

3



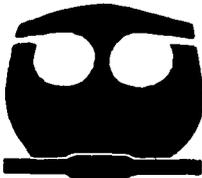
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO CROMATOGRÁFICO DE COMPUESTOS FLAVONOIDES PARA EVALUAR AUTENTICIDAD EN JUGO DE NARANJA Y TORONJA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE: QUÍMICO DE ALIMENTOS PRESENTA: ALEJANDRO A. ARANA RODRIGUEZ



MEXICO, D. F.



2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUÍMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado.**

**Presidente**

Prof. Francisca Iturbe Chinas

**Vocal**

Prof. María de los Angeles Valdivia López

**Secretario**

Prof. Marco Antonio León Felix

**1er suplente**

Prof. Juan Diego Ortiz Palma Pérez

**2do suplente**

Prof. Bertha Julieta Sandoval Guillen

**Sitio donde se desarrolló el tema.**

Laboratorio 323, conjunto "E", Facultad de Química UNAM.

**Asesor del tema:**

  
M.<sup>en C.</sup> María de los Angeles Valdivia López.

**Sustentante:**

  
Alejandro Alberto Arana Rodríguez.

## **DEDICATORIAS:**

A mis padres Alejandro y Doris por el amor y apoyo que siempre me han brindado en la realización de todos mis proyectos, de todo corazón muchas gracias, los quiero mucho.

A mis hermanos Edgar, Carlos, Marivett y mi sobrina Evelin por formar parte importante en mi vida, por el apoyo y entusiasmo que siempre me han demostrado y esperando que esto les sirva de ejemplo para que logren alcanzar sus proyectos, que aunque a veces se ve muy difícil, no es imposible.

A mi abuela Quetita por el cariño, amor y apoyo que me brinda cuando los necesito.

A mis amigos Nora, Memo, Gerardo y Paco por el apoyo y amistad incondicional que me han brindado siempre, muchas gracias.

A mis compañeros de escuela por todos esos momentos que compartimos dentro y fuera de la universidad

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mi asesora Angeles por el apoyo, confianza, consejos y facilidades para la culminación del proyecto, muchísimas gracias.

A mis profesores y amigos Fanny, Julieta, Agustín y Marco por brindarme su apoyo y conocimientos en la realización de éste proyecto.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS.</b>	<b>3</b>
<b>CAPITULO I. ANTECEDENTES.</b>	<b>4</b>
1.1    Los cítricos.	4
1.1.1    Producción de cítricos	5
1.1.2    Exportación de cítricos.	5
1.1.3    Producción de naranja y toronja en México.	7
1.1.4    Taxonomía de la naranja y la toronja.	9
1.1.5    Variedades nacionales.	10
1.1.6    Cosecha de la naranja.	10
1.1.7    Morfología del fruto.	11
1.1.9    Composición química de los cítricos.	12
1.2    Los flavonoides.	15
1.2.1    Flavonas metoxiladas.	16
1.2.2    Flavonas glucosiladas.	17
1.2.3    Extracción y aislamiento.	19
1.2.4    Absorción U.V.	19
1.3    Cromatografía de líquidos de alta resolución.	21
1.3.1    Procesos cromatográficos.	22
1.3.1.1    Cromatografía de adsorción (líquido – sólido).	22
1.3.1.2    Cromatografía de partición (líquido – líquido).	23
1.3.1.3    Cromatografía en fase normal.	24
1.3.1.4    Cromatografía en fase inversa.	25
1.3.2    Instrumentación.	26

1.3.2.1 Sistema de bombeo.	27
1.3.2.2 Columnas.	27
1.3.2.3 Detectores.	28
<b>CAPITULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.</b>	<b>30</b>
2.1 Metodología.	30
2.1.1 Obtención y extracción de la muestra.	31
2.1.2 Extracción de flavonas glucosiladas y flavonas metoxiladas.	31
2.2 Determinación de condiciones cromatográficas.	32
2.3 Determinación de barridos espectrofotométricos.	33
2.4 Tratamiento estadístico.	34
<b>CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>35</b>
3.1 Flavonas glucosiladas.	35
3.1.1 Determinación de la longitud de onda	35
3.1.2 Determinación de la composición en la fase móvil.	36
3.1.3 Evaluación de mezclas entre jugos de naranja y toronja	38
3.1.4 Cuantificación de hesperidina y naringina	40
3.2 Flavonas metoxiladas.	44
3.2.1 Determinación de la longitud de onda	44
3.2.2 Determinación de la composición en la fase móvil	47
3.2.3 Determinación de la cantidad de muestra inicial	50
3.2.4 Evaluación de muestras	51
3.3 Determinaciones espectrofotométricas.	52
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>55</b>
<b>RECOMENDACIONES.</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>58</b>

# INTRODUCCIÓN.

Información de organismos de normalización en Estados Unidos reportan que en 1990 el 30% del jugo de naranja en este país fue adulterado. Del mismo modo, en algunos países de Europa se presenta una mayor incidencia en la falsificación. El problema por supuesto no es exclusivo de estas regiones sino que afecta un gran número de países, entre ellos México, sin embargo, por el escaso esquema normativo del país, la magnitud de falsificación se desconoce.

Las especificaciones que establece la norma mexicana NMX-F-118-1984, sólo describen parámetros composicionales poco específicos ( $^{\circ}$ Bx, acidez, aceites esenciales y ácidos volátiles), por lo que se da una gran facilidad para que un producto adulterado pueda cumplir con lo establecido.

Existen varias formas de falsificar jugo de naranja, desde la adición de otros cítricos, como también de otros compuestos, tal es el caso de la sacarosa, ácidos orgánicos, colorantes y saborizantes. Otra forma muy utilizada de adulteración, consiste en la adición de lavado de pulpa (material resultante del lavado de albedo y flavedo de la naranja, después del proceso de exprimido).

De los métodos más importantes para detectar éste tipo de prácticas el más utilizado es el barrido espectrofotométrico en un extracto alcohólico, en donde se pueden apreciar los compuestos que presentan propiedades de absorber la radiación UV/Vis, como los flavonoides (Abs 280 nm), carotenos (Abs 443 nm), compuestos polifenólicos (Abs 325 nm) y el ácido ascórbico (Abs 245 nm).

Se ha establecido que en los cítricos, hay una gran variedad de compuestos naturales, los cuales se distribuyen en diferentes concentraciones a través de los tejidos del fruto, y entre estos se encuentran las flavonas metoxiladas y las glucosiladas, que son compuestos flavonoides unidos a diferentes sustituyentes; y pueden ser característicos a uno o varios frutos, tal es el caso de la hesperidina

presente en naranja, limones y algunas especies de mandarinas, y la naringina, presente principalmente en toronja. La concentración de estos compuestos se ve influenciada por factores como la variedad, época del año, prácticas de cultivo, etc.

El propósito de este estudio es establecer esquemas analíticos y perfiles composicionales que incluyen los procedimientos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) para flavonas metoxiladas y glucosiladas en jugo natural de naranja y toronja de variedades nacionales; esto permitirá conocer con precisión el perfil de estos compuestos y eventualmente ser utilizados como marcadores para coadyuvar a la evaluación en la autenticidad de productos comerciales.

## **OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL:**

- **Determinar las condiciones cromatográficas, que permita conocer los perfiles de compuestos flavonoides para coadyuvar a la formación de esquemas analíticos que puedan ser utilizados dentro del marco de normalización en la verificación de autenticidad en jugos de cítricos para diferentes variedades nacionales.**

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- **Establecer condiciones de extracción, y separación cromatográfica de flavonas glucosiladas en jugo de naranja y toronja, para determinar perfiles composicionales, así como determinar si es factible detectar adulteración entre ambos cítricos, elaborando mezclas a diferentes concentraciones.**
- **Encontrar límites de detección de jugo de toronja en naranja y viceversa.**
- **Determinar condiciones de extracción y separación cromatográfica de flavonas metoxiladas en jugo de naranja, para conocer su perfil composicional, y a partir de éste precisar si hay diferencia entre diferentes muestras de un mismo lote.**
- **Realizar barridos espectrofotométricos en jugo de naranja para detectar los diferentes compuestos presentes en éste cítrico y determinar si existe diferencia entre diferentes muestras de un mismo lote**

# CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

## 1.1 LOS CÍTRICOS.

Los cítricos son considerados como un conjunto de plantas que tuvieron su origen en las regiones tropicales y subtropicales de Asia y el archipiélago Malayo, propagándose luego en cultivo a diversas regiones del mundo. (16)

La denominación de cítricos ha sido aplicada desde tiempos lejanos a diferentes tipos de frutas. Como resultado existía mucha confusión acerca de la clasificación de estas frutas con características muy similares. Fue en 1957 cuando se sugirió llamar cítricos a aquellos de la familia de la *Rutáceae* que pertenecen a los tres géneros nombrados *Citrus Fortunela* y *Poncirus*. Las frutas de los dos últimos géneros, así como algunas especies del género *Citrus* no tienen importancia comercial, y en la actualidad, la producción mundial se basa en el cultivo y la explotación de la **naranja toronja**, mandarina, limón, lima y algunos híbridos desarrollados en los últimos años. (16)

La producción y comercialización de los cítricos como fruta fresca o de sus productos o subproductos se ha convertido en un importante renglón del comercio internacional. (16)

### 1.1.1 PRODUCCIÓN DE CÍTRICOS.

A nivel mundial los cítricos son un grupo muy importante dentro de las especies frutícolas. De los principales productores en los últimos 4 años (1997 – 2000) tenemos en primer lugar a Brasil con una producción promedio anual de 18.9 millones de toneladas, seguido de Estados Unidos con 14.2 millones de toneladas, China con 12.5 millones de toneladas, España con 5.3 millones de toneladas y México con 4.9 millones de toneladas, otorgándole el quinto lugar en producción mundial, con un 5.6% de la producción total.

En cuanto a producción de naranjas los principales países son, Brasil con un promedio anual de 17.3 millones de toneladas, Estados Unidos con 10.5 millones de toneladas, México con 3.4 millones de toneladas, España con 2.61 millones de toneladas y China con 2.3 millones de toneladas. México ocupa el tercer lugar aportando el 5.7% de la producción. (8)

Para la producción de toronja los principales países productores son Estados Unidos con un promedio anual de 2.5 millones de toneladas, Israel con 0.35 millones de toneladas, Argentina con 0.2 millones de toneladas y México con 0.18 millones de toneladas. (8)

El porcentaje de producción para cada cítrico aparece esquematizada en la tabla 1

<b>FRUTA</b>	<b>% EN EL MUNDO</b>	<b>% EN MÉXICO</b>
Naranja	66.00	97.00
Mandarina	17.00	0.65
Limonos y Limas	11.00	2.00
Toronja	6.00	0.40

Tabla 1. Porcentaje de la producción de cítricos en el mundo y en México

Por lo que se puede decir que la mayor producción de cítricos en México y en el mundo es de naranja seguido por mandarinas, limones, limas y toronja.

### **1.1.2 EXPORTACIONES DE CÍTRICOS.**

Si se tuviera que hablar de un caso exitoso de agronegocios en México en esta etapa de la globalización de los mercados, tal vez serían varios los sectores

que cumplirían con creces esta denominación; sin embargo, uno de los de mayor importancia y que ha sabido sobreponerse a condiciones internacionales a veces no tan favorables es el de los cítricos. (1)

Por ejemplo en 1999, el valor de las exportaciones de este tipo de agronegocios ascendió a los 164 millones de dólares, destacando con un 42 por ciento de este monto el limón agrio en fresco y con una tercera parte un producto con mayor valor agregado como lo es el jugo de naranja concentrado. (1)

En la figura 1 se presentan los porcentajes de exportación para los principales productos cítricos.

