81%. También, se desarrolló un método verde a partir del floroglucinol, en cinco pasos de reacción, obteniéndose un rendimiento del 40% (Wang y col., 2012). Otra ruta más se ha descrito partiendo de la taxicatigenina, en cinco pasos y utilizando reactivos comercialmente disponibles, resultando en un rendimiento del 53% (Wang y col., 2015).

2.6.2 Efectos farmacológicos de la apigenina

La apigenina se ha convertido en un flavonoide importante, ya que es un agente beneficioso para la salud y tiene una baja toxicidad intrínseca, en comparación con otros flavonoides, lo que podría conducir a una posible inclusión en formulaciones nutracéuticas (Salehi y col., 2019). Tanto a la apigenina, como a sus derivados, se les han atribuido propiedades benéficas (Tabla 4) como antioxidantes, antiinflamatorias, neuroprotectoras, antimicrobianas, anticancerígeno, entre otros (Catarino y col., 2019).

Tabla 4. Efectos farmacológicos de la apigenina.

Enfermedad	Efecto
Artritis reumatoide	Induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y causa apoptosis a través de la vía ERK1/2 activada por estrés oxidativo en sinoviocitos similares a fibroblastos. Además, tiene efectos inmunomoduladores desencadenados por TNF- α (Shin y col., 2009)
Trastornos autoinmunes	Reduce la respuesta de las células Th1 y Th17 al autoantígeno principal del lupus y suprime la capacidad de las células B para producir autoanticuerpos, reduce a expresión de COX-2 y la proteína inhibidora celular tipo FLICE en las células inmunitarias, inhibe la activación de NF- κ B (Kang y col., 2009)
Trastornos neuropsicológicos	Mejora la absorción de monoaminas, con mayor especificidad para la captación de dopamina, por lo que funciona como un activador del transportador de monoaminas (Zhao y col., 2010).
Inflamación	Suprime la expresión de iNOS y COX-2, inhibe la producción de NO. (Kim y col., 2004)
Antioxidante	Aumenta los niveles de las enzimas superóxido dismutasa y Glutación reductasa (Ali y col., 2017)
Antitóxico	Mejora la apoptosis inducida por cisplatino en células tubulares proximales renales humanas mediante la reducción de la activación de p53 y la promoción de la vía fosfatidilinositol-3-kinasa (Ju y col., 2015)
Cáncer	Tiene un rol protector ante diversos tipos de cáncer (Ali y col., 2017)

3. HIPÓTESIS

La naringina extraída a partir de los residuos de la cáscara de toronja (*Citrus paradisi*) es una materia prima conveniente para lograr la síntesis parcial de la prunina, rhoifolina y apigenina.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Realizar la síntesis parcial de los flavonoides naringenina, prunina, rhoifolina y apigenina a partir de la naringina extraída de la cáscara de toronja (*Citrus paradisi*).

4.2 Particulares

- Obtener el flavonoide naringina mediante la extracción a partir de su fuente natural, la cáscara de toronja (*Citrus paradisi*).
- Obtener la prunina y naringenina mediante reacciones de hidrólisis ácida a partir de la naringina.
- Obtener la flavona rhoifilina a partir de la naringina, a través de una reacción de oxidación catalizada por yodo.
- Obtener la apigenina a partir de la naringenina, mediante una reacción de oxidación catalizada por yodo.
- Caracterizar mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C los flavonoides sintetizados.

5. METODOLOGÍA

5.1 Materiales y equipos

La caracterización de los flavonoides se realizó a través del estudio de sus espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC), los cuales fueron adquiridos en un espectrómetro de la marca Brüker (Avance III HD) de 500 MHz del Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Físicoquímicas y Estructura Molecular de la Universidad de Guanajuato. Se utilizaron metanol y piridina deuterados como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

El análisis (% de conversión) e identificación de los flavonoides obtenidos se realizó mediante cromatografía utilizando un cromatógrafo de líquidos marca Waters® provisto de una bomba cuaternaria modelo e2695 y un detector de arreglo de diodos (DAD) modelo 2998. Los análisis se realizaron mediante un método que utilizó como fase estacionaria una columna de fase reversa C_{18} (5 μm , 150 x 4.6 mm) y como fase móvil un gradiente de acetonitrilo con agua acidulada con ácido acético 0.0125 N, a un flujo de 1 mL/min (Tabla 5). Los análisis en cromatografía en capa fina se realizaron utilizando cromatofolios cubiertos de gel de sílice de 0.25 mm de espesor y con indicador de fluorescencia (PF 254) (Merck).

Tabla 5. Gradiente de elución para el análisis de los flavonoides.

Tiempo (minutos)	Ácido acético [0.0125 N]	Acetonitrilo
0	95%	5%
2	95%	5%
5	85%	15%
20	50%	50%
25	95%	5%

5.2 Diseño experimental 2^k completo y centrado y análisis estadístico

Para optimizar las condiciones de extracción en la técnica asistida por microondas se siguió un diseño factorial 2^k completo y centrado. En la extracción

asistida por ultrasonido, solo se evaluó la temperatura de 35 °C y 5 minutos de tiempo. Por otra parte, para la extracción asistida por microondas, se evaluaron 50 °C y 80 °C como niveles alto y bajo de temperatura respectivamente, así como 15 y 25 minutos como niveles alto y bajo de tiempo. El diseño experimental se muestra en la Tabla 6. También se añadió un experimento centrado considerando los valores intermedios de cada variable.

Tabla 6. Diseño experimental para la optimización de las condiciones de extracción.*

Experimento	Nivel de temperatura	Nivel de tiempo
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0

*Niveles bajos representados con “-1”, niveles altos representados con “+1” y el nivel intermedio representado con ‘0’.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se cuantificó el contenido de naringina (variable respuesta) extraída en mg a partir de cada gramo (g) de cáscara (mg/g). Asimismo, se construyeron gráficas de superficie para determinar los valores óptimos de ambas variables. El diseño experimental se aplicó para dos distintos medios de extracción (metanol y etanol). Finalmente, los resultados fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA) y para comprobar si existe una diferencia significativa entre los grupos (medios de extracción y técnicas), se realizó la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 95% correspondiente al promedio de 3 réplicas (n =3). Para este análisis, se utilizó el software Minitab 19 y los resultados fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar.

5.3 Extracción de la naringina mediante microondas y ultrasonido

Con ayuda de un cuchillo, se separó el albedo del flavedo (Figura 2) y posteriormente, se cortó en cuadros de aproximadamente 5 mm de longitud. En la

extracción por microondas, se utilizó un equipo de la marca Anton Paar, modelo Multiwave PRO. Para cada prueba, en un recipiente de reacción, se pesaron 6.5 g de albedo y se adicionaron 42.9 mL de disolvente. La mezcla fue calentada a 50 °C y mantenida a dicha temperatura durante 15 minutos (primera extracción). Transcurrido este tiempo, se decantó el disolvente y se adicionaron 13 mL de disolvente en el recipiente de reacción para realizar una segunda extracción en las mismas condiciones y con el mismo material. La mezcla se filtró y el disolvente se recolectó, obteniéndose un volumen final de disolvente de aproximadamente 56 mL. Las condiciones utilizadas para las extracciones realizadas en el microondas se muestran en la tabla 7. Cada condición se realizó por triplicado con cada uno de los disolventes (metanol y etanol).

Tabla 7. Condiciones para la extracción de naringina por medio de microondas.

#	T (°C)	t (min)
1	50	15
2	50	25
3	80	15
4	80	25
5	65	20

Para extraer la naringina por medio de ultrasonido, se utilizó un equipo de la marca Branson modelo 5510 y se realizó el mismo procedimiento con el albedo. Para cada prueba, se pesaron 6.5 g de albedo en un matraz bola de 50 mL y se adicionaron 42.9 mL de disolvente. La mezcla se calentó a 35 °C y se mantuvo a esa temperatura por 5 minutos para la primera extracción. Se separó el disolvente en un matraz Erlenmeyer y se adicionaron 13 mL de disolvente para una segunda extracción bajo las mismas condiciones. Se filtró el disolvente y se recolectó en el mismo matraz Erlenmeyer, obteniendo un volumen final de aproximadamente 56 mL.

5.4 Obtención de la prunina y naringenina mediante reacciones de hidrólisis catalizada por ácido a partir de la naringina

En un matraz bola de 50 mL, se colocaron 0.25 mmol de naringina. Se adicionaron 10 mL de 0.075 mmol de ácido sulfúrico y se colocó un agitador magnético. La mezcla se calentó a 100 °C y se agitó durante 3 horas. Posteriormente, se detuvo la agitación y se dejó enfriar a temperatura ambiente; se le agregaron 20 mL de 15 mmol de bicarbonato de sodio y se realizaron tres separaciones cada una con 5 mL de acetato de etilo. Para optimizar los tiempos de reacción, se realizó la hidrólisis en el microondas descrito previamente utilizando una rampa de calentamiento de 10 minutos a 120 °C y manteniendo la temperatura por 30 minutos. Al finalizar este tiempo, la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 20 mL de una disolución de bicarbonato de sodio para neutralizar; por último, se realizaron tres separaciones cada una con 5 mL de acetato de etilo.

5.5 Obtención de la flavona rhoifolina a partir de la naringina

En un matraz bola de 50 mL provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.25 mmol de naringina y se adicionaron 0.25 mmol de yodo y 5 mL de piridina. La disolución se calentó por 24 horas a 95 °C con agitación constante. Transcurrido este lapso de tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 50 mg de metabisulfito de sodio en 5 mL de agua y 5 mL de ácido clorhídrico al 1%. Por último, se realizaron tres extracciones cada una de 10 mL de acetato de etilo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción de la naringina a partir de la cáscara de toronja

Se desarrolló un método cromatográfico mediante HPLC-DAD que nos permitió identificar a los flavonoides naringina y naringenina (Figuras 8 y 9). Dicho método permitió monitorear el avance de las reacciones de hidrólisis (Figura 16), así como el avance de las transformaciones de las reacciones de oxidación (Figuras 19-22). Para la identificación y monitoreo del avance de las reacciones, se utilizaron estándares comerciales. En la figura 8, se encuentra el cromatograma de la naringina utilizada como estándar, donde, con las condiciones descritas en la tabla 5, se obtuvo la presencia de un pico con un tiempo de retención de 14 minutos.

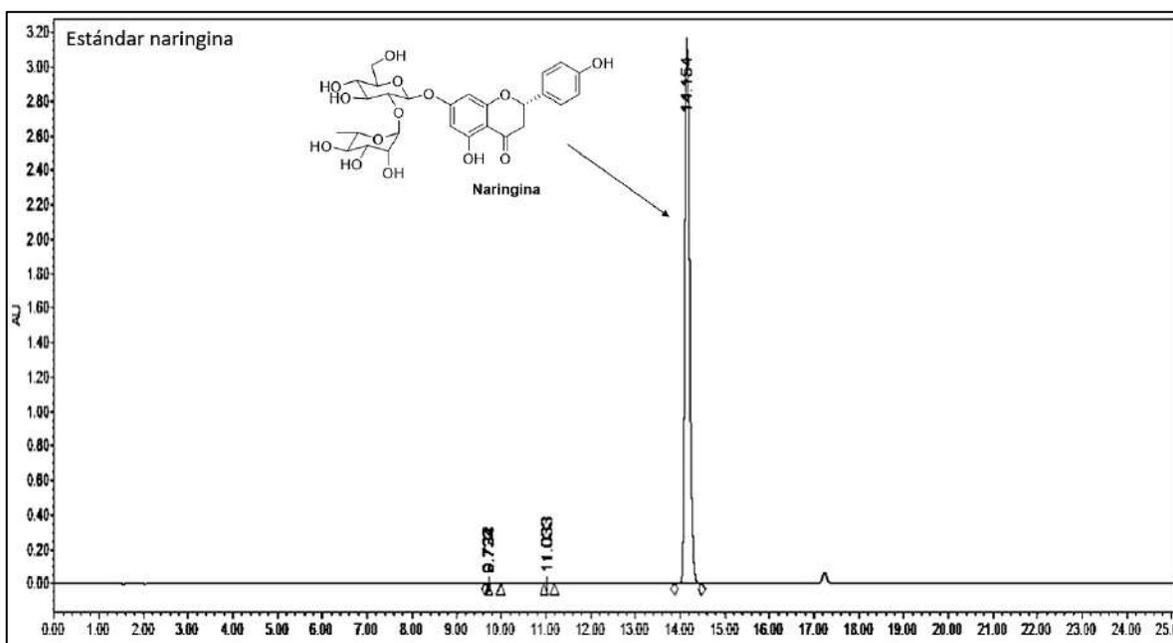


Figura 8. Cromatograma de la de naringina utilizada como estándar.

En la figura 9, se muestra la mezcla de los estándares naringina y naringenina. Se observa que el flavonoide libre (aglicona) posee mayor tiempo de retención que el compuesto glicosilado (naringina).

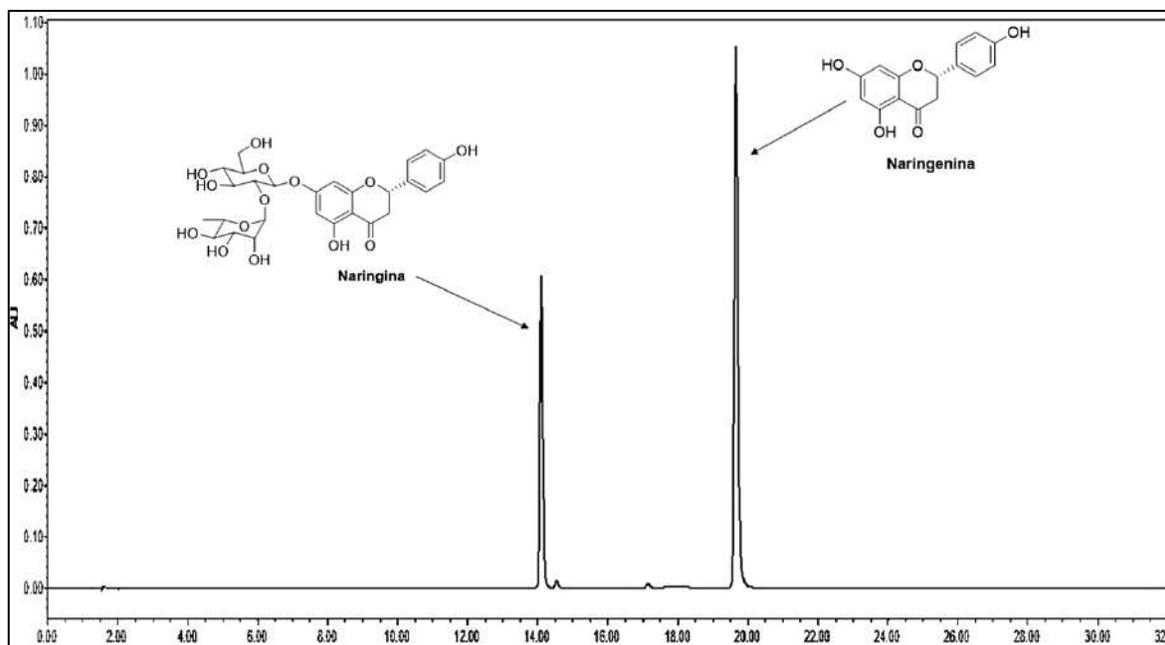


Figura 9. Cromatograma de la mezcla de estándares.

Para cuantificar la naringina extraída mediante los distintos métodos, se realizó una curva de calibración (Tabla 8 y Figura 10) con el estándar comercial de naringina y se cuantificó el contenido en mg de naringina extraída por g de albedo de la toronja (mg/g de albedo).

Tabla 8. Concentraciones de naringina empleadas y áreas bajo la curva obtenidas para la curva de calibración.

mg/mL	Área bajo la curva (mAU*s)
0	0
1	18117.95
2	30689.45
3	37637.60
4	42611.00

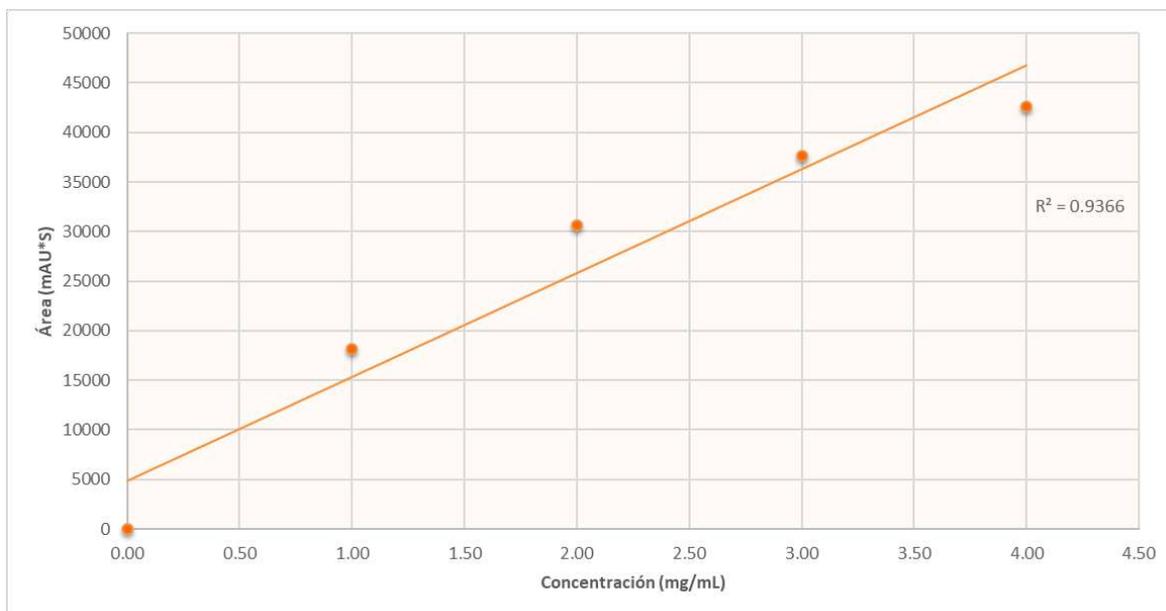


Figura 10. Curva de calibración de naringina.

A la fecha, uno de los métodos reportados con mayor eficiencia en la extracción de naringina a partir de la cáscara de toronja es utilizando metanol como disolvente en un sistema de reflujo (Victor y col., 2018); sin embargo, este disolvente representa grandes riesgos para la salud. En este sentido, se evaluó un disolvente amigable con el medio ambiente como el etanol. Asimismo, se utilizaron energías alternativas de extracción tales como el ultrasonido y las microondas.

6.1.1. Extracción por el método convencional

Para la extracción de la naringina por el método tradicional (extracción por reflujo), la mayor concentración de naringina recuperada por este método se obtuvo cuando se utilizó metanol como disolvente, obteniéndose 23.35 ± 1.51 mg/g de albedo (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones utilizadas en la extracción por reflujo.

Condiciones	Concentración (mg/g)
Disolvente: Metanol; T: 55 °C; t: 6 h	23.35±1.51 ^c
Disolvente: Etanol; T: 55 °C; t: 6 h	20.00±0.52 ^a

^{a, c} Agrupación según el método de Tukey $\alpha=0.05$.

6.1.2. Extracción mediante el uso de las microondas

En la Tabla 10, se muestran los resultados obtenidos de la extracción asistida por microondas. En estas pruebas, se encontró que las condiciones óptimas de extracción cuando se utiliza metanol como disolvente son con la mayor temperatura evaluada (80 °C) y con el menor tiempo de extracción (30 minutos) obteniéndose una concentración de naringina de 19.22 ± 0.28 mg/g de albedo.

Tabla 10. Condiciones utilizadas en las pruebas en microondas con metanol.

Condiciones	Concentración (mg/g)
T: 80 °C; t: 50 min	18.76±0.66 ^a
T: 80 °C; t: 30 min	19.22±0.28 ^a
T: 50 °C; t: 50 min	19.29±0.70 ^a
T: 50 °C; t: 30 min	19.16±0.86 ^a
T: 65 °C; t: 40 min	18.72±0.59 ^a

^a Agrupación según el método de Tukey $\alpha=0.05$.

La figura 11 muestra el diagrama de superficie de las pruebas realizadas con metanol como disolvente y empleando la extracción asistida por microondas.

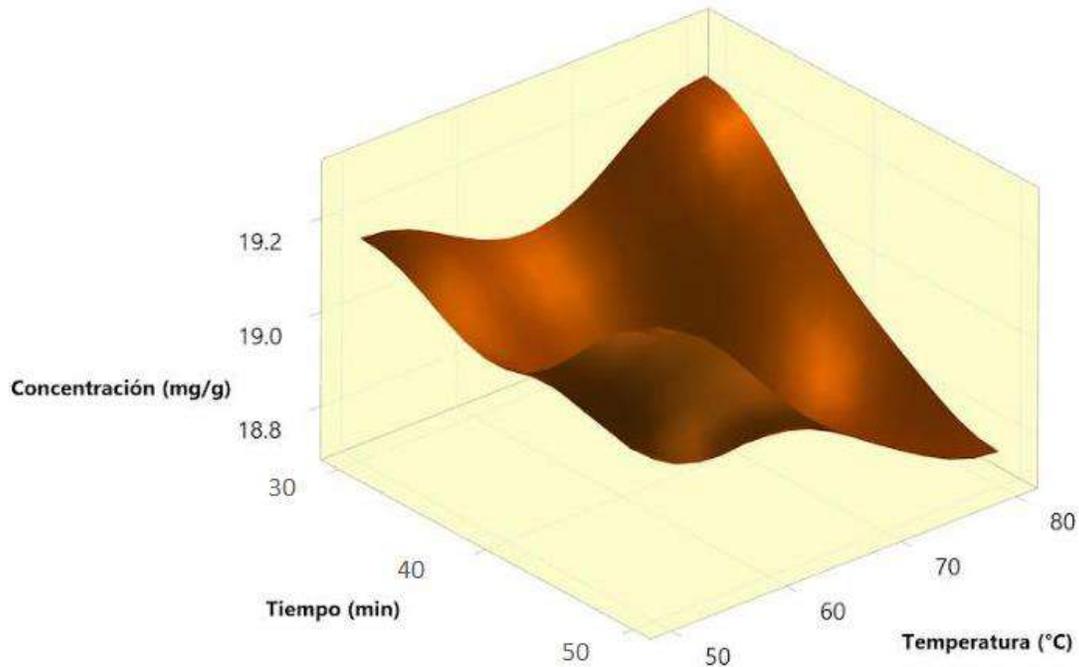


Figura 11. Diagrama de superficie de las pruebas realizadas en microondas con metanol como disolvente.

La tabla 11 muestra los resultados obtenidos de las pruebas realizadas al utilizar etanol como disolvente y la técnica de extracción asistida por microondas. En estos ensayos, se puede observar que la mayor concentración de naringina que se recupera es cuando se utiliza una temperatura de 80 °C y 50 minutos de tiempo total de extracción. Asimismo, se puede observar que, al utilizar etanol, se recupera menos cantidad que la obtenida cuando se utiliza metanol (tabla 10).

Tabla 11. Condiciones utilizadas en las pruebas en microondas con etanol.

Condiciones	Concentración (mg/g)
T: 65 °C; t: 40 min	15.90±0.53 ^b
T: 80 °C; t: 30 min	15.86±0.31 ^b
T: 50 °C; t: 30 min	15.96±0.56 ^b
T: 80 °C; t: 50 min	16.26±0.52 ^b
T: 50 °C; t: 50 min	16.24±0.61 ^b

^bAgrupación según el método de Tukey $\alpha=0.05$.

En la figura 12, se muestra el diagrama construido con las pruebas realizadas en el microondas y utilizando etanol como disolvente. En este diagrama se puede observar que al utilizar el etanol es necesario emplear mayor tiempo (25 minutos) y la temperatura evaluada para obtener la mayor cantidad de naringina.

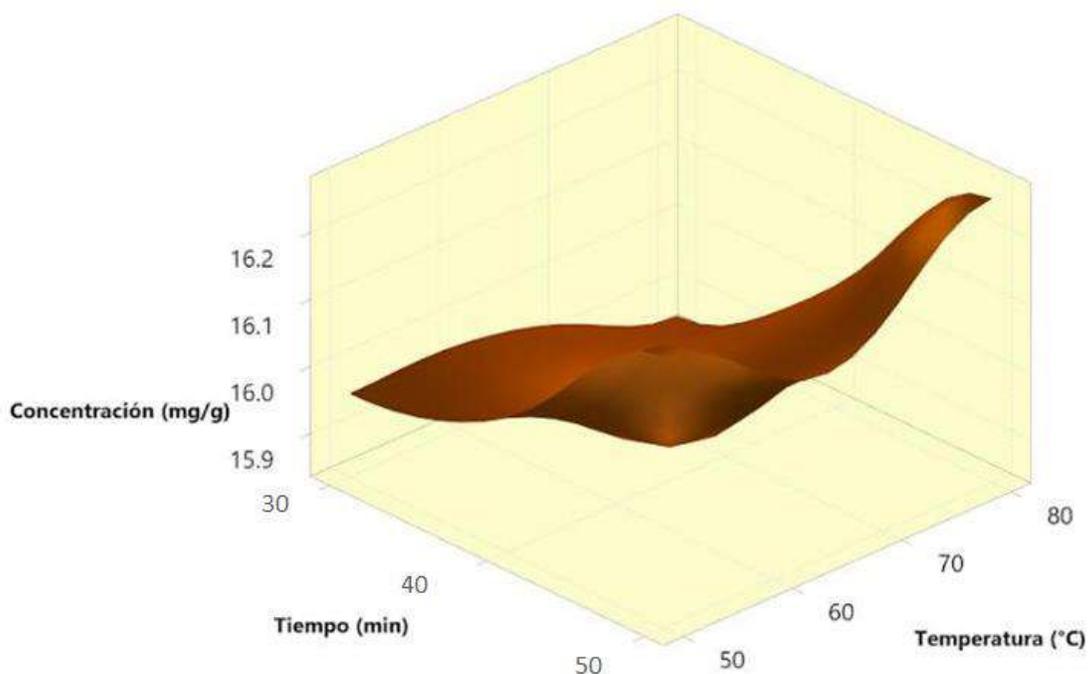


Figura 12. Diagrama de superficie de las pruebas realizadas en microondas y con etanol.