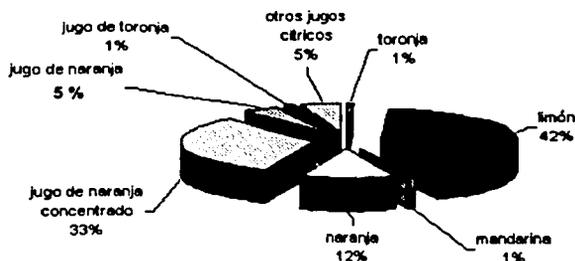


Figura 1. Exportación de cítricos frescos y procesados en 1999

Lo más destacable es que este tipo de agronegocios han podido mantener un crecimiento de sus ventas a los mercados del exterior a un ritmo de 9.8 por ciento anual durante los últimos cinco años. (1)

Asimismo es de destacarse el nivel de diversificación de mercados que ha alcanzando, disminuyendo el riesgo de depender mayoritariamente de un solo mercado como el de Estados Unidos que presenta una gran proporción de agronegocios en nuestro país. De esta manera, en la actualidad productos cítricos de origen mexicano han penetrado mercados como el de Alemania, Irlanda, Arabia Saudita, España, Japón, Austria, Suecia, Dinamarca, Italia, Holanda y China, por mencionar sólo algunos. (1)

Con la reciente firma del tratado de libre comercio con la Unión Europea e Israel las posibilidades de venta para los cítricos mexicanos se han multiplicado enormemente: la Unión Europea (UE) es el principal mercado de importación de jugo de naranja concentrado del mundo, sus compras al exterior de este producto alcanzan los mil millones de dólares anuales y nuestro país tiene un cupo de exportación de 30 mil toneladas con 75 por ciento de reducción arancelaria sobre el arancel externo de la UE; asimismo, Israel otorgó apertura total e inmediata también para el jugo de naranja concentrado congelado mexicano. (1)

Con este acceso a dichos mercados, los cítricos en México serán un área con especial atractivo para las inversiones y este tipo de agronegocios tendrá un mayor repunte para los próximos años. (1)

### **1.1.3 PRODUCCIÓN DE NARANJA Y TORONJA EN MÉXICO.**

La introducción de la naranja en México se dio en 1521, cuando las primeras huertas se establecieron en la ribera del río Coatzacoalcos y de ahí se extendió a todo el país. (2)

La producción se encuentra en las zonas tropicales, básicamente en los estados de Veracruz (que contribuye con el 43% de la producción total) y San Luis Potosí, mientras que otro importante porcentaje se distribuye en Tamaulipas, Nuevo León y Sonora, algunos de los cuales tienen vocación exportadora. (2)

Actualmente se le puede considerar a la naranja como la fruta de mayor importancia, tanto por la superficie cosechada, como la producción y consumo *percapita*, la producción de naranja representa aproximadamente el 29 % del total frutícola nacional, así como el 27 % de la superficie destinada a la fruta. (2) En la tabla 2 se presentan los resultados estadísticos de producción por estado.

<b>Estados</b>	<b>1995</b>	<b>1996</b>	<b>1997</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>
<b>Veracruz</b>	1,874,197	1,019,702	1,954,564	1,605,871	1,361,060
<b>Tamaulipas</b>	376,507	743,984	410,546	418,491	312,759
<b>S.L.P.</b>	419,397	289,881	312,703	302,864	267,373
<b>N. León</b>	253,916	258,782	349,629	224,978	164,444
<b>Sonora</b>	161,500	167,828	150,783	151,940	173,846
<b>Otros</b>	488,054	620,851	739,719	627,008	623,495
<b>Nacional</b>	3,571,571	3,100,354	3,917,942	3,331,152	2,902,977

Tabla 2. Producción de naranja a nivel estatal (toneladas).

La toronja es el producto del cruzamiento natural de naranjo dulce y pomelo, que se produjo en Barbados (Indias Occidentales). (14)

Al igual que la naranja, la toronja es producida en las zonas tropicales, el principal estado productor es Veracruz con un 67.6% del total de la producción,

Tamaulipas con 8.9%, San Luis Potosí con el 7.8%, Yucatán con el 4.6% y Oaxaca con el 3.0%. (21)

#### **1.1.4 TAXONOMÍA DE LA NARANJA Y LA TORONJA.**

**Familia:** Rutáceas.

**Género:** *Citrus*.

**Especie:** *Citrus sinensis* (naranja), y *Citrus paradisi* (toronja)

**Origen:** China e Indochina (naranja), Islas de Barbados (Toronja)

**Porte:** Reducido (6 – 10 m). Ramas poco vigorosas (casi tocan el suelo).  
Tronco corto.

**Hojas:** Limbo grande, alas pequeñas y espinas no muy acusadas.

**Flores:** Ligeramente aromáticas, solas o agrupadas con o sin hojas. Los brotes con hojas (campaneros) son los que mejor frutos dan.

**Fruto:** Es de forma predominantemente esférica, aunque algunas presentan forma alargada, su superficie es brillante y lisa, algunas especies son rugosas su color

puede variar desde el verde oscuro hasta el amarillo o naranja y las hay con o sin semillas. (13,14)

### **1.1.5 VARIEDADES NACIONALES.**

Las variedades de naranja comerciales cultivadas en México son:

*Valencia, Washington Navel, San Miguel, Pearson Brown, Criollo, Media Sangre Hamlin, Morros, Jaffa, Mediterráneo, Chabela y Pine-apple.* (21)

La variedad principal que se cultiva en México es la *valencia*, también identificada como naranja de jugo por los citricultores. Esta variedad se destaca por su cantidad y calidad de jugo, su buen comportamiento en almacén, de uso tanto para consumo en fresco como para la industria; características que la han llevado a ocupar el 80% de las tierras dedicadas su cultivo. (21)

Para la toronja las variedades que se cultivan principalmente en el territorio nacional son:

*Red blush, Mash y Ruby.*

La variedad que más se emplea en la producción de jugos es la *Red blush* por la cantidad de jugo y de sabor poco amargo.

### **1.1.6 COSECHA DE NARANJA.**

La cosecha de naranja se realiza prácticamente todo el año, el periodo de mínima cosecha abarca del mes de julio hasta agosto; de septiembre a noviembre

y de abril a junio se tiene la cosecha media y de diciembre a marzo, ocurre la máxima cosecha. (21)

### **1.1.7 MORFOLOGÍA DEL FRUTO.**

Las frutas cítricas están compuestas por diferentes partes:

**FLAVEDO:** Que es la porción colorida en la piel también llamada epicarpio, en éste se encuentran células que contienen a los carotenos, responsables del color de la fruta, también se encuentran las glándulas en donde están depositados los aceites esenciales. (7)

**ALBEDO:** También llamado mesocarpio, es la parte esponjosa de color blanco y esta formado por largas células que forman una red compleja con grandes espacios vacíos, esta parte es rica en sustancias pécticas y hemicelulosa, su grosor puede variar para los diferentes frutos. (7)

**ENDOCARPIO:** Es la porción comestible del fruto y está formado por varios segmentos, siendo 10 el número más común en la naranja, en cada segmento se encuentran las vesículas que contienen el jugo. (7)

**SEMILLAS:** Son de cubierta dura lignocelulósica, y contienen una gran cantidad de grasa. (7)

La porción entre ellos van a variar dependiendo de la variedad del cítrico. La porción comestible es el jugo y la pulpa, que son aproximadamente el 65–70 %; y pertenecientes a la parte no comestible son el albedo, flavedo y semillas que corresponde al 30–35 %. (7)

Los principales componentes anatómicos y respectivos porcentajes se presentan en la tabla 3.

COMPONENTE	PORCENTAJE
Jugo	40 – 45 %
Pulpa y bagazo	20 – 30 %
Albedo	15 – 30 %
Flavedo	8 – 10 %
Semilla	0 – 4 %

Tabla 3. Porcentajes de los componentes en los cítricos

En la figura 2 se encuentran esquematizadas las partes de un cítrico.

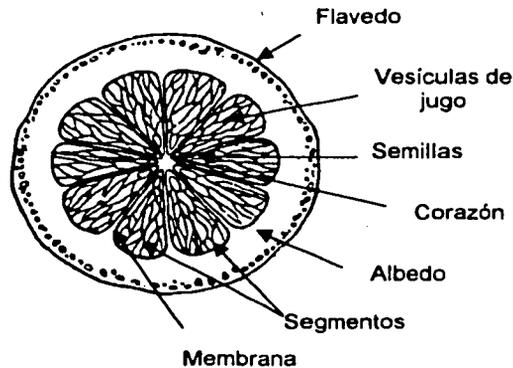


Figura 2. Partes que conforman un cítrico.

### 1.1.8 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS CÍTRICOS.

La composición química en los cítricos es influenciada por varios factores como las condiciones de crecimiento, maduración, variedad y clima. (3)

**Compuestos nitrogenados:** Éste tipo de compuestos forman entre el 0.1 y 0.2 % del total, la mayor parte del nitrógeno proviene de los aminoácidos (40 – 70%); las proteínas, el nitrógeno inorgánico y algunas bases nitrogenadas integran el resto. (3)

**Lípidos:** La mayor parte de los lípidos se encuentra en las semillas, y en cantidades menores se encuentran en la piel, vesículas y el jugo. En éste último se encuentra en porcentajes alrededor de 0.07 al 0.1%, y está formado por monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos, glicolípidos y material insaponificable. (7)

**Carbohidratos:** De los azúcares, el contenido varía dependiendo del cítrico, y va desde el 1% para limón y 9% para naranja. Se encuentran presentes la glucosa (2.4%), fructosa (2.4 %) y sacarosa (4.7 %), también existen pequeñas cantidades de galactosa.

Los cítricos contienen carbohidratos insolubles que son material estructural y consisten en celulosa y pectina, la piel es particularmente rica en éste cuyo contenido va entre el 20 y 40%. (7)

**Ácidos:** La acidez de los cítricos está dada principalmente por el ácido cítrico y málico, también se encuentran trazas de ácido tartárico, benzóico, oxálico y succínico, el contenido va a variar dependiendo del cítrico por lo que tenemos que para la naranja va de entre 0.5 al 3.5 % y para el limón del 5 al 9 %. (7).

**Enzimas:** La pectinesterasa en frutas cítricas se encuentra en grandes concentraciones en las vesículas y disminuye en el flavedo y el albedo. Ésta enzima provoca la coagulación de la materia suspendida en el jugo y la sedimentación rápida. (7)

**Aceites esenciales:** El principal constituyente es la  $\delta$ -limonina que es uno de los compuestos responsables en el sabor y el aroma de los cítricos. (7)

**Constituyentes volátiles:** Estos compuestos son asociados con el sabor y el aroma de los cuales se han encontrado 54 alcoholes, 41 aldehídos, 16 cetonas, 16 ésteres, 51 hidrocarburos, 10 ácidos. (7)

**Pigmentos:** El color está dado principalmente en naranjas y mandarinas por carotenos y xantofilas, la mayor parte de los carotenos se localizan en el flavado (alrededor del 70%) y aumenta con la maduración al mismo tiempo que se degrada la clorofila. (7)

**Vitaminas:** La principal vitamina encontrada es el ácido ascórbico o vitamina C, se encuentra en un intervalo de 0.36 a 0.6 mg/ml, a parte los cítricos contienen vitaminas del complejo B y provitamina A, estas vitaminas se encuentran principalmente alojadas en la periferia, debajo de la corteza en el espesor de la parte blanca. (7)

**Minerales:** Tienen un alto contenido de potasio (100 – 350 mg/ml) y bajo contenido en sodio (1 – 10 mg/ml). El potasio forma el 60 – 70% del total de las cenizas. La mayor porción de calcio y magnesio se encuentra combinado con la pectina. (7)

**Flavonoides:** Contienen una mezcla compleja de compuestos flavonoides, de los cuales se incluyen flavanonas, flavonas glucosiladas y flavonas metoxiladas (7), las cuales se detallan más adelante.

## 1.2 LOS FLAVONOIDES.

Los flavonoides son un grupo de sustancias que se encuentran en la naturaleza derivados de la flavona cuya estructura es:

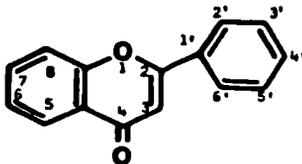


Figura 3. Estructura base de los flavonoides.