6.1.3. Extracción utilizando ultrasonido

Debido a que no fue posible controlar con precisión la temperatura dentro del ultrasonido, solo se logró probar una de las condiciones previstas (Tabla 12) para este método utilizando metanol. Sin embargo, es de destacarse que esta extracción tuvo eficiencias comparables con la técnica por reflujo con metanol. En este experimento, se encontró que con tan solo 10 minutos de extracción a una temperatura de 35 °C, se obtuvo una concentración de 22.20 ± 0.46 mg/g de albedo. Esta cantidad de naringina recupera es similar a la obtenida mediante reflujo; sin embargo, el calentamiento a reflujo requiere de un tiempo de 6 horas.

Tabla 12. Condiciones utilizadas en la extracción por ultrasonido.

Condiciones	Concentración (mg/g)
Disolvente: Metanol; T: 35 °C; t: 10 min	22.20±0.46 ^c

^c Agrupación según el método de Tukey $\alpha=0.05$.

6.1.4. Comparación entre los distintos métodos de extracción

Con el fin de encontrar el mejor método de extracción, se compararon todas las condiciones utilizadas y para comprobar si existe una diferencia significativa entre los grupos, se realizó la prueba de Tukey. En la figura 13 se puede observar que, en los tres métodos de extracción utilizados, el metanol es el mejor disolvente para recuperar el compuesto **1**. Así mismo, con el uso de este disolvente, se obtienen concentraciones significativamente mayores de naringina comparadas con el etanol en todas las condiciones evaluadas de temperatura y tiempo. La extracción asistida por microondas no logró obtener las mismas recuperaciones que se alcanzaron por refluxo. Mientras que la extracción asistida por ultrasonido obtuvo eficiencias comparables con el método convencional, utilizando temperaturas y tiempos bajos (Tabla 12), por lo que se puede considerar como la opción más viable para la extracción de naringina.

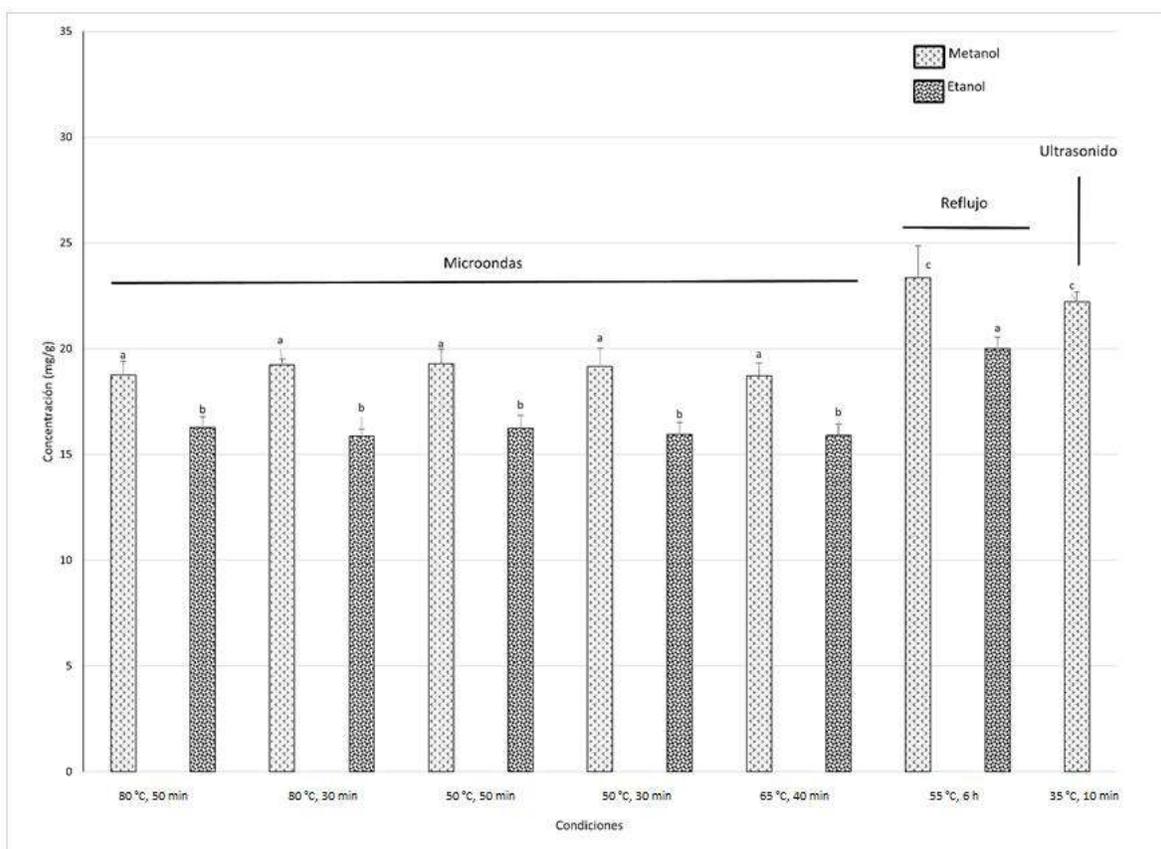


Figura 13. Comparación de las diferentes condiciones de extracción.

6.2 Caracterización de la naringina

En la figura 14 se observa el espectro de ^1H de la naringina, en el cual se tiene la presencia de los protones aromáticos en un desplazamiento químico de entre 6.17 y 7.30 ppm. La señal del protón de la posición 2 se observa en un desplazamiento químico de 5.36 ppm como un doblete. También, a un desplazamiento químico de 2.7 y 3.2 ppm, se confirma la presencia de los protones alifáticos diastereotópicos 3a y 3b. Finalmente, los protones unidos a los carbonos base de oxígeno en los azúcares (glucosa y ramnosa) se observan entre un 3.3 y 3.9 ppm.

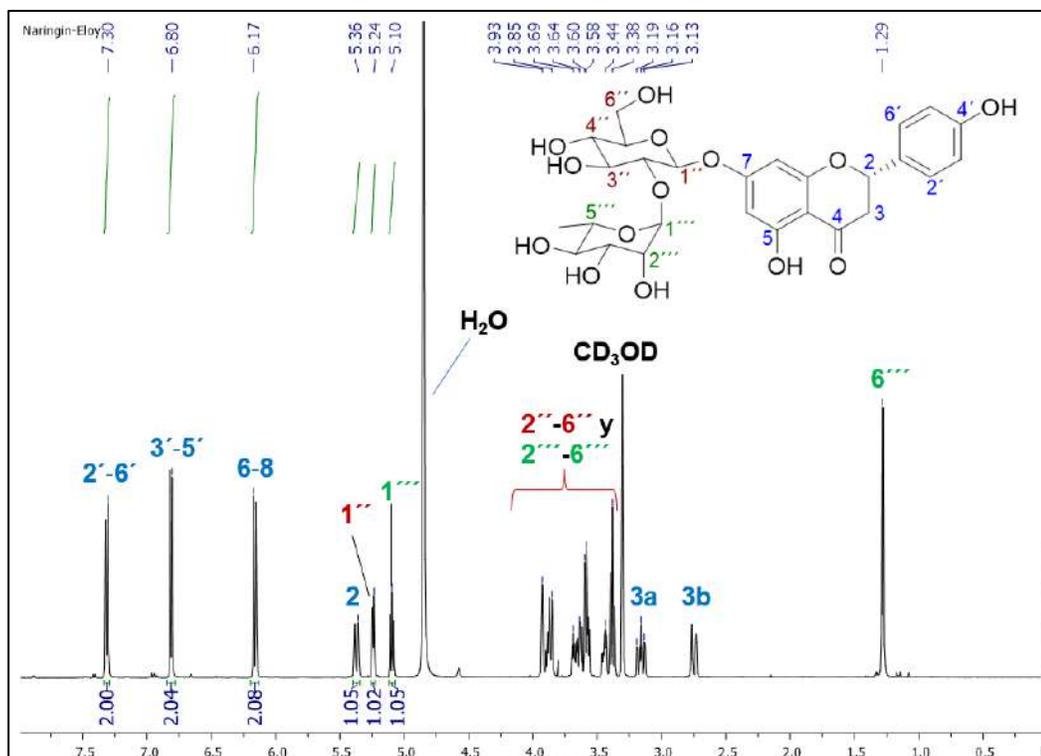


Figura 14. Espectro de ^1H de RMN de la naringina.

En el espectro ^{13}C de la naringina (Figura 15), se observan 25 señales pertenecientes a los 27 carbonos presentes en la molécula. En el espectro, destaca la presencia del carbono del carbonilo en 197.1 ppm y las señales pertenecientes a carbonos de la glucosa y la ramnosa entre 60 y 105 ppm.

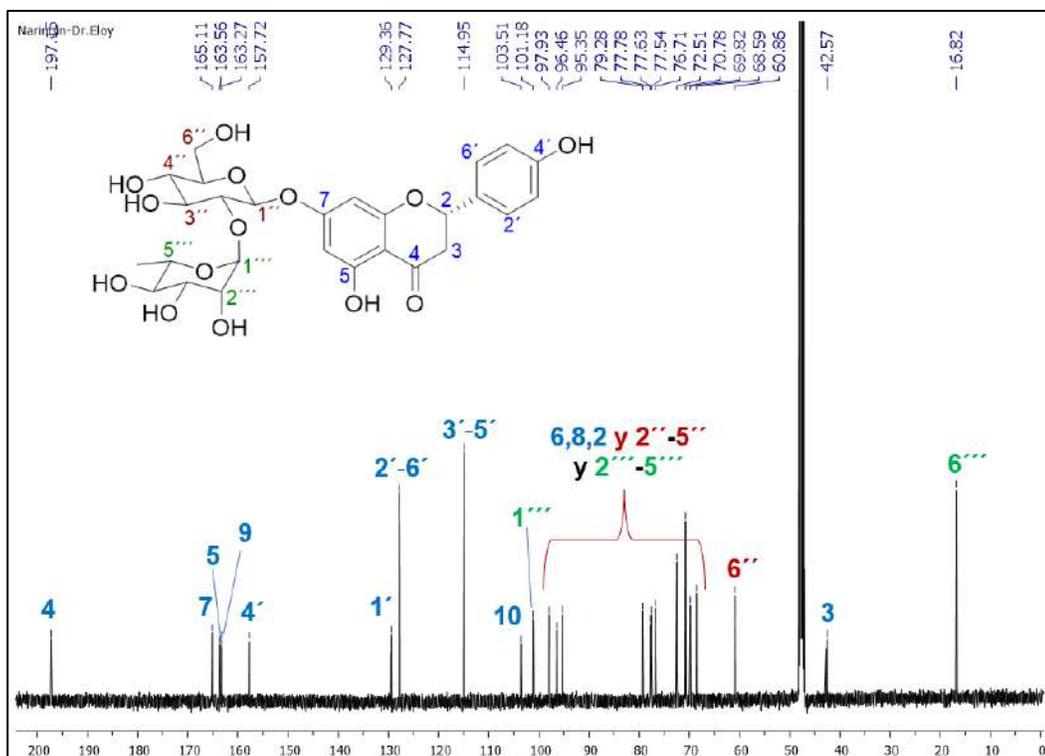
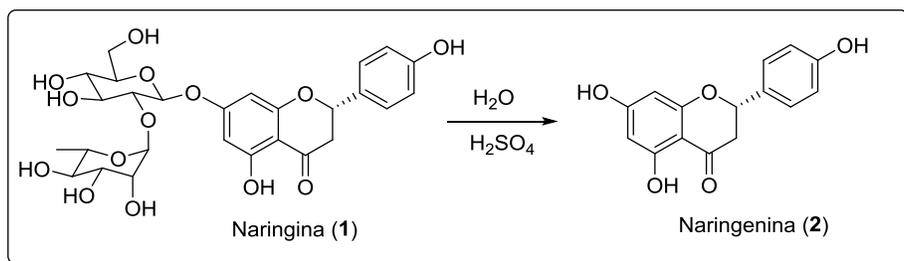


Figura 15. Espectro de ^{13}C de RMN de la naringina.