Son pigmentos normalmente de color amarillo y naranja, son resistentes a los procesos térmicos que se emplean en la manufactura de la mayoría de los alimentos (3).

En general se considera que el contenido de flavonoides en los cítricos disminuye con la maduración, esto no ha sido demostrado claramente. Huet en 1962, demostró que el contenido de flavonoides en naranjas y toronjas disminuye en cierta temporada mientras que en otra se mantiene constante (15). En otros estudios se sugirió que la disminución de la concentración de un flavonoide durante la maduración se debía a un cambio en la estructura química mas que a su degradación.

Hasta la fecha no se ha podido explicar satisfactoriamente el papel que juegan estos compuestos durante el desarrollo de los árboles cítricos, ni cuales son los factores que influyen en variaciones estructurales durante la maduración de los frutos (3), pero lo que sí se ha podido demostrar es que algunos flavonoides tienen actividad terapéutica. La actividad biológica de los flavonoides incluye su acción contra alergias, inflamaciones, radicales libres, hepatotoxinas, aglomeración de plaquetas, microorganismos, úlceras, virus y tumores; y su acción inhibitoria de

ciertas enzimas. Por ejemplo: los flavonoides bloquean la enzima de conversión de angiotensina (ECA) que causa aumento de la presión arterial; previenen la "gomosidad" de las plaquetas y por lo tanto su aglomeración; protegen el sistema vascular y fortalecen a los pequeños capilares que llevan oxígeno y otros nutrientes esenciales a todas las células. Además de todo lo anterior los flavonoides bloquean las enzimas que producen estrógeno. Los resultados de estudios llevados a cabo usando ratas, han demostrado que diosmina y hesperidina inhiben carcinogénesis por reducción de los niveles de poliaminas. (26)

Existen tres tipos de compuestos flavonoides en los cítricos: Flavanonas (incluyen 3-hidroxi flavanonas o flavanoles), las flavonas (incluyen las 3-hidroxi flavonas o flavonoles) y antocianinas. Otros flavonoides como las chalconas, las leucoantocianinas, las isoflavonas y las dihidrochalconas ya han sido detectadas pero no aisladas. (9)

### **1.2.1 FLAVONAS METOXILADAS.**

No se ha podido esclarecer la función de estas flavonas en los frutos y plantas cítricas. No obstante se ha encontrado que la nobelina muestra actividad fungística contra *Deuterophoma tracheiphila*, éste hongo provoca el "mal seco" en los árboles de cítricos como limones, naranjas y toronjas. Así mismo se ha encontrado que la Tangeritina tiene una ligera función fungística. (15)

Las flavonas encontradas en jugo de naranja se presentan a continuación en la tabla 4.

<b>Nombre</b>	<b>Estructura Química</b>
Isosinesitina	3', 4', 5, 7, 8-Pentametoxiflavona
Hexametilgosipentina	3', 4', 3, 5, 7, 8-Hexametoxiflavona
Sinensetina	3', 4', 5, 6, 7-Pentametoxiflavona
Tetrametiliscuatellareina	4', 5, 7, 8-Tetrametoxiflavona
Hexametilquercetagetina	3', 4', 3, 5, 6, 7-Hexametoxiflavona
Nobiletina	3', 4', 5, 6, 7, 8-Hexametoxiflavona
Tetrametilscuatellareina	4', 5, 6, 7, 8-Pentametoxiflavona
Heptametoxiflavona	3', 4', 3, 5, 6, 7, 8-Heptametoxiflavona
Tangeritina	4, 5, 6, 7, 8-Pentametoxiflavona
Auranetina	3, 4', 6, 7, 8-Pentametoxiflavona

Tabla 4. Flavonas metoxiladas encontradas en jugo de naranja.

### 1.2.2 FLAVONAS GLUCOSILADAS.

Son un grupo de flavonoides unidos a una o más moléculas de azúcar, en naranja y toronja se han reportado la existencia varias flavonas glucosiladas, las cuales se presentan e la tabla 5.

<b>Nombre</b>	<b>Estructura Química</b>
Narirutina	Naringenin- 7- rutinósido
Naringina	Naringenin-7-neohesperidósido
Hesperidina	Hesperetin-7-rutinósido
Neohesperidina	Hesperetin-7-neohesperidósido
Poncirina	Isosakuranetin-7-neohesperidósido
Didimina	Isisakurenin-7-rutinósido

Tabla 5. Flavonas glucosiladas en jugo de naranja y toronja.

La naranja contiene narirutina, hesperidina y didimina; la hesperidina es la flavona glucosilada que se encuentra en mayor cantidad, es insípida y después de

su hidrólisis se obtienen como productos hesperidina, ramnosa y glucosa. El C<sub>1</sub> de la ramnosa está unida al C<sub>6</sub> de la glucosa, este disacárido se conoce como rutinosa (6-ramnoglucosal). (20)

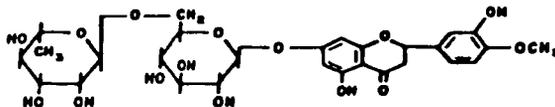


Figura 4. Estructura de la hesperidina, 7-(6-ramnosido-β-glucosido) 4'metoxi-3',5,7 trihidroxiflavona.

El contenido de hesperidina se ve influenciado dependiendo al estado de madurez y variedad de naranja. Por ejemplo, el jugo de naranja valencia de brasil contiene entre 219 – 321 ppm., mientras que para la naranja florida el intervalo de concentración se encuentra entre 335 – 351 ppm. Si la fruta es sometida a extracciones excesivas o lavado de pulpa puede aumentar su concentración a 1089 – 1200 ppm. (17,19).

En la toronja, las flavonas glucosiladas que se han encontrado son narirutina, naringina (la flavona predominante), neohesperidina, poncirina y algunas especies contienen hesperidina (11).

Los zumos que contienen niveles elevados de naringina son muy amargos y tienen poco valor económico excepto en los casos que pueden diluirse a fondo con zumos que contienen niveles de amargor bajos. El sabor amargo de la naringina se asocia con la configuración de la molécula que se forma mediante enlace 1-β-2 entre la ramnosa y la glucosa. La naringinasa es una enzima que se ha aislado de las preparaciones comerciales de pectina de cítricos y de *Aspergillus sp.*; esta enzima hidroliza el enlace 1-2 dando productos no amargos. (7).

El contenido de naringina en jugo de toronja es muy variable se dice que cuando el nivel de concentración se encuentra por arriba de 700 ppm el sabor es muy amargo, y esto ocurre cuando la fruta se somete a una excesiva extracción mecánica para tratar de obtener altos rendimientos de jugo. (7)

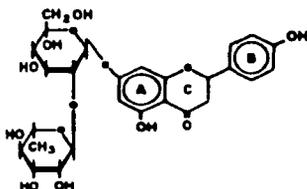


Figura 5. Estructura de la Naringina, 7-(2-ramnosido-β-glucosido) 4',5,7 trihidroxiflavona

### 1.2.3 EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO.

La extracción y aislamiento depende de en que lugar se encuentren las flavonas. En el caso de que éstos compuestos se encuentren en los aceites o ceras de la superficie, se obtienen simplemente por lavados en la superficie con un disolvente apropiado. En general se puede obtener por maceración y seguido de una extracción con algún disolvente. (12)

Los disolventes utilizados en la extracción dependen de la polaridad de la flavona. Los disolventes poco polares son particularmente utilizados para la extracción de flavonoides y agliconas, tal como isoflavonas, flavanonas, dihidroflavonas y flavonas metoxiladas y los disolventes de mayor polaridad para flavonas glucosiladas. (12)

### 1.2.4 ABSORCIÓN U.V.

La espectroscopia U.V. ha sido la técnica más usada para el análisis estructural de las flavonas por tener dos principales resonancias que en el

espectro se observa como dos puntos de máxima absorción, el primero se encuentra en el intervalo de 240-285 nm (banda II), y otro entre 300-400 nm (banda I). La absorción de la banda II es causada por el A-anillo benzoico y la banda I por el B-anillo cinamoil, (12), como se muestra en la siguiente figura:

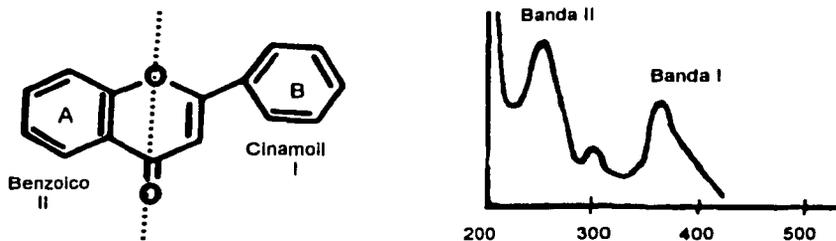


Figura 6. Absorción de Flavonas en U.V.

Mientras más sustituyentes oxigenados se encuentren en la flavona, hay una tendencia a absorber a mayores longitudes de onda. Así, en la galagina (3,5,7-Tri OH) la longitud de la banda I de absorción es de 359 nm., el kaempferol (3,4',5,7-Tetra OH) a 367 nm., la quercetina (3,3',4',5,7-Penta OH) a 370 nm. y miricetina (3,3',4',5,5',7-Hexa OH) a 374 nm. (12)

La banda II es menos afectada por la oxigenación del anillo B, aunque las 3'4' flavonas dihidroxiladas generalmente tienden a formar dos picos en esa región, mientras que las 4'-flavonas tienden únicamente a formar un sólo pico. (12).

Análisis cuantitativos de estos compuestos en el pasado dependían de la espectrofotometría, cromatografía en papel o en capa fina. Con los avances en HPLC, su adaptación para el análisis de estos compuestos puede mejorar de manera importante en cuanto al tiempo y exactitud para la identificación y cuantificación. (24)

### 1.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.

La cromatografía, de *cromatos* color y *grafía* representación o escritura, tiene su origen en las experiencias realizadas por el biólogo ruso M. Tsvet, que en 1903 consiguió separar diversos colorantes de un extracto vegetal (clorofilas y carotenos) por elución sobre un lecho de sulfato cálcico finalmente dividido, con un disolvente orgánico, éter de petróleo. El resultado obtenido fue una serie de franjas, de distinto color, en el lecho contenido en una columna de vidrio. Extrayendo el lecho o cortándolo en secciones se obtuvo la primera separación efectuada por procedimientos cromatográficos. (10)

La cromatografía de líquidos de alta resolución nace en 1959 y se desarrolla hacia finales de los 70's, el retraso inicial en el desarrollo de esta técnica analítica se debió en gran medida en la necesidad de diseñar y construir equipo especializado con bombas que fueran capaces de mantener altas presiones, sistemas de inyección que pudieran tolerar dichas condiciones y toda una nueva familia de detectores. (25)

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica de separación y cuantificación; dicha separación se da debido a diferencias en el equilibrio de distribución de los componentes de la muestra entre dos fases. Las moléculas son acarreadas por la **fase móvil** a través de las partículas del soporte o **fase estacionaria**, la velocidad de la migración depende de las interacciones que exista con la fase móvil y la fase estacionaria, por lo que las moléculas que tienen mayor interacción con la fase estacionaria permanecerán más tiempo en el sistema cromatográfico a diferencia de las moléculas que tienen mayor interacción con la fase móvil que permanecerán menos tiempo en el sistema, con lo que es lograda la separación. (4,25)

Esta técnica es muy utilizada en el área de alimentos, productos farmacéuticos, fluidos corporales y residuos del medio ambiente ya que permite analizar sustancias susceptibles a alterarse lumínica o térmicamente y permite

separaciones en general mucho más rápidas de grupos de sustancias mas dispersas desde el punto de vista funcional (10,18), además tiene una gran reproducibilidad lo que significa una mayor exactitud y precisión. El análisis cuantitativo puede realizarse con una precisión alrededor de  $\pm 0.5\%$

### 1.3.1 PROCESOS CROMATOGRÁFICOS.

Estos procesos son referidos al efecto retardante de la migración de las moléculas en la fase estacionaria.