6.3 Hidrólisis ácida de la naringina para la obtención de la naringenina

Para encontrar las mejores condiciones para obtener la naringenina, se realizaron reacciones de hidrólisis ácida a partir de la naringina (Esquema 2) mediante dos distintas metodologías: un método convencional que consistía en un calentamiento a reflujo y un método más “eficiente y ecológico” como el uso de las microondas, además de evaluar diferentes concentraciones de ácido y tiempo (Tabla 13).



Esquema 2. Hidrólisis catalizada por ácido a partir de la naringina.

Los resultados de las pruebas de hidrólisis se muestran en la tabla 14, las cuales fueron monitoreadas mediante HPLC-DAD para obtener el porcentaje de conversión. Los cromatogramas de estas pruebas se observan en el anexo (Figuras A1-A7). A partir de dichos experimentos, se encontró que las mejores condiciones para obtener la naringenina fueron utilizando una concentración de ácido de 1.5 N y un tiempo de 3 horas por el método convencional. Mientras que en el método alternativo (uso del microondas), se encontró que las condiciones óptimas fueron en un tiempo de 2 horas y con una concentración de ácido de 0.05 N. Lo anterior indica que el uso del microondas puede reducir significativamente la concentración de ácido utilizada para la hidrólisis completa de los azúcares y reducir considerablemente el tiempo de reacción. El uso de ambos métodos nos permitió obtener la naringenina en un 99% de conversión.

Tabla 13. Reacciones de hidrólisis catalizada por ácido a partir de la naringina.

Experimento	H ₂ SO ₄ [N]	Tiempo (horas)	Conversión (%)
1	0.50	2 ^a	50
2	1.00	2 ^a	80
3	1.50	2 ^a	95
4	2.00	2 ^a	97
5	1.50	3 ^a	99
6	0.05	2 ^b	99
7	0.10	2 ^b	100
8	0.50	2 ^b	100
9	1.50	2 ^b	100

^aReacción a reflujo. ^bReacción realizada en microondas a 120 °C.

En la figura 16, se muestra el cromatograma obtenido de analizar el producto de la hidrólisis ácida de la naringina, utilizando una concentración de ácido 1.5 N y dos horas de reacción a reflujo. La naringenina se obtuvo a un tiempo de retención de 19 minutos; también en el mismo cromatograma, se puede observar un pico a los 14 minutos, lo que indica la presencia de un remanente de naringina. Lo anterior es debido a que no se ha logrado la hidrólisis al 100%. También cabe destacar que se observa un pico pequeño a los 16.78 minutos, que indica la presencia de la prunina, esto debido a que es posible obtener esta

molécula bajo las mismas condiciones de hidrólisis de la naringina, pero con concentraciones más bajas de ácido.

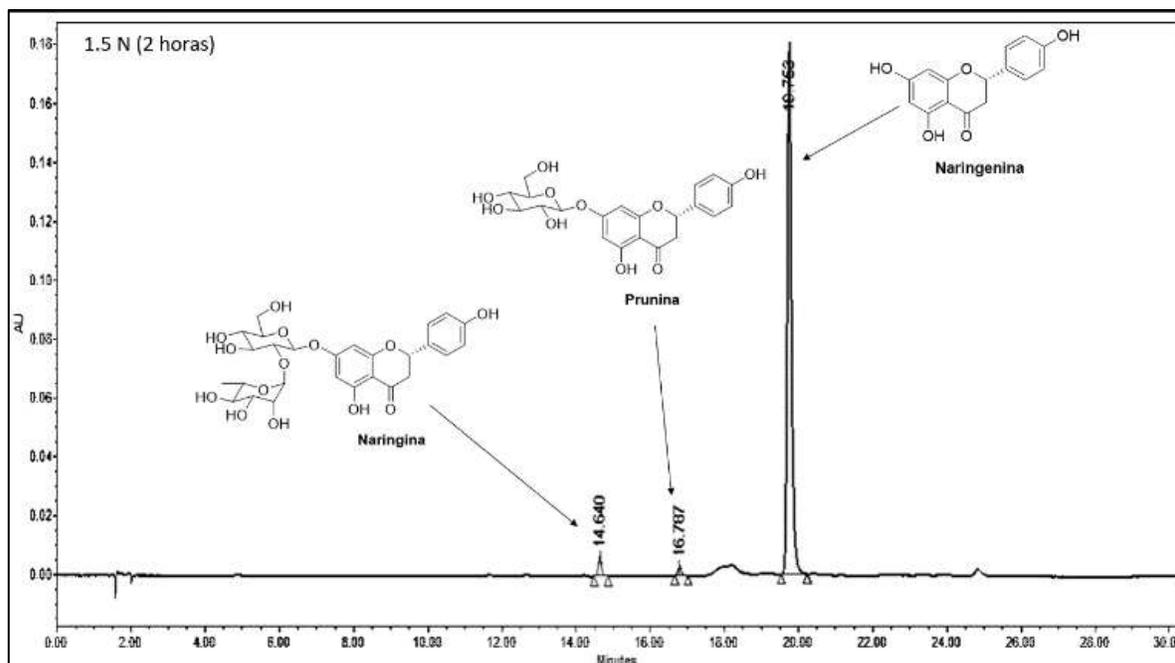


Figura 16. Cromatograma de la reacción de hidrólisis llevada a cabo en 2 horas y con una concentración de ácido 1.5 N (Tabla 13, experimento 3).

6.4 Caracterización de la naringenina

Además de confirmar la presencia de la naringenina mediante HPLC-DAD, se logró confirmar la naturaleza química de este compuesto mediante el estudio de sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C . En la Figura 17, se observa el espectro de ^1H de la naringenina, en el cual se muestra la presencia de los protones aromáticos en un desplazamiento químico de entre 5.8 y 7.4 ppm. Asimismo, se observa la señal del protón en la posición 2 a un desplazamiento químico de 5.32 ppm como un doble de dobles. Finalmente, se confirma la presencia de los protones alifáticos y diasterotópicos 3a y 3b a un desplazamiento químico de 3.10 y 2.68 ppm respectivamente.

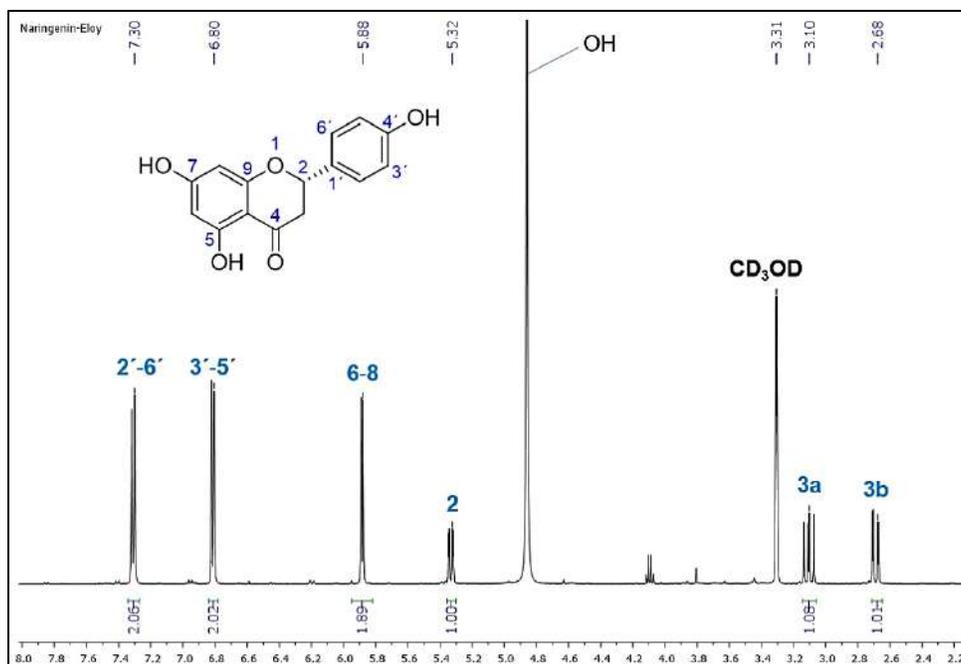


Figura 17. Espectro de ¹H de RMN de la naringenina.

En el espectro de ¹³C de la naringenina (Figura 18), se observan 15 señales correspondientes a los 15 carbonos presentes en la molécula. En dicho espectro, se pueden destacar la presencia del carbono carbonilo a 196.3 ppm, 12 carbonos aromáticos pertenecientes a los anillos A y B de la estructura del flavonoide y las dos señales alifáticas correspondientes a los C-2 y C-3 a 79.1 y 42.6 ppm respectivamente.

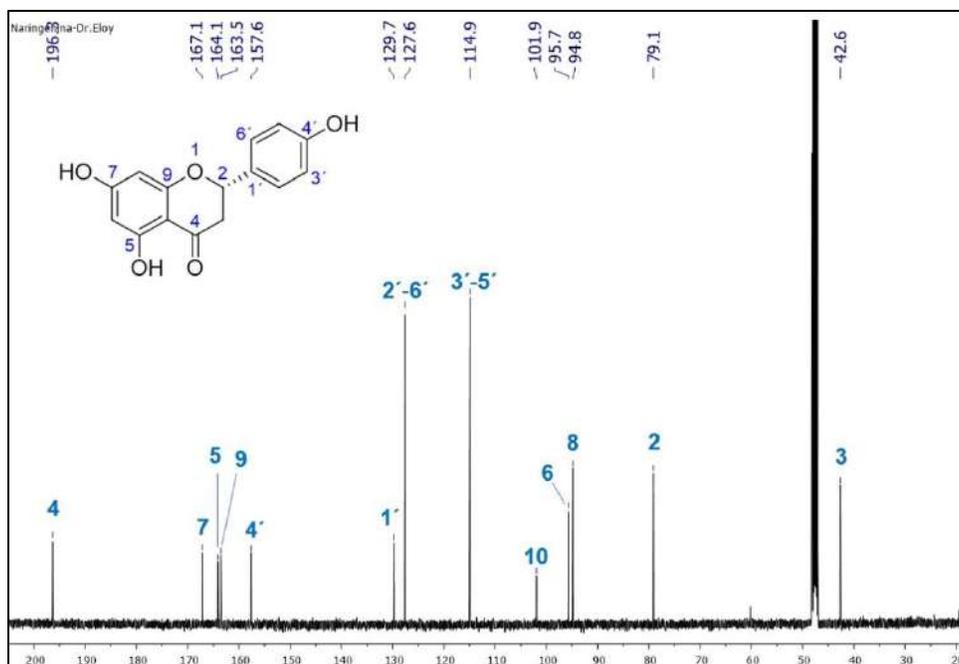
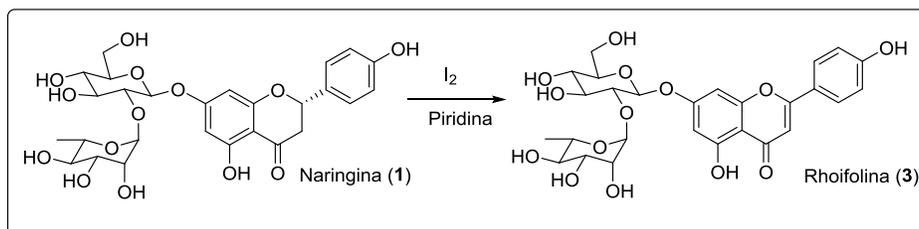


Figura 18. Espectro de ^{13}C de RMN de la naringina.

6.5 Síntesis parcial de la rhoifolina a partir de la naringina

Por otra parte, se exploraron dos vías independientes para la obtención de la apigenina. Una de estas rutas es obtener el glucosil-flavonoide conocido como rhoifolina (**3**) y la posterior hidrólisis de los azúcares para llegar a la apigenina.

La metodología que se siguió para la obtención del compuesto **3** fue mediante una reacción de oxidación catalizada por yodo y base. Cuando se lleva a cabo dicha reacción partiendo de la naringina, es posible sintetizar la molécula de rhoifolina (Esquema 3).



Esquema 3. Reacción de oxidación catalizada por yodo para la obtención de la rhoifolina.

Los resultados de las pruebas de oxidación de la naringina a la rhoifolina se muestran en la tabla 14. La mejor conversión alcanzada fue del 70%, después de 24 horas de reacción.

Tabla 14. Reacciones de oxidación catalizada por yodo y base a partir de la naringina.

Experimento	Tiempo (horas)	Temperatura (°C)	Conversión (%)
1	3.5	95	20
2	24	95	70

En la figura 19, se muestra el cromatograma correspondiente a la oxidación de la naringina; en éste, se observan dos picos traslapados correspondientes a la naringina y a la rhoifolina. Lo anterior indica que aún no se ha completado la reacción de oxidación.

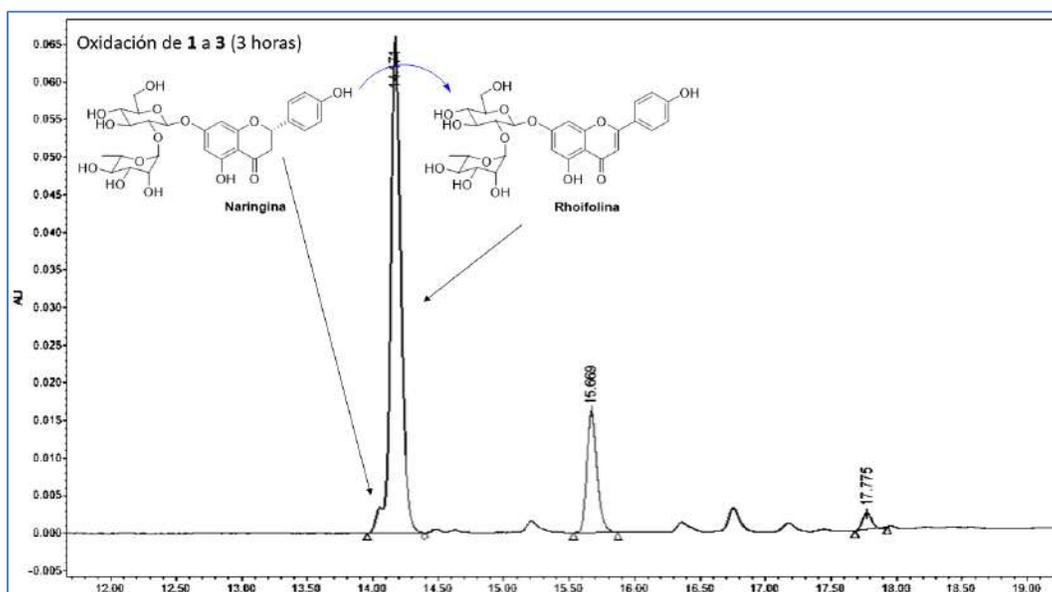


Figura 19. Cromatograma de la transformación de naringina a rhoifolina a las 3 horas de reacción.

Cuando la reacción de oxidación se deja por 24 horas, se logra un porcentaje de conversión a rhoifolina del 70%. En el cromatograma (Figura 20), se observa un pico perteneciente a la rhoifolina a los 14 minutos y posteriormente se

observan otros picos que corresponden a otras moléculas, las cuales pudieron ser obtenidas tanto a partir de la rhoifolina como de la naringina, debido al tiempo de reacción. Por lo que es necesario realizar más pruebas para encontrar el tiempo óptimo donde se pueda lograr una mayor concentración de rhoifolina en la reacción.

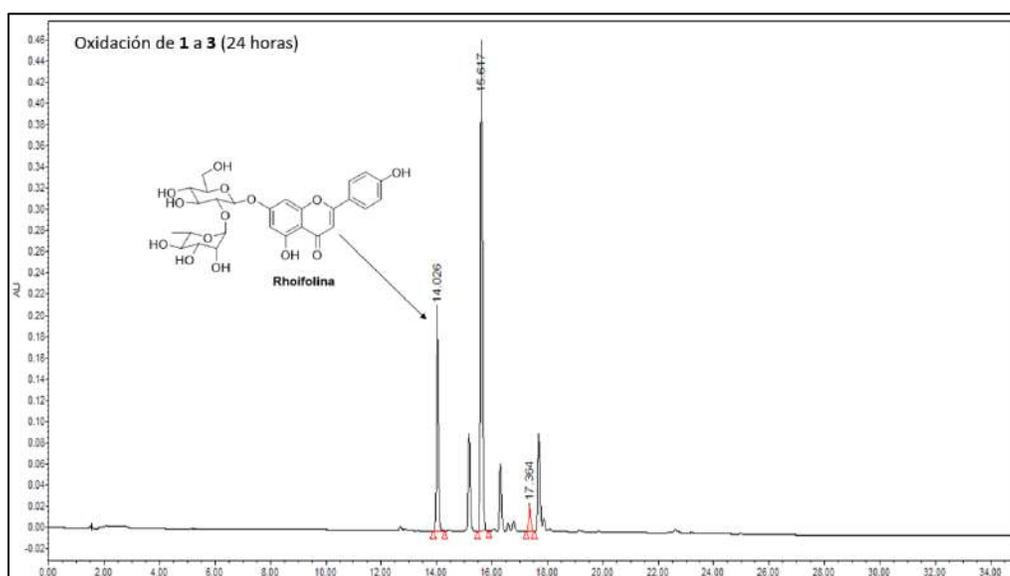
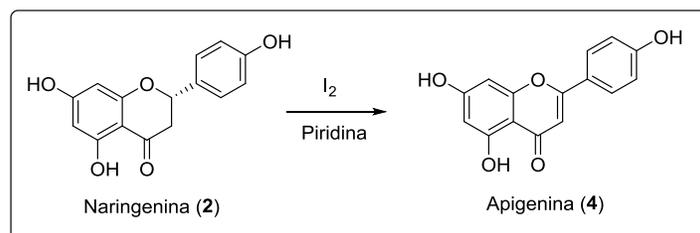


Figura 20. Cromatograma de la transformación de naringina a rhoifolina a las 24 horas de reacción.

6.6 Síntesis parcial de la apigenina a partir de la naringenina

Asimismo, utilizando la misma reacción de oxidación catalizada por yodo y base descrita anteriormente, pero usando como precursor la naringenina, se logró sintetizar la apigenina (Esquema 4).



Esquema 4. Reacción de oxidación catalizada por yodo para la obtención de la apigenina.

Se realizaron distintas pruebas para la obtención de la apigenina (Tabla 15) en las cuales se logró obtener un porcentaje de conversión del 99% en un tiempo de reacción de 24 horas a 95 °C.

Tabla 15. Reacción de oxidación catalizada por yodo y base a partir de la naringenina.

Experimento	Tiempo (horas)	Conversión (%)
1	2	30
2	24	99

^aReacción a 95 °C.

Al transcurrir 2 horas de reacción, se analizó la conversión de naringenina a apigenina mediante cromatografía de líquidos. En dicho cromatograma (Figura 21) se observan dos picos intensos; el primero, en un tiempo de retención de 19.8 minutos, el cual corresponde a la apigenina y el segundo con mayor intensidad a un tiempo de retención de 19.9 minutos correspondiente a la materia prima naringenina.

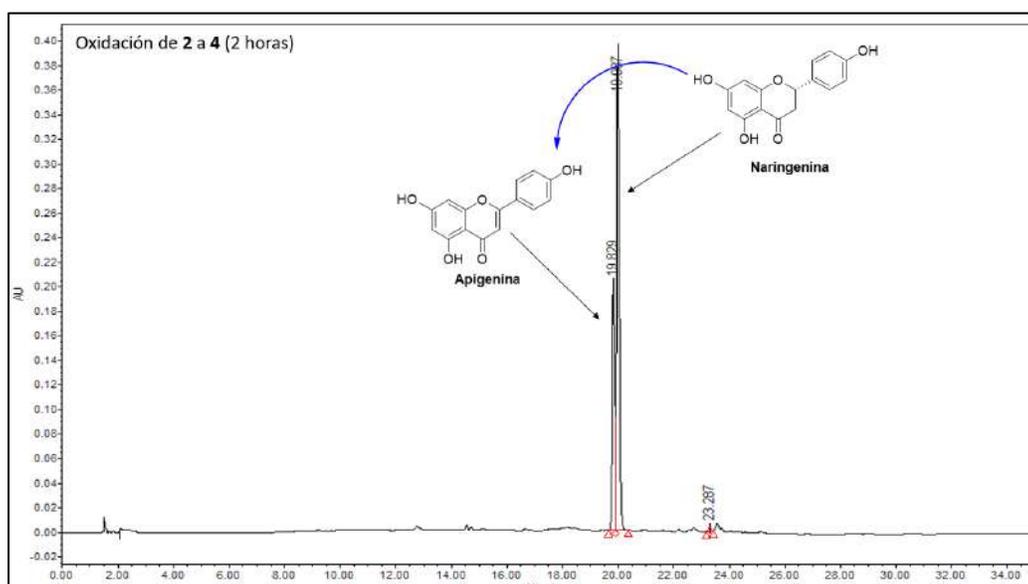


Figura 21. Cromatograma de la transformación de naringenina a apigenina a las 2 horas de reacción.

Cuando la reacción de oxidación se realiza durante 24 horas, se observa una excelente conversión de hasta un 99% de la naringenina a la apigenina. En el cromatograma obtenido de esa prueba (Figura 22), se observa un solo pico en un tiempo de retención de 19.78 minutos, que corresponde al compuesto buscado.

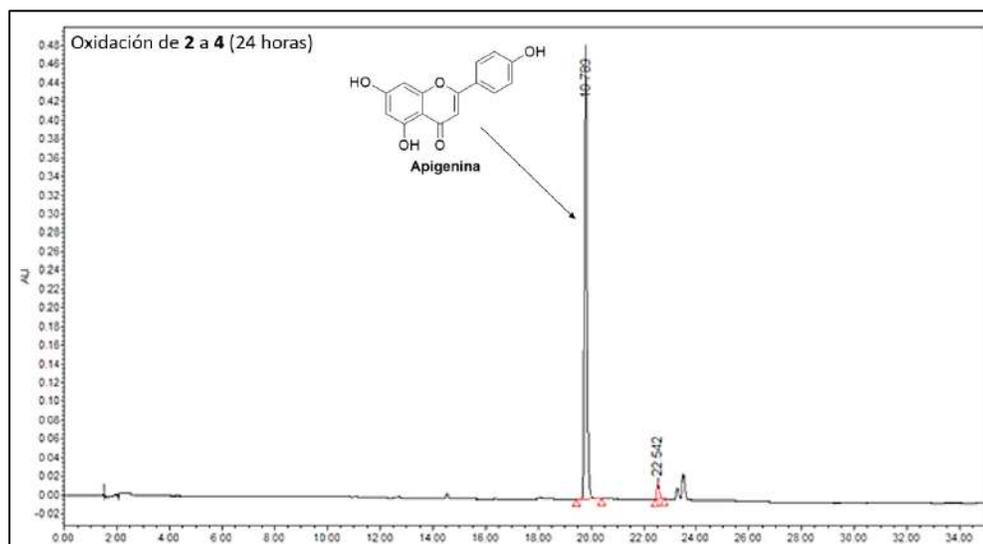


Figura 22. Cromatograma de la transformación de naringenina a apigenina a las 24 horas de reacción.

6.7 Caracterización de la apigenina

Al igual que en los casos anteriores, se confirmó la naturaleza química de la apigenina mediante el estudio de su espectro de RMN de ^1H (Figura 23). En dicho espectro, se observa entre 6.58 y 7.85 ppm, la presencia de los protones aromáticos en los anillos A y B. Asimismo, se observa la presencia de un protón vinílico en un desplazamiento químico de 6.45 ppm perteneciente al protón unido al C-3. Es de destacarse que esta señal confirma la transformación de la naringenina a la apigenina. Por ejemplo, en el espectro de ^1H de la naringenina (ver Figura 17), se observa el protón presente en la posición 2 a 5.32 ppm y los protones de la posición 3 en 3.10 ppm y 2.68 ppm. Sin embargo, en el espectro de ^1H de la apigenina, no se observa ninguna de las tres señales antes mencionadas, ya que la presencia del doble enlace entre los carbonos 2 y 3, provoca que el C-2 sea un carbono cuaternario y el carbono 3 sea un metino vinílico.