#### 1.3.1.1 CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN (LÍQUIDO-SÓLIDO).

La fase estacionaria está constituida por partículas de un sólido con capacidad adsorbente. La separación se consigue por la competencia en los sitios activos del sólido, por parte de las moléculas de la muestra y la fase móvil. Si las moléculas están estrechamente ligados al adsorbente, entonces van a ser retenidas fuertemente por lo que no se moverán, en tanto que si las moléculas presentan una baja atracción tendrán que moverse rápidamente con la fase móvil. (10,25)

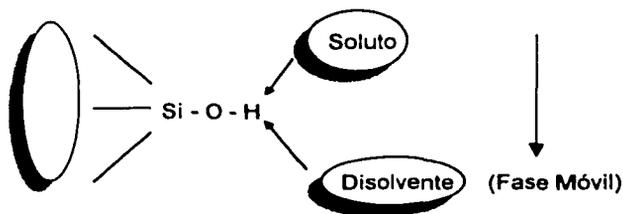


Figura 7. Representación gráfica de la cromatografía de adsorción.

La adsorción se lleva a cabo cuando en la superficie del sólido se presenta una concentración más alta de un compuesto que en el medio circundante, es un fenómeno superficial en donde son involucradas fuerzas del tipo Vander-Waals, puentes de Hidrógeno, e incluso enlaces iónicos y covalentes. (25)

Los adsorbentes mas utilizados son:

<b>Tipo de adsorbente</b>	<b>Ejemplo</b>
Adsorbentes ácidos	Silica, Florisil
Adsorbentes básicos	Alúmina, Magnesia
Adsorbentes neutros	Carbón activado

Tabla 6. Sólidos más comunes utilizados como fase estacionaria en la cromatografía de adsorción.

La sílica es uno de los adsorbentes más utilizados por considerarse como óptimo por su reactividad prácticamente nula para la mayoría de los solutos, sus isotermas de adsorción son lineales en un rango muy extenso y proporciona eficiencias muy elevadas. (10)

### **1.3.1.2 CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN (LÍQUIDO-LÍQUIDO).**

El mecanismo está basado en las diferencias de los coeficientes de reparto de las moléculas de la muestra, entre la fase estacionaria que es un disolvente depositado en un soporte sólido inerte; y la fase móvil que es un disolvente inmiscible al de la fase estacionaria. (4,25)

La fase móvil fluye a través de la columna y está en contacto con la fase estacionaria, durante este proceso el equilibrio de distribuciones del soluto entre las dos fases rápidamente toma lugar, de tal forma que cuando las moléculas de la

muestra son más solubles en la fase móvil menor será la retención y eluirán de la columna en menores tiempos. (4,25)

### 1.3.1.3 CROMATOGRAFIA EN FASE NORMAL.

Se le llama así ya que este tipo de técnica conserva las características que dieron origen a la cromatografía, en donde la fase estacionaria es más polar que la fase móvil. (25)

Cuando la fase estacionaria es un adsorbente sólido polar y la fase móvil un eluyente no polar, el proceso es conocido como "adsorción en fase normal", y si la fase estacionaria es formada por un líquido polar sobre un sólido inactivo con una fase móvil menos polar se le conoce como "partición en fase normal". (25)

El disolvente más utilizado es el hexano, dado a que reúne características de mínima polaridad, y ésta puede ser modificada por la adición de un disolvente más polar, de entre los cuales tenemos:

DISOLVENTE	POLARIDAD (E)	VISCOSIDAD
Hexano	0.00	-
Ciclohexano	0.04	1.00
Cloroformo	0.40	0.57
Tetrahidrofurano (THF)	0.45	-
Dioxano	0.56	1.54
Isopropanol	0.82	1.30

Tabla 7. Diferentes disolventes utilizados en la cromatografía en fase normal.

En estas separaciones mientras más polar sea el soluto, presentará mayor interacción con la fase estacionaria por lo que su tiempo de retención será mayor.

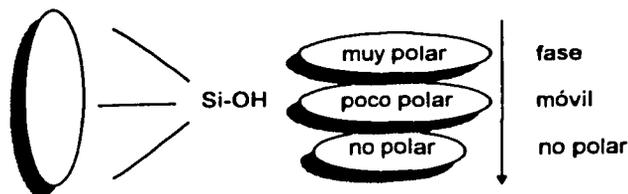


Figura 8. Representación esquemática de una separación en fase normal.

### 1.3.1.4 CROMATOGRAFÍA EN FASE INVERSA.

Este mecanismo recibe su nombre ya que la polaridad de las fases está invertida, la fase estacionaria está formada por un adsorbente sólido no polar que es el caso de la "adsorción en fase inversa" o por un líquido no polar unido a un sólido inactivo conocido como "partición en fase inversa", en ambos casos la fase móvil es un disolvente polar. (25)

Como disolvente polar, el más utilizado es el agua por ser el más cómodo y fácil de manipular, siendo transparente en toda la gama UV-Vis., debe estar destilada, desionizada y filtrada antes de ser utilizada (filtro de 0.45 micras). La polaridad puede ser modificada por la adición de disolventes menos polares, siempre y cuando ambos sean miscibles (10), los más comúnmente utilizados se presentan en la tabla 8:

DISOLVENTE	POLARIDAD (E)	VISCOSIDAD
Agua	1.00	1.00
Metanol	0.95	0.60
Acetonitrilo (ACN)	0.65	0.37

Tabla 8. Diferentes disolventes utilizados en la cromatografía en fase inversa.

La fase estacionaria está formada por grupos activos: dimetil, octil (-C<sub>8</sub>) u octadecil (-C<sub>18</sub>), unidos químicamente a la superficie de sílica.

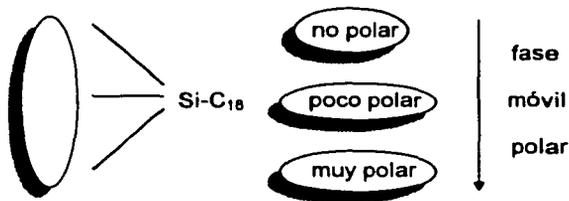


Figura 9. Representación esquemática de una separación en fase inversa

### 1.3.2 INSTRUMENTACIÓN.

La instrumentación básica se encuentra esquematizada en la figura 10. El sistema de bombeo impulsa la fase móvil a través de la columna en la que se separan los componentes de la muestra que han sido inyectados, posteriormente, los componentes son detectados y la respuesta es registrada. (5)

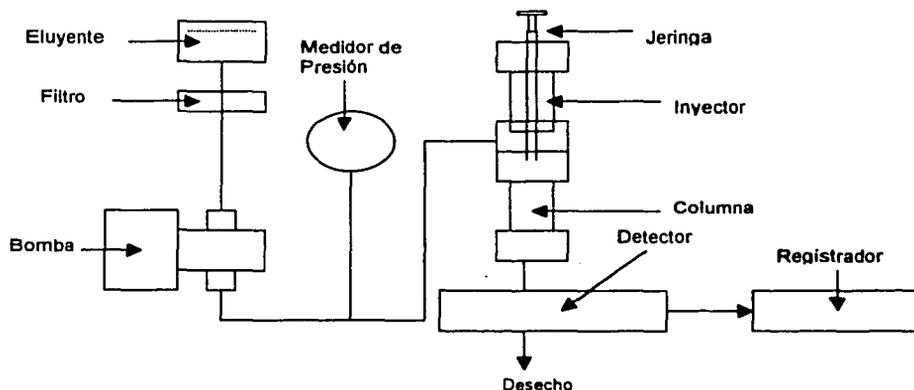


Figura 10. Principales componentes de un sistema de HPLC.

### **1.3.2.1 SISTEMA DE BOMBEO.**

Es un instrumento que sirve para impulsar la fase móvil a través del sistema cromatográfico, la cual puede estar compuesta por una o por más sustancias, cuando esta fase no cambia en su composición a través del tiempo se le llama operación isocrática, y si la composición cambia conforme pasa el tiempo se le conoce como operación en gradiente. (4,25)

Las bombas deben de estar construidas con un material inerte a la fase móvil, poder trabajar a presiones elevadas y suministrar flujos adecuados al diámetro de la columna empleada y libres de pulsaciones para no disminuir la sensibilidad de la detección. Existen dos tipos, las *neumáticas* y *eléctricas*, dependiendo del origen de la fuerza motriz utilizada, las más comunes son las eléctricas. (5)

### **1.3.2.2 COLUMNAS.**

Son la parte más importante del sistema cromatográfico ya que ahí es en donde se realiza la separación. El éxito o fracaso de un análisis depende principalmente de la elección de la columna y de las condiciones apropiadas de operación.

Las columnas son generalmente de acero inoxidable, y los empaques (fase estacionaria) depende del tipo de cromatografía que se desarrolle (fase normal, fase inversa, etc.). (4,25)

Un parámetro generalmente elegido para clasificarlas es su diámetro interno ( $d_c$ ).

1. Columnas preparativas ( $d_c > 10$  mm)
2. Columnas semipreparativas ( $5$  mm  $< d_c < 10$  mm)

3. Columnas analíticas ( $2 \text{ mm} < d_c < 5 \text{ mm}$ )

4. Microcolumnas, que engloban:

a) Columnas de pequeño diámetro ( $0.5 \text{ mm} < d_c < 2 \text{ mm}$ )

b) Columnas capilares rellenas, en las que el relleno se encuentra en el interior de un tubo de sílice fundida de  $d_c$  0.5 mm, generalmente entre 40 y  $400 \mu\text{m}$ .

c) Columnas capilares abiertas, cuya estructura es similar a las columnas capilares empleadas en cromatografía de gases, con una capa de fase estacionaria depositada sobre la pared interior de un capilar de sílice fundida diámetro interno entre 3 y  $10 \mu\text{m}$ . (5)

Las columnas más utilizadas son las analíticas.

### 1.3.2.3 DETECTORES.

Los detectores sirven para monitorear los componentes que van saliendo de la columna, y éstos son registrados y analizados por un sistema de datos o integradores.

Los detectores se dividen en:

-UNIVERSALES: Miden alguna propiedad física del eluyente y la muestra (constante dieléctrica o índice de refracción).

-ESPECÍFICOS: Miden alguna propiedad física o química que es característica para cada soluto. (detectores UV-Vis, Fluorómetros, de Flama de ionización, etc...).

Los datos son desplegados por el registrador al cual se le llama cromatograma como el que se muestra en la figura 11.

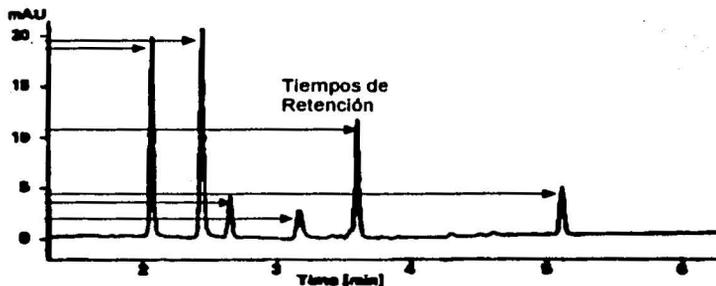


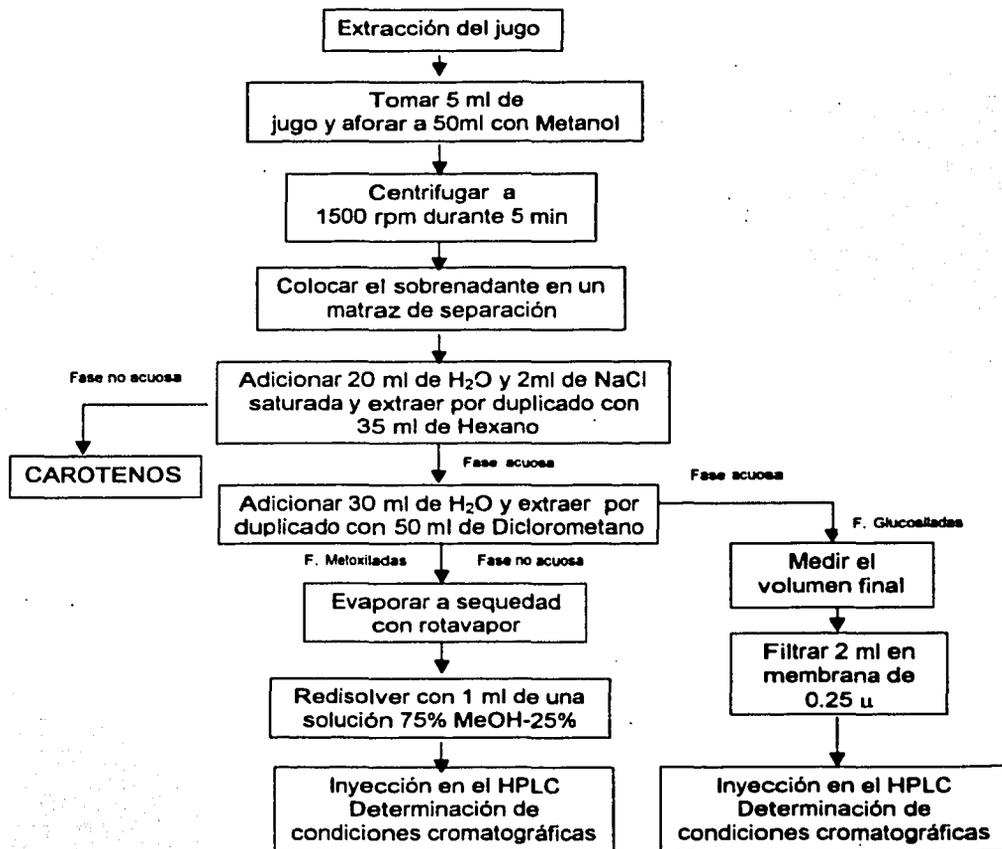
Figura 11. Esquema de un cromatograma

De aquí se obtienen datos como el tiempo de retención, que es el tiempo transcurrido desde que se inyectó la muestra hasta que aparece la señal, la resolución que es la medida de la capacidad que tiene una columna en separar dos picos adyacentes, los compuestos que se van detectando aparecen en forma de picos cuya área puede ser utilizada para cuantificar los compuestos.

## CAPITULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 METODOLOGÍA.

En el esquema 1 se presenta en forma resumida la metodología para la extracción de los compuestos flavonoides.



Esquema 1.

### **2.1.1 OBTENCIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA**

Las muestras de naranja fueron adquiridas en un mercado del Estado de México, cuya variedad es *valencia*, su estado de madurez es homogéneo y fueron compradas en el mes de Abril. Las muestras de toronja roja fueron compradas en el mes de Mayo, la variedad es desconocida y su estado de madurez homogéneo.

Se procede a lavar las muestras, una vez limpias y secas, se parten con un cuchillo y se extrae el jugo.

La obtención del jugo fue realizada con un extractor semiautomático Moulinex, para lo cual se procedió a extraer el jugo de naranja, dicha operación fue exhaustiva para poder obtener la mayor cantidad de flavonas, el jugo obtenido se filtró con una coladera y se almacenó en un frasco de plástico en congelación. Esta operación se realizó por triplicado.

El mismo procedimiento fue efectuado para la obtención y almacenamiento del jugo de toronja.

### **2.1.2 EXTRACCIÓN DE FLAVONAS GLUCOSILADAS Y FLAVONAS METOXILADAS.**

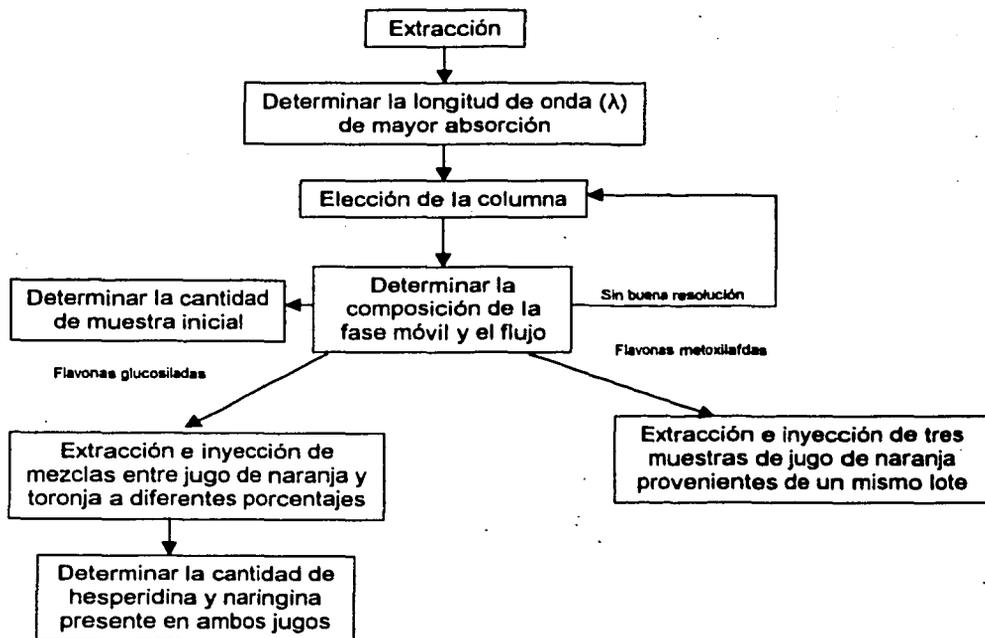
La extracción de los compuestos flavonoides, está basada en el trabajo desarrollado por García A. P. (9). El principio para la separación de estos, es su polaridad.

Siguiendo el esquema 1, se tiene que la dilución con metanol ayuda a precipitar las pectinas para posterior separación por medio de una centrifugación. La adición de agua en el sobrenadante, facilita la separación entre los carotenos de las flavonas metoxiladas y las flavonas glucosiladas.

La extracción con hexano es para separar los carotenos del medio; una vez aislados, se adicionan 30 ml de agua, con el objeto de aumentar la polaridad del medio y facilitar la separación entre los compuestos flavonoides. Se agrega 50 ml de diclorometano por duplicado para extraer las flavonas metoxiladas, por lo que en el medio quedan las flavonas glucosiladas.

## 2.2 DETERMINACIÓN DE CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

En el esquema 2 se describen los pasos a seguir para la determinar las condiciones cromatográficas:



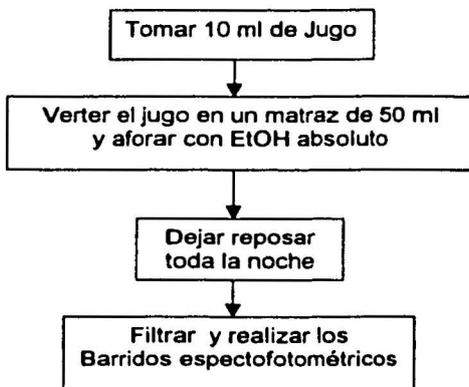
Esquema 2.

El equipo utilizado para determinaciones cromatográficas es:

- Cromatógrafo de líquidos de alta presión, Beckman System Gold  
Programable Solvent Module 126.  
Programable Detector Module 166. Detector UV/Vis.  
Made in U. S. A.

### 2.3 DETERMINACIÓN DE BARRIDOS ESPECTOFOTOMÉTRICOS.

En el esquema 3, se presenta la metodología general para determinar los barridos espectrofotométricos.



Esquema 3.

El equipo utilizado para los barridos espectrofotométricos es:

- Espectrofotómetro UV/Vis. Beckman DU-65.  
Celdas de cuarzo.  
Velocidad de barrido 500 nm/min.  
El intervalo de barrido es entre 200 – 600 nm.

## 2.4 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

Para el tratamiento estadístico se utilizó el coeficiente de variación, que es el cociente entre la desviación tipo de una distribución de datos y su media aritmética y el resultado se presenta en porcentaje, se trata de un índice de dispersión utilizado para la comparación de dos o más variables. (11)

El coeficiente de variación (V), de Karl Pearson, viene dado por la fórmula siguiente:

$$V = \sigma / X$$

En donde:

V = coeficiente de variación

$\sigma$  = desviación tipo

X = media aritmética de la distribución.

## CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Este proyecto consta de tres partes fundamentales, por lo que los resultados y su discusión, se presentan en el siguiente orden, flavonas glucosiladas, flavonas metoxiladas y barridos espectrofotométricos.

### 3.1 FLAVONAS GLUCOSILADAS.

Para la realización de estas determinaciones se contó con estándares de naringina y hesperidina.

#### 3.1.1 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA.

Se realizaron barridos espectrofotométricos para la hesperidina, naringina y la fracción de flavonas glucosiladas cuyos resultados se presentan en la tabla 9.

	$\lambda_1$	Abs <sub>1</sub>	$\lambda_2$	Abs <sub>2</sub>
Flavonas glucosiladas	283.0	0.384	325.5	0.217
	283.1	0.383	324.0	0.219
Naringina	284.0	0.548	327.5	0.120
	283.0	0.551	327.5	0.126
Hesperidina	284.5	0.766	327.5	0.164
	284.5	0.767	327.5	0.167
<b>Promedio</b>	<b>283.68</b>		<b>326.58</b>	
Desviación	0.671		1.366	
<b>% C.V.</b>	<b>0.236</b>		<b>0.418</b>	

Tabla 9.  $\lambda$  de máxima absorbancia resultantes de los barridos espectrofotométricos para hesperidina, naringina y fracción de flavonas glucosiladas provenientes de jugo de naranja.

Aparecen 2 longitudes de onda de máxima absorción, una a 283.68 nm correspondiente a la resonancia del anillo benzoico y la segunda a 326.58 nm que corresponde al anillo cinamoil, los coeficientes de variación son muy pequeños por lo que no representan diferencia significativa entre estas longitudes, para los resultados de absorbancia no se calcularon los resultados estadísticos ya que las concentraciones no son conocidas por lo que los resultados son muy variados.

Para las determinaciones cromatográficas, el detector se fijó a 325 nm, tomando en cuenta que la fracción de flavonas glucosiladas no nadamas cuenta con hesperidina y naringina, sino también con otros compuestos flavonoides de éste tipo.

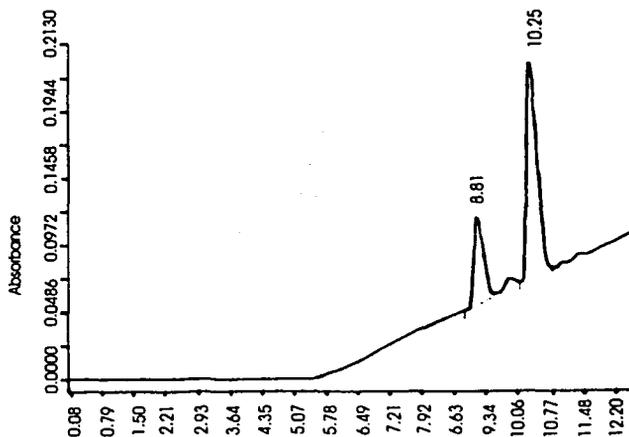
### **3.1.2 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN EN LA FASE MÓVIL.**

Para establecer la fase móvil en la cual se obtuviera la mejor resolución, se realizó un experimento el cual consistió en la utilización de la columna  $\mu$ bondapack C<sub>18</sub> 3.9 x 300 mm con un tamaño de partícula de 10  $\mu$ m, y una fase móvil binaria entre ACN - H<sub>2</sub>O a diferentes porcentajes y un flujo de 1.8 ml/min, inyectándose una mezcla de los estándares de hesperidina y naringina.