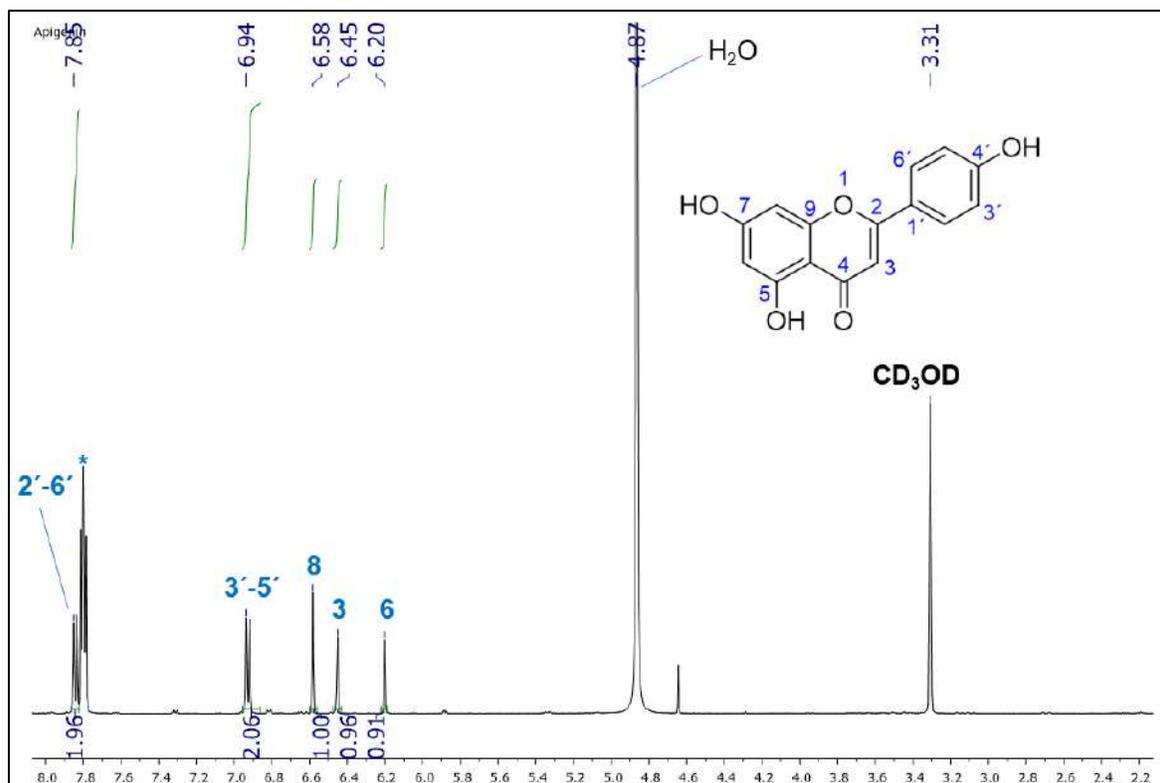
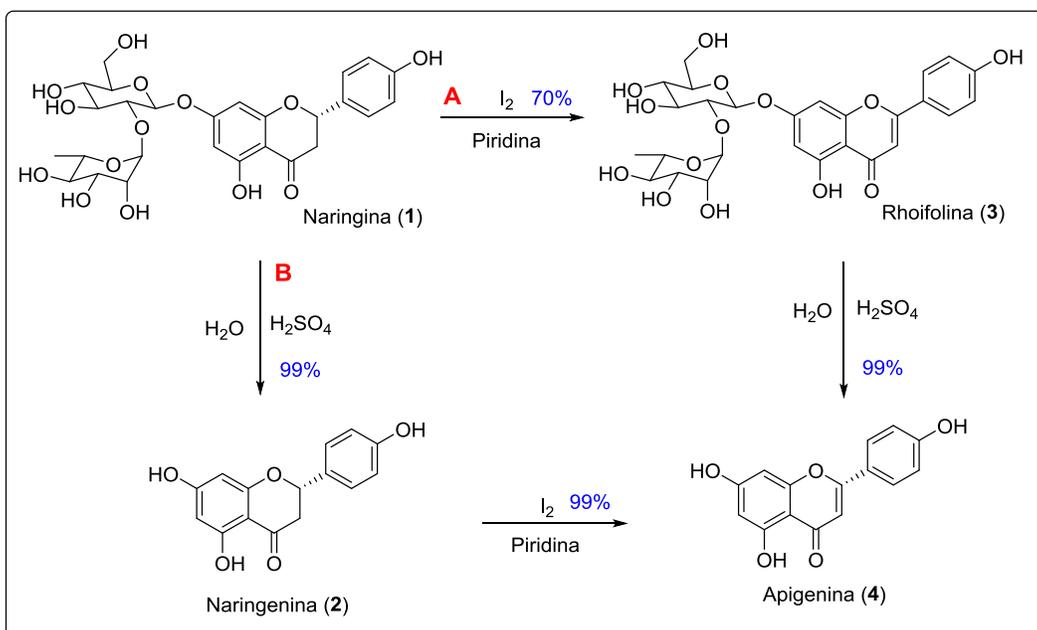


Figura 23. Espectro de ^1H de RMN de la apigenina.

6.8 Análisis de la mejor ruta de síntesis para la obtención de la apigenina

Los resultados obtenidos en las diferentes reacciones de oxidación e hidrólisis indican que la mejor ruta de síntesis para obtener la apigenina (Esquema 5) es a través de la ruta B. Al comparar los rendimientos globales de ambas rutas, se encontró que para la ruta A (*vía* rhoifolina), el rendimiento global es del 69.3%, mientras que en la ruta B (*vía* naringenina) es del 98%. En ese sentido, la ruta B es la vía más conveniente para realizar la síntesis parcial de la apigenina con una excelente conversión, es decir, conviene primero hidrolizar la molécula de naringina y obtener la naringenina y posteriormente realizar la oxidación de **2** que oxidar directamente la naringina a **3** y consecutivamente hidrolizar los azúcares en el compuesto **3**.



Esquema 5. Rutas para la obtención de apigenina.

7. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método cromatográfico mediante HPLC-DAD para el monitoreo de los flavonoides y de los productos de las diferentes reacciones. Se encontró que para la extracción de la naringina del albedo de la cáscara de toronja (*Citrus paradisi*), tanto por el método tradicional (extracción a reflujo) como en las extracciones asistidas por ultrasonido y microondas, se obtiene la mayor cantidad del compuesto **1** cuando se utiliza metanol como disolvente. Asimismo, la técnica de ultrasonido obtuvo resultados comparables con el método tradicional (23.35 ± 1.51 mg/g de albedo) al recuperar una concentración de naringina de 22.20 ± 0.46 mg/g de albedo. Sin embargo, el uso de la extracción por ultrasonido se muestra como el método más eficiente, ya que se recupera una cantidad significativa del compuesto **1** en tan solo 10 minutos y con una temperatura de 35 °C, mientras que en el método convencional se requieren de 6 horas de extracción a 55 °C.

2. Se encontró que las condiciones óptimas de hidrólisis de los azúcares en la naringina se obtienen al utilizar una concentración de ácido 1.5 N y durante 3 horas de calentamiento a reflujo. Mientras que, con el uso de las microondas, se encontró que la hidrólisis completa ocurre en un tiempo de 2 horas y con una concentración de ácido de 0.05 N. Lo anterior indica que el uso del microondas es un método más “amigable con el ambiente”, ya que se reduce significativamente la cantidad de ácido utilizada (de 1.5 N a 0.05 N) y el tiempo de reacción (de 3 a 2 horas) comparada con el calentamiento a reflujo.

3. Se logró realizar la síntesis parcial de la rhoifolina (**3**) a partir de la naringina (**1**), mediante la reacción de oxidación catalizada por yodo, con un 70 % de conversión. Al utilizar las mismas condiciones de reacción y partiendo de la naringenina (**2**), se logró obtener el flavonoide apigenina (**4**) con una excelente conversión, de hasta un 99%. En ese sentido, el rendimiento global obtenido para la obtención del compuesto **4** vía la rhoifolina es del 69.3 %; mientras que, vía la naringenina, es de un 98 %; por lo tanto, esta última ruta es la más conveniente para lograr la síntesis parcial de la apigenina.

4. Finalmente, se logró confirmar, mediante espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C , la naturaleza química de la naringina extraída de la cáscara de toronja (*Citrus paradisi*) y de los citroflavonoides naringenina y apigenina obtenidos a través de síntesis parcial.

8. BIBLIOGRAFÍA

Ali F, Rahul-Naz, F, Jyoti S, Siddique YH. Health functionality of apigenin: A review. *Int J Food Prop* **2017**; 20(6): 1197-1238.

Catarino DM, Alves-Silva J, Pereira RO, Cardoso MS. Antioxidant capacities of flavones and benefits in oxidative-stress related diseases. *Curr Top Med Chem* **2015**; 15:105–119.

Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem* **2008**; 56:6185–6205.

Chen R, Qi QL, Wang MT, Li QY. Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharm Biol* **2016**;54(12):, 3203-3210.

Dewick PM. Medicinal natural products a biosynthetic approach. 3a. edición. Chichester: John Wiley and Sons, **2009**:116-117.

de la Rosa-Hernández M, Wong-Paz JE, Muñoz-Márquez DB, Carrillo-Inungaray ML, Sánchez-González JM. Compuestos fenólicos bioactivos de la toronja (*Citrus paradisi*) y su importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Rev Mex Cienc Farm* **2016**; 47(2), 22-35.

Grotewolf E. The science of flavonoids. Nueva York: Springer, **2006**:2-4

Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**; 87:914–920

Haytowitz DB, Bhagwat S, Harnly J, Holden JM, Gebhardt SE. Sources of Flavonoids in the US Diet Using USDA's Updated Database on the Flavonoid Content of Selected Foods. *ARS* **2006**.

Ju SM, Kang JG, Bae JS, Pae HO, Lyu YS, Jeon BH. The flavonoid apigenin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through reduction of p53 activation and promotion of PI3K/Akt pathway in human renal proximal tubular epithelial cells. *Evid based Complement Altern* **2015**; 2015:1-9.

Kang HK, Ecklund D, Liu M, Datta SK. Apigenin, a non-mutagenic dietary flavonoid, suppresses lupus by inhibiting autoantigen presentation for expansion of autoreactive th1 and th17 cells. *Arthritis Res Ther* **2009**; 11(2): 1-13.

Karim N, Jia Z, Zheng X, Cui S, Chen W. A recent review of citrus flavanone naringenin on metabolic diseases and its potential sources for high yield-production. *Trends Food Sci Technol* **2018**; 79:35–54.

Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci* **2004**; 96: 229–245.

Koopman F, Beekwilder J, Crimi B, van Houwelingen A, Hall RD, Bosch D, van Maris AJ, Pronk JT, Daran JM. De novo production of the flavonoid naringenin in engineered *saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* **2012**; 11:155.

Llanes PR, Villamil AP, López, CO. Determinación por hplc de flavanonas en jugos cítricos de variedades cultivadas en santander. *Sci Tech* **2007**:13(33), 293-294.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* **2016**; 5:1-15.

Pang WY, Wang XL, Mok SK, Lai WP, Chow HK, Leung PC, Yao XS, Wong MS. Naringin improves bone properties in ovariectomized mice and exerts oestrogen-like activities in rat osteoblast-like (UMR-106) cells. *Br J Pharmacol* **2010**; 159:1693–1703.

Pereira RM, Andrades NE, Paulino N, Sawaya AC, Eberlin MN, Marcucci MC, Favero GM, Novak EM, Bydlowski SP. Synthesis and characterization of a metal complex containing naringin and Cu, and its antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory and tumor cell cytotoxicity. *Molecules* **2007**; 12:1352–1366.

Pu P, Gao DM, Mohamed S, Chen J, Zhang J, Zhou XY, Zhou NJ, Xie J, Jiang H. Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. *Arch Biochem Biophys* **2012**; 518:61–70.

Salehi B, Fokou PVT, Sharifi-Rad M, Zucca P, Pezzani R, Martins N, Sharifi-Rad J. The therapeutic potential of naringenin: a review of clinical trials. *Pharmaceuticals* **2019**; 12(1):1-18.

Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A, Martins N. The therapeutic potential of apigenin. *Int J Mol Sci* **2019**; 20(6): 1-26.

Shin GC, Kim C, Lee JM, Cho WS, Lee SG, Jeong M, Cho J, Lee K. Apigenin-induced apoptosis is mediated by reactive oxygen species and activation of erk1/2 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Chem Biol Interact* **2009**; 182: 29–36.

Sudto K, Pornpakakul S, Wanichwecharungruang S. An efficient method for the large-scale isolation of naringin from pomelo (*Citrus grandis*) peel. *Int J Food Sci* **2009**; 44(9):1737-1742.

Talon M, Caruso M, Gmitter jr FG. *The Genus Citrus*. Duxford: Woodhead Publishing, **2020**:1-28.

Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity, and nutritional properties: A review. *Food Chem* **2007**; 104(2): 466-479.

USDA. United States Department of Agriculture. Citrus: world markets and trade. FAS [serie en internet] **2020** [Consultado 2021 febrero 24]; 10. Disponible en:

<https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/w66343603/gf06gq220/rx914c158/citrus.pdf>

USDA. United States Department of Agriculture. Mexico: citrus annual. FAS [serie en internet] **2020** [Consultado 2021 febrero 24]; MX2019-0067:19-23. Disponible en:

https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Citrus%20Annual_Mexico%20City_Mexico_12-20-2019

Victor MM, David JM, Sakukuma MC, França EL, Nunes AV. A simple and efficient process for the extraction of naringin from grapefruit peel waste. *Green Process Synth* **2018**; 7(6):524-529.

Victor MM, Leite JL, Ramos GS, David JM, Cardoso KV. Utilização de biomassa em aulas de graduação de química orgânica experimental: extração de flavonoides a partir de resíduos de cascas de frutas cítricas. *Quim Nova* **2021**;43: 1522-1528.

Wang DM, Yang YJ, Zhang L, Zhang X, Guan FF, Zhang LF. Naringin enhances CaMKII activity and improves long-term memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci* **2013**; 14:5576–5586.