No lográndose la separación se cambió la columna por otra con un tamaño de partícula menor para aumentar la eficiencia en la separación, por lo que se seleccionó una Beckman C<sub>18</sub> 4.6 x 250 mm de 5  $\mu$ m de tamaño en partícula, el flujo tuvo que ser disminuido a 0.8 ml/min ya que la presión en el sistema se dispara por arriba de éste. Se siguieron las pruebas con ACN - H<sub>2</sub>O, lográndose una pequeña separación entre los picos.

Se decidió cambiar de fase móvil sustituyendo el ACN por tetrahidrofurano (THF), que es un disolvente menos polar.

A diferentes porcentajes de THF y H<sub>2</sub>O, no se logró tener la separación de los picos (aunque la separación fue mayor que la obtenida con ACN), por lo que se aplicó la fase móvil en gradiente, ya que permite una mejor separación, y aunque las flavonas glucosiladas sean de polaridad muy parecida, los cambios en ésta conforme pasa el tiempo permiten que la interacción de los compuestos flavonoides con la fase estacionaria y la fase móvil sea más selectiva. La separación se logró partiendo de un porcentaje de H<sub>2</sub>O 80% - THF 20% a H<sub>2</sub>O 50% - THF 50% en 10 minutos. El cromatograma resultante es el siguiente.



Cromatograma 1. Estándar hesperidina y naringina

Se pueden apreciar 3 picos, de los cuales dos son de mayor tamaño apareciendo el primero a 8.81 min y el segundo a 10.25 min. Se inyectaron por separado los estándares para determinar que pico corresponde a cada flavona, los resultados aparecen en la tabla 10.

Respuesta	Estándar hesperidina	Estándar naringina
Area <sub>prom.</sub>	45.432	68.585
TR <sub>prom.</sub>	8.76	10.29

Tabla 10. Resultados cromatográficos expresados en áreas y tiempos de retención entre la mezcla con los estándares de hesperidina y naringina.

Por lo que podemos decir que el pico a los 8.76 min corresponde a hesperidina y el de los 10.29 min corresponde a naringina.

### 3.1.3 EVALUACIÓN DE MEZCLAS ENTRE JUGOS DE NARANJA Y TORONJA.

Una vez conocidas las condiciones cromatográficas, se procedió a determinar los perfiles cromatográficos entre mezclas de jugo de naranja y toronja para determinar la posibilidad de determinar adulteración entre ambos jugos.

Se efectuaron mezclas a diferentes porcentajes tomando en cuenta que la hesperidina es una flavona característica en naranja y la naringina en toronja. Se partió de 100% jugo de naranja hasta 0 % que corresponde un 100% de jugo de toronja, la extracción de las muestras se realizaron por triplicado. En la tabla 11 aparecen los resultados.

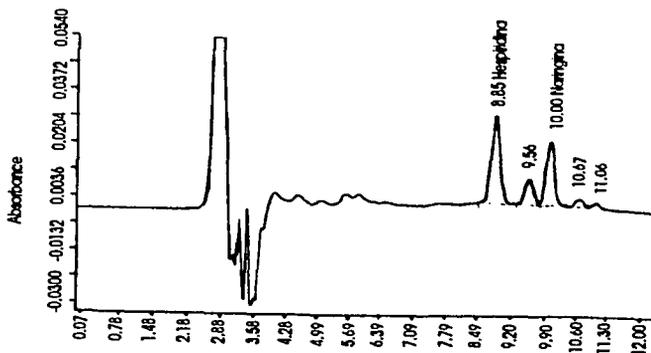
En esta prueba realizada, a partir de un 5% de jugo de toronja, se puede observar detección de naringina, lo mismo ocurre con un 5% de jugo de naranja ya que la detección de hesperidina, aunque muy pequeña, es evidente. Conforme va cambiando la composición se puede apreciar que el área de los picos va cambiando con relación a los porcentajes, esto es indicativo de la posibilidad de detectar cantidades de jugo de las variedades estudiadas, en una posible adulteración.

% Naranja	% Toronja	Área prom hesperidina	Desv. hesp.	%C.V. hesp.	Área prom naringina	Desv. narin.	%C.V. narin.
100	0	6.910	0.045	0.651	-	-	-
95	5	6.513	0.020	0.307	1.213	0.026	2.143
90	10	6.030	0.057	0.945	2.046	0.083	4.056
80	20	5.580	0.042	0.752	4.396	0.194	4.413
60	40	4.183	0.025	0.597	9.010	0.096	1.065
40	60	2.826	0.094	3.326	13.351	0.188	1.408
20	80	1.446	0.045	3.112	17.683	0.130	0.735
10	90	0.746	0.049	6.568	19.960	0.102	0.511
5	95	0.303	0.041	13.53	21.253	0.057	0.268
0	100	-	-	-	22.310	0.442	1.981

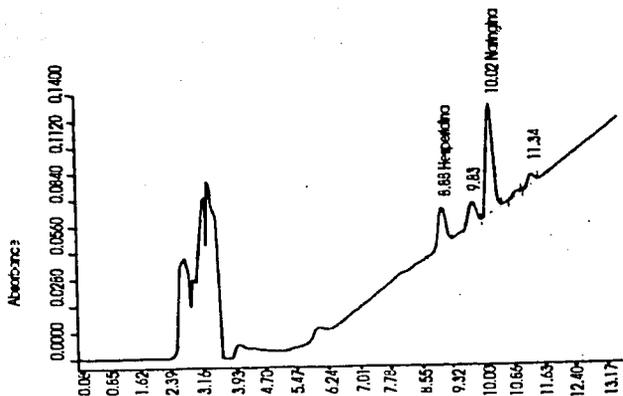
Tabla 11. Resultados estadísticos de las áreas de hesperidina y naringina, en las mezclas a diferentes porcentajes entre jugos de naranja y toronja

En general los coeficientes de variación para las áreas son pequeños, lo que indica la confiabilidad del equipo para ésta prueba, aunque, éste resultado para la hesperidina a 5% jugo de naranja esta por arriba de 10, debido a que las áreas detectadas son muy pequeñas, a diferencia del obtenido en la mezcla con 5% jugo de toronja ya que la detección del área de naringina es mayor.

En los cromatogramas 2 y 3, presentan dos de los cromatogramas resultantes a distintas concentraciones entre ambos jugos.



Cromatograma 2. Perfil cromatográfico de flavonas glucosiladas con 80% jugo de naranja y 20% jugo de toronja



Cromatograma 3. Perfil cromatográfico de flavonas glucosiladas con 40% jugo de naranja y 60% jugo de toronja

### 3.1.4 CUANTIFICACIÓN DE HESPERIDINA Y NARINGINA.

Para cuantificar la concentración de hesperidina y naringina en los jugos, se realizó una curva patrón con los estándares, esta determinación se realizó por triplicado y los resultados son los siguientes:

Resultados correspondientes a la curva patrón de naringina.

Concentración	Área prom	Desv.	%CV
0.01 mg/ml	1.829	0.201	10.989
0.05 mg/ml	8.724	0.513	5.880
0.10 mg/ml	16.657	0.839	5.036
0.15 mg/ml	25.332	0.635	2.506
0.20 mg/ml	32.768	1.147	3.500

Tabla 12. Curva patrón de naringina

Los datos de la regresión son los siguientes:

Ordenada =  $-1.399 \times 10^{-3}$

Pendiente =  $6.076 \times 10^{-3}$

Correlación = 0.99974

Resultados correspondientes para la curva patrón de hesperidina.

El estándar de hesperidina con el que se contaba, tiene una pureza de aproximadamente 88.13%

Concentración	Concentración real	Área prom	Desv.	%CV
0.01 mg/ml	0.0088 mg/ml	1.973	0.086	4.350
0.02 mg/ml	0.0176 mg/ml	3.248	0.130	4.000
0.05 mg/ml	0.0440 mg/ml	7.939	0.257	3.237
0.08 mg/ml	0.0705 mg/ml	11.777	0.137	1.163
0.10 mg/ml	0.0881 mg/ml	15.402	0.851	5.525

Tabla 13. Curva patrón de hesperidina

Los datos de la regresión son los siguientes:

Ordenada =  $-2.345 \times 10^{-3}$

Pendiente =  $5.967 \times 10^{-3}$

Correlación = 0.99884

Tomando en cuenta estos datos, tenemos que la concentración de hesperidina y naringina en las mezclas se presentan en la tabla 14.

% Naranja	% Toronja	Conc. Hesperidina mg/ml	Conc. Naringina mg/ml
100	0	0.038	-
95	5	0.036	0.006
90	10	0.033	0.011
80	20	0.0309	0.025
60	40	0.0226	0.053
40	60	0.014	0.079
20	80	0.006	0.106
10	90	0.002	0.119
5	95	0.0005	0.127
0	100	-	0.134

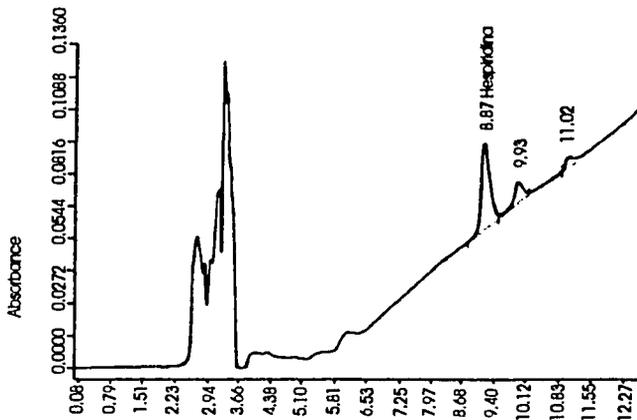
Tabla 14. Concentración de hesperidina y naringina a diferentes porcentajes de jugo de naranja y toronja

Tomando en cuenta estos resultados tenemos que la concentración de hesperidina en jugo de naranja es de **351.8 ppm**, y la concentración de naringina en el jugo de toronja estudiado es de **1247.3 ppm**

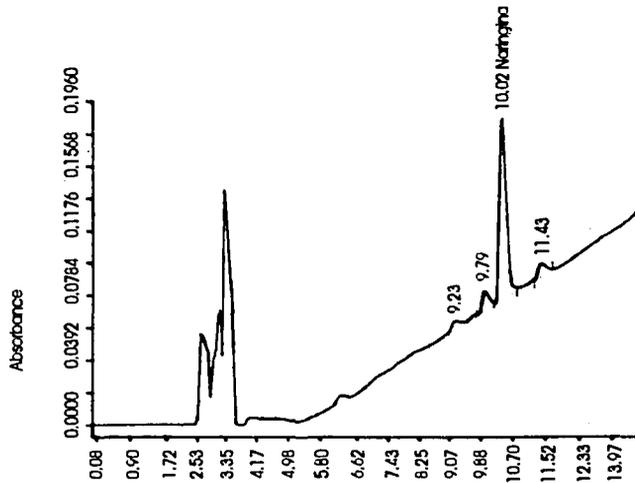
En la bibliografía (19) se menciona que el contenido de hesperidina en variedades de naranja valencia del Brasil es entre 219 y 321 ppm, de acuerdo a los resultados obtenidos en la determinación, está un poco por encima del intervalo. El contenido de naringina para jugo de toronja, se menciona que esta cerca de 700 ppm, y que más haya de esta cantidad provoca un sabor muy amargo (20), la cantidad detectada en las muestras es muy elevado.

Estos resultados no concuerdan con los reportados, y puede ser debido a factores como la variedad, estado de madurez, lugar de procedencia del fruto, prácticas de cultivo; así como la forma de realizar la extracción, recordando que la extracción fue exhaustiva, por lo que los flavonoides que se encuentran en el albedo seguramente fueron arrastrados hacia el jugo.

Los cromatogramas 4 y 5 son los obtenidos para los jugo de naranja y toronja al 100 %.



Cromatograma 4. Perfil cromatográfico de flavonas glucosiladas en jugo de naranja



Cromatograma 5. Perfil cromatográfico de flavonas glucosiladas en jugo de toronja

En la bibliografía (19) se hace mención de mención de 3 flavonas glucosiladas encontradas en el jugo de naranja y son: narirutina, hesperidina y didimina, que al parecer concuerdan con las encontradas en las determinaciones.