Wang J, Zhou RG, Wu T, Yang T, Qin QX, Li I, Yang J. Total synthesis of apigenin. *J Chem Res* **2012**; 36(3): 121-122.

Wang Q, Cui W, Liu M, Zhang J, Liao RQ, Liao XL, Yang J. An improved synthesis of apigenin. *J Chem Res* **2015**; 39(2): 67-69.

Wong KC, Pang WY, Wang XL, Mok SK, Lai WP, Chow HK, Leung PC, Yao XS, Wong MS. *Drynaria fortunei*-derived total flavonoid fraction and isolated compounds exert oestrogen-like protective effects in bone. *Br J Nutr* **2013**; 110:475–485.

Yan J, Yu L, Xu S, Gu W, Zhu W. Apigenin accumulation and expression analysis of apigenin biosynthesis relative genes in celery. *Sci Hort* **2014**; 165:218–224.

Zhang P, Dai KR, Yan SG, Yan WQ, Zhang C, Chen DQ, Xu B, Xu ZW. Effects of naringin on the proliferation and osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cell. *Eur J Pharmacol* **2009**; 607:1–5.

Zhao G, Qin GW, Wang J, Chu WJ, Guo LH. Functional activation of monoamine transporters by luteolin and apigenin isolated from the fruit of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Neurochem Int* **2010**; 56(1):168-176.

9. ANEXOS

En este apartado se anexan cromatogramas, datos obtenidos y espectros correspondientes a análisis complementarios que no se discuten en la tesis, pero que contribuyen a soportar las conclusiones a las cuales se llegó en esta investigación.

9.1 Tabla de contenido

Contenido	Página
Figura A1. Cromatograma de la reacción de hidrolisis llevada a cabo en 2 horas y con una concentración de ácido 0.5 N (Tabla 13, experimento 1).	55
Figura A2. Cromatograma de la reacción de hidrolisis llevada a cabo en 2 horas y con una concentración de ácido 1.0 N (Tabla 13, experimento 2).	55
Figura A3. Cromatograma de la reacción de hidrolisis llevada a cabo en 2 horas y con una concentración de ácido 2.0 N (Tabla 13, experimento 4).	56
Figura A4. Cromatograma de la reacción de hidrolisis llevada a cabo en 30 minutos y con una concentración de ácido 0.05 N (Tabla 13, experimento 6).	56
Figura A5. Cromatograma de la reacción de hidrolisis llevada a cabo en 30 minutos y con una concentración de ácido 0.1 N (Tabla 13, experimento 7).	57
Figura A6. Cromatograma de la reacción de hidrolisis llevada a cabo en 30 minutos y con una concentración de ácido 0.50 N (Tabla 13, experimento 8).	57
Figura A7. Cromatograma de la reacción de hidrolisis llevada a cabo en 30 minutos y con una concentración de ácido 1.5 N (Tabla 13, experimento 9).	58
Tabla A1. Resultados obtenidos en el análisis HPLC de la extracción asistida por microondas.	59
Tabla A2. Resultados obtenidos en el análisis HPLC de la extracción por reflujo.	60
Tabla A3. Resultados obtenidos en el análisis HPLC de la extracción asistida por ultrasonido.	60

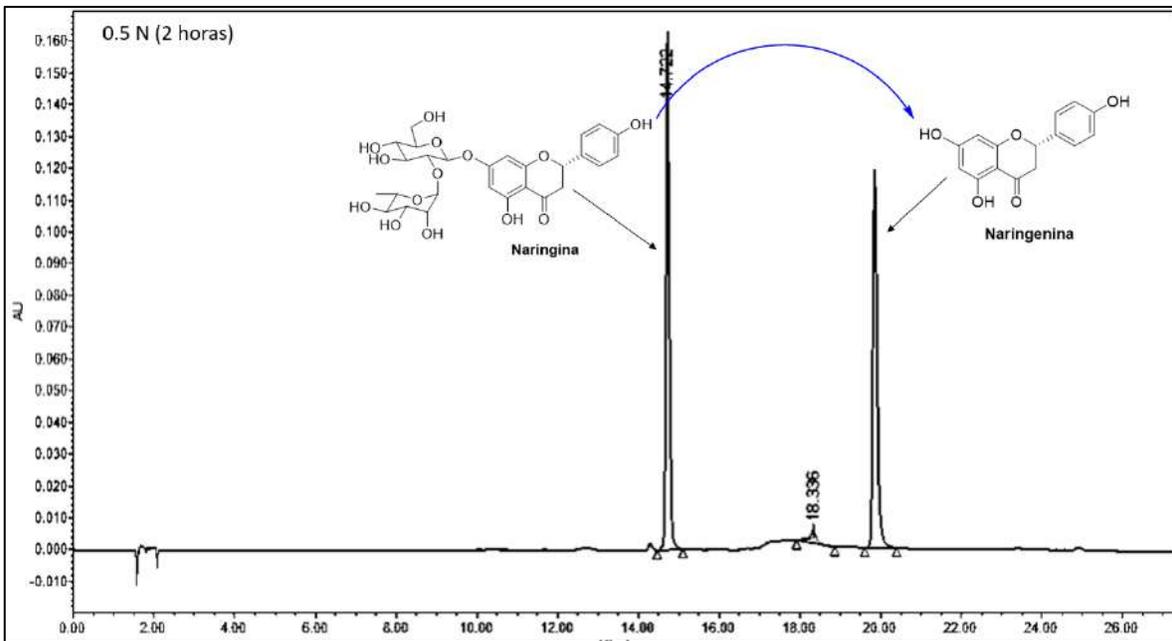


Figura A1. Cromatograma de la reacción de hidrolisis llevada a cabo en 2 horas y con una concentración de ácido 0.5 N (Tabla 13, experimento 1).

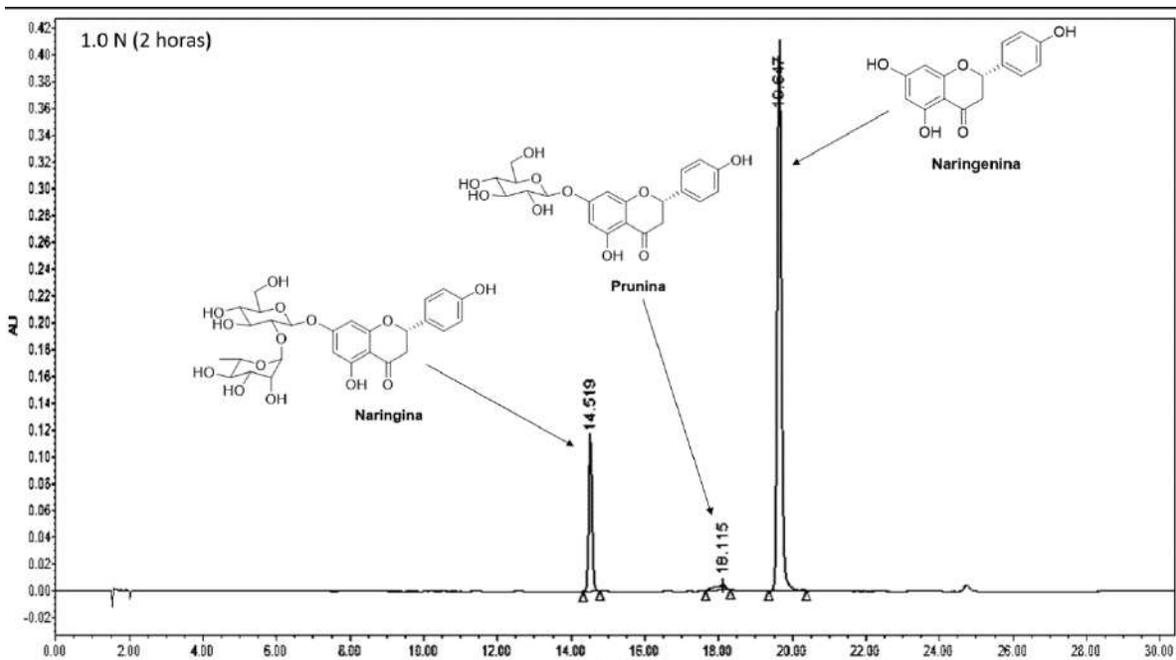


Figura A2. Cromatograma de la reacción de hidrolisis llevada a cabo en 2 horas y con una concentración de ácido 1.0 N (Tabla 13, experimento 2).

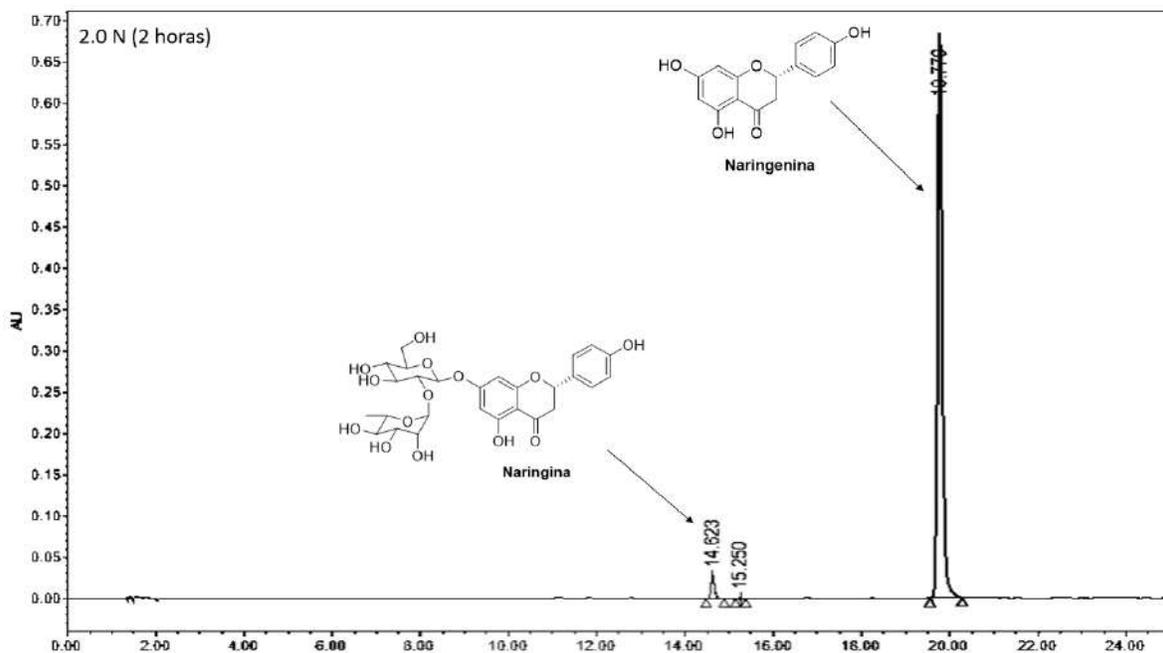


Figura A3. Cromatograma de la reacción de hidrólisis llevada a cabo en 2 horas y con una concentración de ácido 2.0 N (Tabla 13, experimento 4).

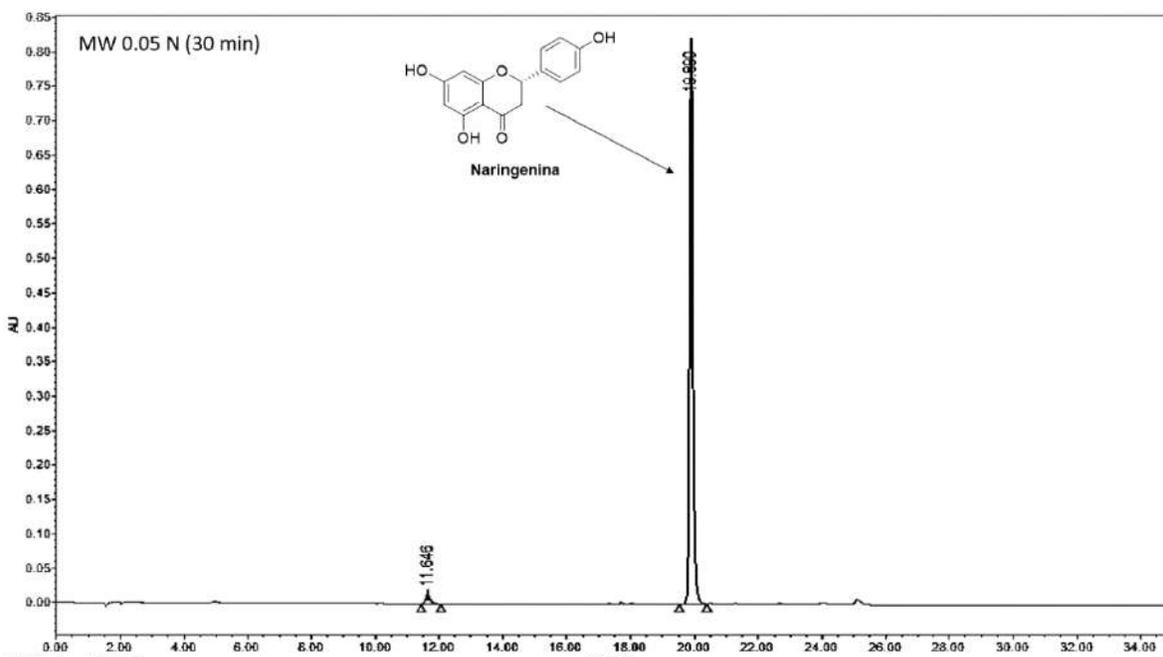


Figura A4. Cromatograma de la reacción de hidrólisis llevada a cabo en 30 minutos y con una concentración de ácido 0.05 N (Tabla 13, experimento 6).

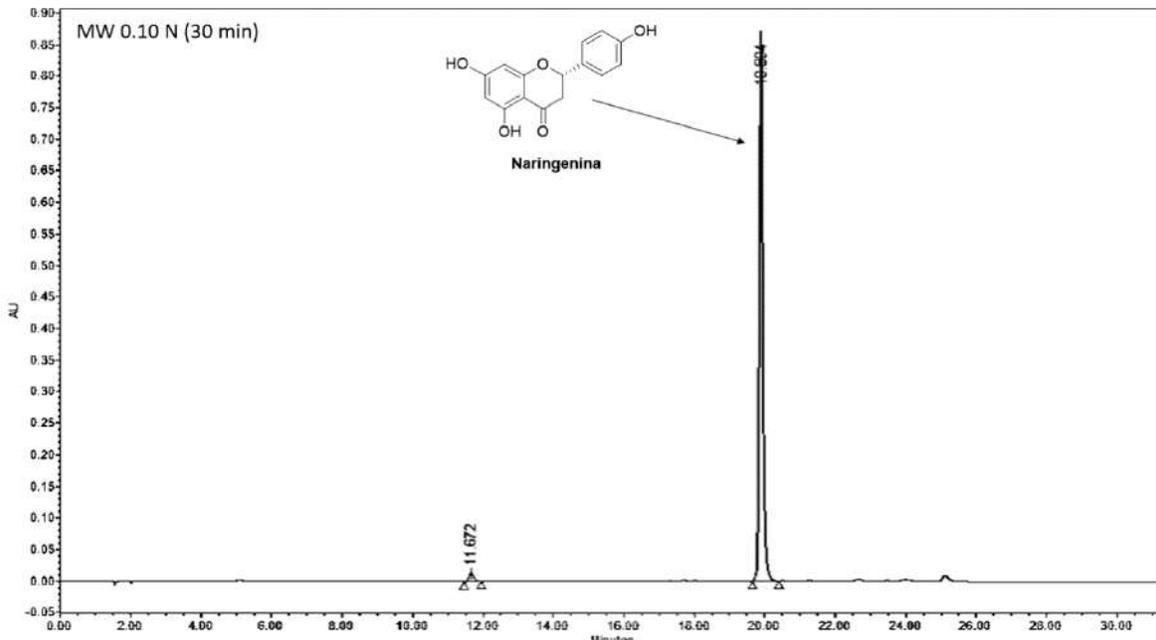


Figura A5. Cromatograma de la reacción de hidrólisis llevada a cabo en 30 minutos y con una concentración de ácido 0.1 N (Tabla 13, experimento 7).

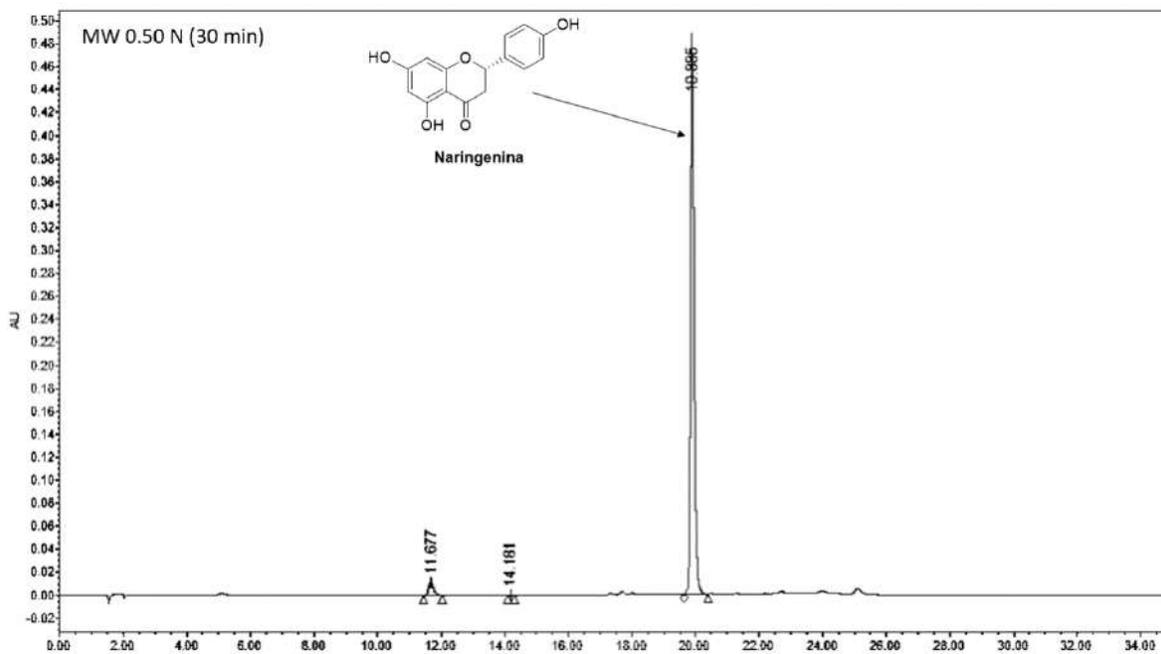


Figura A6. Cromatograma de la reacción de hidrólisis llevada a cabo en 30 minutos y con una concentración de ácido 0.50 N (Tabla 13, experimento 8).

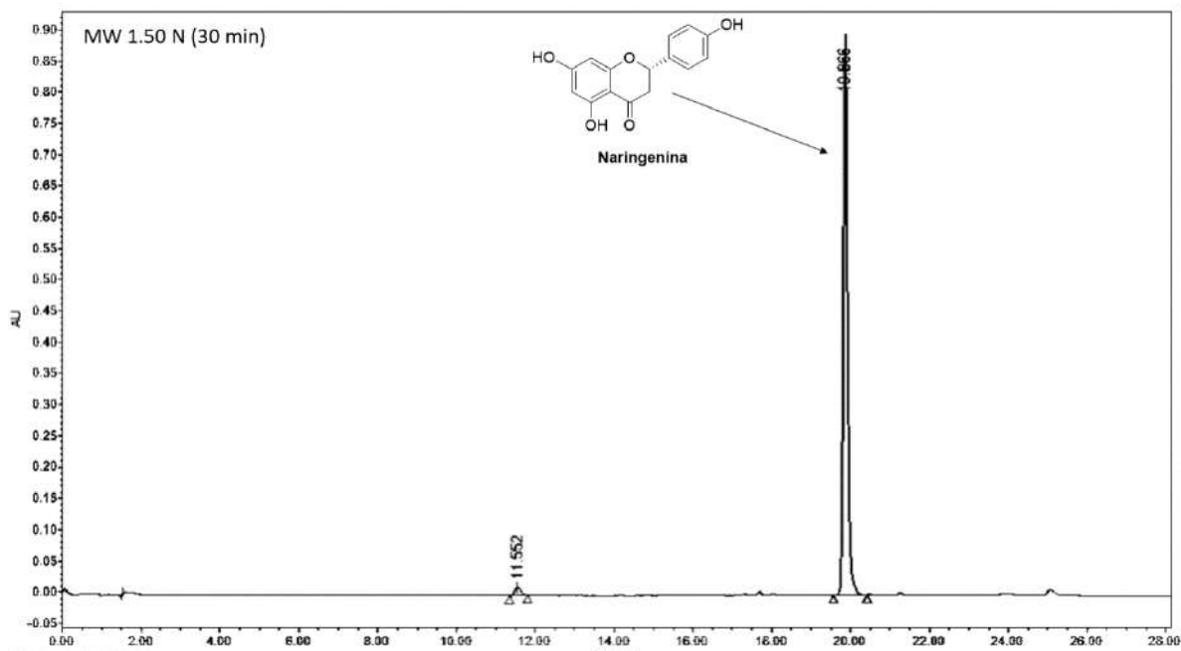


Figura A7. Cromatograma de la reacción de hidrolisis llevada a cabo en 30 minutos y con una concentración de ácido 1.5 N (Tabla 13, experimento 9).

Tabla A1. Resultados obtenidos en el análisis HPLC de la extracción asistida por microondas.

#	Área (mAU*S)	g/L	V (L)	g de albedo	g naringina / g albedo	mg/kg	mg/g	Promedio (mg/g)	Desv st
1	30506.90	2.4	0.05	6.4932	0.0189	18853	18.85	18.76	0.656
2	29473.70	2.3	0.05	6.5041	0.0181	18063	18.06		
3	31206.25	2.5	0.05	6.4939	0.0194	19365	19.36		
4	31190.70	2.5	0.05	6.5210	0.0193	19273	19.27	19.22	0.284
5	30632.10	2.5	0.05	6.5027	0.0189	18917	18.92		
6	31375.65	2.5	0.05	6.4975	0.0195	19479	19.48		
7	31280.85	2.5	0.05	6.4965	0.0194	19412	19.41	19.29	0.699
8	30300.65	2.4	0.05	6.5503	0.0185	18538	18.54		
9	32014.05	2.6	0.05	6.5066	0.0199	19920	19.92		
10	32015.25	2.6	0.05	6.4966	0.0200	19951	19.95	19.16	0.864
11	31165.25	2.5	0.05	6.5063	0.0193	19298	19.30		
12	29700.45	2.4	0.05	6.5009	0.0182	18238	18.24		
13	30836.95	2.5	0.05	6.5002	0.0191	19075	19.07	18.72	0.589
14	30827.60	2.5	0.05	6.5083	0.0190	19044	19.04		
15	29607.65	2.4	0.05	6.5478	0.0180	18040	18.04		
16	27308.90	2.1	0.05	6.5207	0.0164	16432	16.43	15.90	0.531
17	26481.30	2.1	0.05	6.4972	0.0159	15884	15.88		
18	25846.65	2.0	0.05	6.5166	0.0154	15371	15.37		
19	26208.90	2.0	0.05	6.4993	0.0157	15678	15.68	15.86	0.316
20	26179.00	2.0	0.05	6.4908	0.0157	15677	15.68		
21	26961.65	2.1	0.05	6.5019	0.0162	16225	16.22		
22	27472.80	2.2	0.05	6.5131	0.0166	16572	16.57	15.96	0.566
23	26613.55	2.1	0.05	6.5476	0.0159	15858	15.86		
24	25915.45	2.0	0.05	6.5032	0.0155	15454	15.45		
25	26712.20	2.1	0.05	6.4983	0.0161	16051	16.05	16.26	0.523
26	26586.05	2.1	0.05	6.5294	0.0159	15882	15.88		
27	27837.45	2.2	0.05	6.5048	0.0169	16860	16.86		
28	27855.75	2.2	0.05	6.4941	0.0169	16901	16.90	16.24	0.612
29	26210.95	2.0	0.05	6.4937	0.0157	15693	15.69		
30	26860.00	2.1	0.05	6.5114	0.0161	16127	16.13		

Tabla A2. Resultados obtenidos en el análisis HPLC de la extracción por reflujo.

#	Área (mAU*S)	g/L	V (L)	g de albedo	g naringina / g albedo	mg/kg	mg/g	Promedio (mg/g)	Desv st
31	35309.35	2.9	0.05	6.5029	0.0224	22350	22.35	23.35	1.517
32	35668.50	2.9	0.05	6.5054	0.0226	22605	22.61		
33	39025.95	3.3	0.05	6.4986	0.0251	25095	25.10		
34	32364.30	2.6	0.05	6.5207	0.0201	20133	20.13	20.00	0.524
35	31301.45	2.5	0.05	6.4972	0.0194	19425	19.43		
36	32776.80	2.7	0.05	6.5166	0.0204	20448	20.45		

Tabla A3. Resultados obtenidos en el análisis HPLC de la extracción asistida por ultrasonido.

#	Área (mAU*S)	g/L	V (L)	g de albedo	g naringina / g albedo	mg/kg	mg/g	Promedio (mg/g)	Desv st
37	35344.70	2.9	0.05	6.4909	0.0224	22417	22.42	22.21	0.470
38	34339.40	2.8	0.05	6.4930	0.0217	21671	21.67		
39	35566.05	2.9	0.05	6.5028	0.0225	22539	22.54		