En el jugo de toronja, la bibliografía (17), se menciona la presencia de 4 flavonas glucosiladas: narirutina, naringina, neohesperidina, poncirina (también puede tener hesperidina), que corresponden al número encontrado en el trabajo realizado en éste estudio. En este caso no hay evidencia de hesperidina.

En ambos jugos hay una flavona en común, la **narirutina**. En los cromatogramas 4 y 5, la segunda flavona cuyos tiempos de retención son a los 9.93 y 9.79 min respectivamente, podrían tratarse de este compuesto flavonoide; esto también se puede observar en los cromatogramas 2 y 3, ya que en vez de aparecer dos picos en éste intervalo de tiempo como debería de esperarse, solo un pico es el que se observa.

### **3.2 FLAVONAS METOXILADAS.**

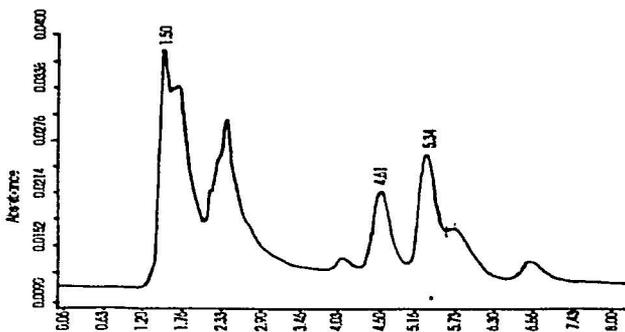
Para ésta determinación no se contó con estándares de éstos compuestos.

#### **3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA.**

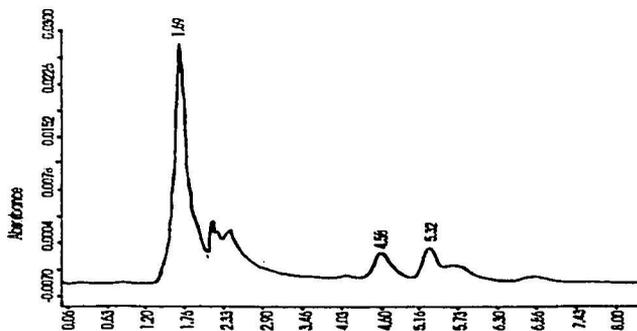
Con el objeto de encontrar la  $\lambda$  en que se presenta la mayor señal por parte de estos compuestos, las longitudes de onda con las cuales se ensayó son las mencionadas en el trabajo de Sendra J. M. (22), el cual se proponen 320 nm, 335 nm y 345 nm. Estas  $\lambda$  se eligieron ya que las flavonas metoxiladas en el jugo de naranja encontradas por dicho autor son 10, y son reportados los barridos de absorción de cada flavona, encontrando estas tres  $\lambda$  como puntos de referencia.

Para esta determinación se mantuvo constante el flujo 1.8 ml/min, al igual que la composición de la fase móvil a H<sub>2</sub>O 60% - ACN 40% (24) y la columna  $\mu$ bondapack C<sub>18</sub> 3.9 x 300 mm. Las muestras se analizaron por duplicado.

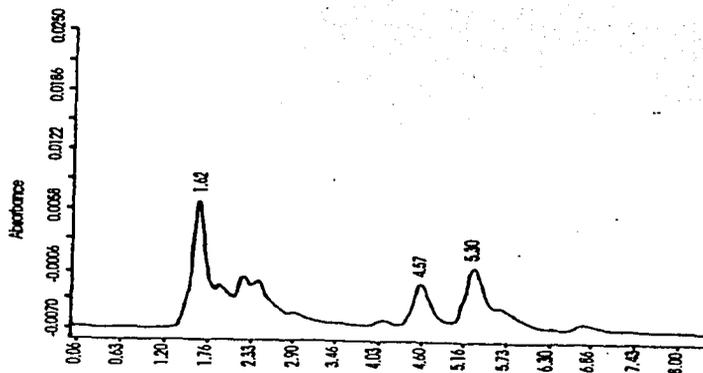
En los cromatogramas 6, 7 y 8 aparecen los resultados obtenidos.



Cromatograma 6. Perfil cromatográfico de FM en jugo de naranja a una longitud de onda de 320 nm



Cromatograma 7. Perfil cromatográfico de FM en jugo de naranja a una longitud de onda de 335 nm.



Cromatograma 8. Perfil cromatográfico de FM en jugo de naranja a una longitud de onda de 345 nm

Se puede observar, la presencia de 8 picos, dentro de los cuales se consideran los importantes el 1, 5 y 6, ya que presentan una mayor absorción y resolución que los demás, por lo que son idóneos para hacer comparación entre ellos y determinar la  $\lambda$ , los resultados aparecen en la tabla 15.

$\lambda$	ABSORBANCIA PROMEDIO		
	Pico 1 (Tr <sub>prom</sub> 1.53 min)	Pico 5 (Tr <sub>prom</sub> 4.54 min)	Pico 6 (Tr <sub>prom</sub> 5.31 min)
320 nm	0.0275	0.0111	0.0171
335 nm	0.0335	0.0050	0.0055
345 nm	0.0137	0.0050	0.0072

Tabla 15. Respuestas en absorbancia de los picos 1, 5, 6 a diferentes longitudes de onda para determinación de flavonas metoxiladas.

En general se puede observar que a una  $\lambda$  de 320 nm, los picos 5 y 6 presenta una mayor absorción, y no nadamas en éstos, sino también en las

demás señales. Tomando esto como referencia, se analizarán las demás longitudes de onda.

A una  $\lambda$  de 335 nm, el primer pico presenta una mayor detección a diferencia de los picos 5 y 6 que hay una disminución de aproximadamente el 80%.

En cuanto a la  $\lambda$  de 345 nm, la disminución de las señales se presenta en los tres picos, siendo de aproximadamente el 50 % para el primero, y del 80 % para los otros dos.

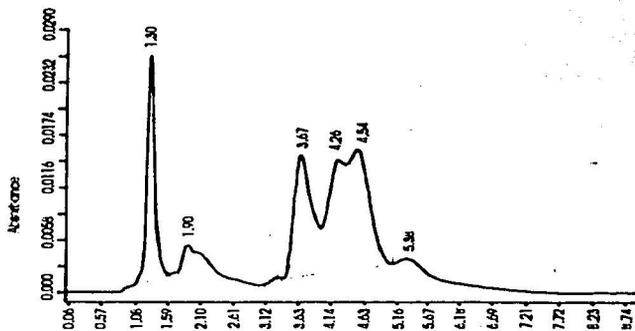
Esto indica que la mayoría de las flavonas metoxiladas que se van a estudiar, su  $\lambda$  de máxima absorción cae en los 320 nm, en las demás longitudes de onda si aparecen respuestas pero con mucho menor intensidad.

### **3.2.2 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN EN LA FASE MÓVIL.**

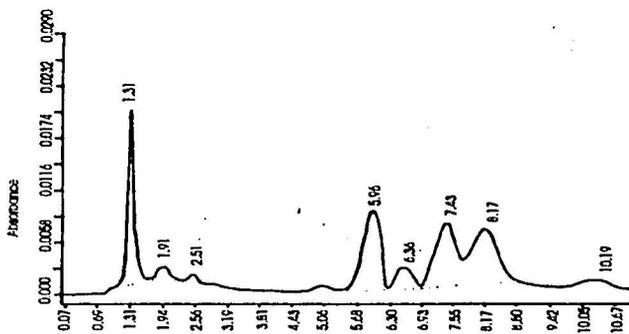
Se realizaron pruebas manejando diferentes porcentajes de H<sub>2</sub>O – ACN ya que estos disolventes son miscibles entre sí, y permiten el manejo fácil para el cambio de la polaridad en la fase.

Para esta prueba se parte de una fase móvil cuya composición es de H<sub>2</sub>O 60 % – ACN 40%, se redujo el flujo a 1.5 ml/min para dejar que exista una mayor interacción entre las flavonas y la fase estacionaria, el detector a una  $\lambda$  de 320 nm y la columna  $\mu$ bondapack C<sub>18</sub> 3.9 x 300 mm con tamaño de partícula de 10  $\mu$ m, las muestras se analizaron por duplicado.

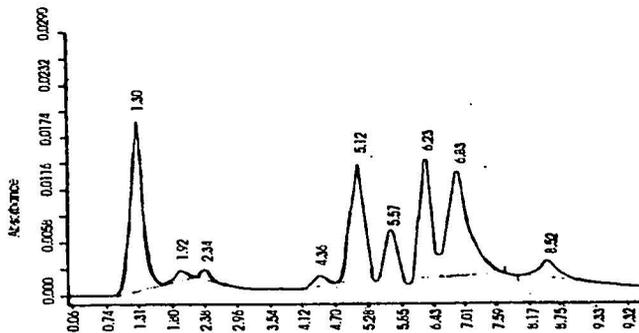
En los cromatogramas 9, 10 y 11 aparecen los resultados:



Cromatograma 9. Perfil cromatográfico de FM en jugo de naranja a una fase móvil de H<sub>2</sub>O 60% - ACN 40%



Cromatograma 10. Perfil cromatográfico de FM en jugo de naranja a una fase móvil de H<sub>2</sub>O 67% - ACN 33%



Cromatograma 11. Perfil cromatográfico de FM en jugo de naranja a una fase móvil de H<sub>2</sub>O 85% - ACN 35%

Cuando se empleó una composición de fase a H<sub>2</sub>O 60% - ACN 40% se resuelven en total 6 picos, para H<sub>2</sub>O 65% - ACN 35% 9 picos al igual que a H<sub>2</sub>O 67% - ACN 33%. Los resultados se presentan en las tablas 16, 17 y 18.

Fase móvil	Respuesta	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6
H <sub>2</sub> O 60%	Abs <sub>prom</sub>	0.0250	0.0045	0.0140	0.0130	0.0150	0.0350
ACN 40%	TR <sub>prom</sub>	1.29	1.89	3.63	4.22	4.48	4.34

Tabla 16. Respuestas cromatográficas en absorbancia y tiempos de retención para flavonas metoxiladas en jugo de naranja, con una composición de fase móvil de H<sub>2</sub>O 60% - ACN 40%

Fase móvil	Respuesta	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6	Pico 7	Pico 8	Pico 9
H <sub>2</sub> O 65%	Abs <sub>prom</sub>	0.024	0.004	0.003	0.002	0.013	0.0045	0.012	0.0105	0.003
ACN 35%	TR <sub>prom</sub>	1.30	1.92	2.34	4.36	5.12	5.57	6.23	6.83	8.52

Tabla 17. Respuestas cromatográficas en absorbancia y tiempos de retención para flavonas metoxiladas en jugo de naranja, con una composición en fase móvil de H<sub>2</sub>O 65% - ACN 35%

Fase móvil	Respuesta	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6	Pico 7	Pico 8	Pico 9
H <sub>2</sub> O 67%	Abs <sub>prom</sub>	0.0215	0.0025	0.002	0.001	0.001	0.004	0.008	0.0075	0.003
ACN 33%	TR <sub>prom</sub>	1.31	1.91	2.51	5.08	5.96	7.43	8.17	8.17	10.19

Tabla 18. Respuestas cromatográficas en absorbancia y tiempos de retención para flavonas metoxiladas en jugo de naranja, con una composición de fase móvil de H<sub>2</sub>O 67% - ACN 33%

Para una composición en la fase móvil de H<sub>2</sub>O 60% - ACN 40%, el primer pico es el que tiene una mejor resolución, los demás se encuentran poco resueltos.

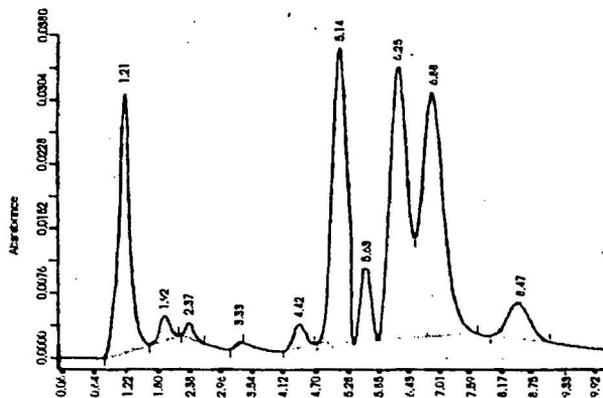
Los mejores resultados se presentan a una composición de fase móvil H<sub>2</sub>O 65% - ACN 35% y H<sub>2</sub>O 67% - ACN 33%, en ambas condiciones se resuelven

9 picos, sin embargo en la primera condición, los picos aparecen mucho más definidos, en los picos 4 y 9 (tr 4.36 min y 8.52 min), se puede observar mejor la diferencia, esto es debido a que en ésta composición se permite una interacción de las flavonas entre la fase estacionaria y la fase móvil cuya polaridad es la exacta, para permitir una mejor resolución entre los picos.

### 3.2.3 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MUESTRA INICIAL.

Para esta prueba se utilizaron 5 ml de muestra inicial, por lo que se realizó otra extracción tomando 10 ml de jugo, y se mantienen constantes todas las variables, las muestras se analizaron por duplicado.

En el cromatograma 12 aparecen los resultados:



Cromatograma 12. Perfil cromatográfico de FM en jugo de naranja con 10 ml de muestra inicial

Aquí se puede observar que aparece otro pico a los 3.33 min, en total son 10 picos. La tabla de resultados es la siguiente:

Cantidad muestra	Respuesta	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6	Pico 7	Pico 8	Pico 9	Pico 10
10 ml	Abs <sub>prom</sub>	0.032	0.005	0.0045	0.001	0.004	0.0365	0.008	0.034	0.0305	0.005
	TR <sub>prom</sub>	1.205	1.91	2.375	3.325	4.41	5.13	5.625	6.245	8.88	8.465

Tabla 19. Respuestas cromatográficas en absorbancia y tiempos de retención para FM en jugo de naranja, de la extracción con una muestra inicial de 10 ml

Ésta nueva flavona seguramente no aparecía en las otras determinaciones debido a que la cantidad de muestra tomada para la extracción, 5 ml, no era la suficiente para que el equipo pudiera detectar la existencia de ésta, sin embargo, al tomar el doble de la cantidad de muestra, fue suficiente para detectar la existencia del compuesto flavonoide, aunque la detección es muy pequeña.

Como se menciono anteriormente, para este estudio no se contó con estándares, sin embargo en el trabajo realizado por Sendra J. M. (22) encontró la existencia de 10 flavonas metoxiladas en jugo de naranja, comparando el perfil reportado por dicho autor y el encontrado, a partir del pico número 4 hay cierta similitud en cuanto a la señal, si se toma en cuenta esto, se podría presumir, con sus reservas, que son las mismas flavonas encontradas.

Los picos 1, 6, 8 y 9 que podrían ser los correspondientes a isosinesitina, nobiletina, heptametoxiflavona y tangeritina respectivamente.

### 3.2.4 EVALUACIÓN DE MUESTRAS.

Se procedió a evaluar 3 las tres muestras de jugo de naranja cuyos resultados aparecen en la siguiente tabla:

Muestra	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6	Pico 7	Pico 8	Pico 9	Pico10
1	0.023	0.004	0.005	0.001	0.004	0.030	0.009	0.025	0.024	0.008
	0.022	0.004	0.004	0.001	0.004	0.031	0.008	0.030	0.023	0.005
2	0.027	0.005	0.004	0.001	0.005	0.028	0.007	0.028	0.022	0.005
	0.029	0.005	0.005	0.002	0.005	0.029	0.008	0.028	0.022	0.004
3	0.025	0.004	0.004	0.001	0.004	0.025	0.008	0.029	0.024	0.004
	0.028	0.004	0.005	0.001	0.004	0.025	0.009	0.028	0.024	0.005
Prom.	0.0253	0.0043	0.0048	0.0018	0.0043	0.028	0.0081	0.0265	0.0231	0.0048
Desv.	0.0023	0.00047	0.0005	0.00037	0.00047	0.0023	0.00068	0.00201	0.00089	0.00068
%C.V.	9.09	9.14	11.11	23.12	10.93	8.21	8.31	7.58	3.85	14.16

Tabla 20. Resultados para flavonas metoxiladas de 3 muestras de jugo de diferentes naranjas de un mismo lote.

Aquí se observa que las señales identificadas como 6, 8, 9, que son los correspondientes a las flavonas que se encuentran en mayor cantidad, el coeficiente de variación entre las muestras estudiadas no es superior al 10%, por lo que se puede decir que no hay diferencia. Los picos 3, 4 y 10 presentan un coeficiente de variación muy alto, sin embargo, esto podría deberse a la precisión del equipo, ya que los valores obtenidos son demasiado bajos, pero muy parecidos.

Para los demás picos, los coeficientes de variación son muy bajos, por lo que se puede decir que no existe diferencia entre las tres muestras. Esto indica que al no presentar variaciones los perfiles cromatográficos entre las muestras, el contenido de flavonas metoxiladas es constante para la variedad estudiada.

### 3.3 DETERMINACIONES ESPECTOFOTOMÉTRICAS.

Se realizaron barridos espectrofotométricos para 3 muestras de naranja, en ellos podemos observar 5 puntos de inflexión, los cuales representan los máximos de absorbancias que corresponden a uno o varios componentes que contiene la naranja.

En la figura 12 se presenta un barrido espectrofotométrico.

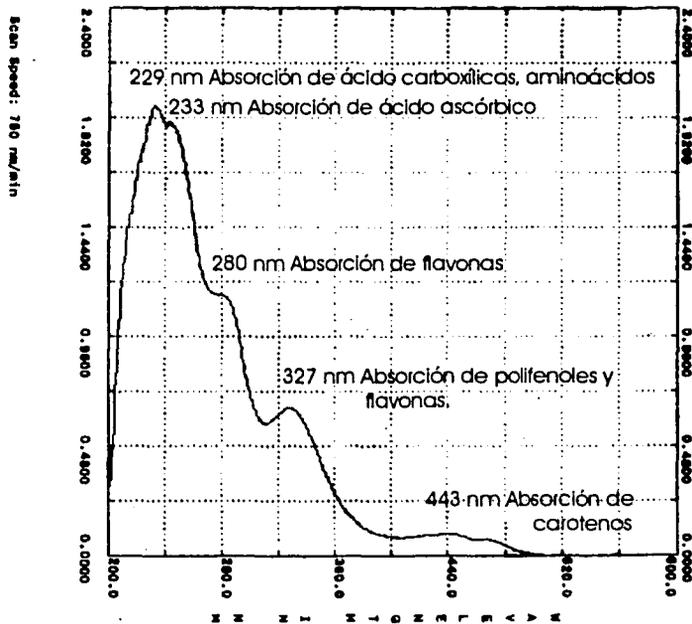


Figura 12. Barrido espectrofotométrico para jugo de naranja

Aquí observamos el perfil característico en jugo de naranja, en donde se observan 5 inflexiones que corresponden a 443 nm carotenos, 326 nm polifenoles y flavonas, 280 nm absorción de compuestos flavonoides, 233 nm ácido ascórbico 229 nm ácidos carboxílicos, aminoácidos etc.

En la tabla 21 se presentan los resultados.

$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$	$\lambda_{prom}$	$\lambda_s$	$\lambda_{cv}$	Abs <sub>1</sub>	Abs <sub>2</sub>	Abs <sub>3</sub>	Abs <sub>prom</sub>	Abs <sub>s</sub>	Abs <sub>cv</sub>
229	228	231	<b>229.33</b>	1.247	<b>0.543</b>	2.055	2.060	1.998	<b>2.037</b>	0.028	<b>1.374</b>
233	233	234	<b>233.33</b>	0.471	<b>0.202</b>	2.070	2.074	2.009	<b>2.051</b>	0.029	<b>1.414</b>
280	280	281	<b>280.33</b>	0.471	<b>0.168</b>	1.109	1.112	1.105	<b>1.108</b>	0.003	<b>0.270</b>
327	326	327	<b>326.66</b>	0.471	<b>0.144</b>	0.596	0.604	0.552	<b>0.584</b>	0.023	<b>3.938</b>
443	444	443	<b>443.33</b>	0.471	<b>0.106</b>	0.103	0.107	0.101	<b>0.103</b>	0.002	<b>1.941</b>

Tabla 21. Resultados en  $\lambda$  absorbancia, y coeficiente de variación para los barridos espectrofotométricos.

Al analizar las relaciones de absorbancia se puede observar que en las 3 muestras analizadas relativamente no hay diferencia, esto nos indica que las naranjas adquiridas son de un mismo lote cuya variedad y estado de madurez era el mismo.

## CONCLUSIONES.

- Se lograron establecer con precisión, las condiciones para la extracción y el análisis cromatográfico de flavonas glucosiladas en jugo de naranja *valencia* y toronja, las cuales son, la utilización de una columna Beckman C<sub>18</sub> de 4.6 x 250 mm, cuyo tamaño de partícula es de 5 µm; utilizando como fase móvil H<sub>2</sub>O-THF, aplicando un gradiente partiendo de 80% H<sub>2</sub>O hasta 50% en 10 minutos a un flujo de 0.8 ml/min, el detector UV-Vis se fija a una longitud de onda de 325 nm.
- El jugo de naranja presenta un perfil que consta de 3 flavonas glucosiladas. La hesperidina es la flavona presente en mayor concentración, siendo ésta de aproximadamente el 74%, las otras dos flavonas podrían ser narirutina y didimina.
- En el jugo de toronja se encontraron 4 flavonas glucosiladas. La naringina se presenta en mayor concentración, siendo ésta de aproximadamente el 80%, las otras tres flavonas podrían ser narirutina, neohesperidina y poncirina.
- El método cromatográfico propuesto, permite evaluar autenticidad entre ambos jugos logrando detectar mezclas de hasta un 5% entre ellos, tomando en cuenta que los marcadores utilizados para ésta prueba son la hesperidina en jugo de naranja, y naringina en el jugo de toronja.
- Se lograron establecer con precisión, las condiciones para la extracción y el análisis cromatográfico de flavonas metoxiladas en jugo de naranja *valencia*, las cuales son, la utilización de una columna µbondapack C<sub>18</sub> de 3.9 x 300 mm, cuyo tamaño de partícula es de 10 µm; utilizando como fase móvil 65% de H<sub>2</sub>O y 35% de ACN isocrático, a un flujo de 1.5 ml/min, el detector UV-Vis se fija a una longitud de onda de 320 nm.

- Se estableció un perfil constante en el jugo de naranja de 10 flavonas metoxiladas, que probablemente son isosinesitina, hexametilgosipentina, sinensetina, tetrametiliscuatellareina hexametilquercetagina, nobiletina, tetrametilscuatellareina, heptametohiflavona, tangeritina y auranetina.
- Las flavonas metoxiladas nobiletina, heptametoxiflavona y tangeritina, son las que se presentan en mayor concentración por lo que podrían ser utilizados como identificadores para ésta variedad de naranja.
- En los barridos espectrofotométricos, se confirmó un perfil característico del jugo de naranja. Este perfil permanece constante para las tres muestras lo cual permite utilizarlo como un método cualitativo de manera rápida para evaluar autenticidad en cítricos.
- Sin embargo, éste método no estima cuantitativamente la composición del jugo.

## **RECOMENDACIONES:**

**Se recomienda analizar los perfiles cromatográficos de diferentes variedades de cítricos, en función de la época del año, lugar de cosecha y estado de madurez, para lograr establecer parámetros que definan a los jugos para poder ser utilizados como esquemas en la normatividad.**

## **BIBLIOGRAFÍA.**

1. Agroenlinea. " Los cítricos, un agronegocio exitoso en México"  
[www.agroenlinea.com](http://www.agroenlinea.com). 21 noviembre de 2000.
2. Aserca. " Apoyos y servicios a la comercialización agropecuaria"  
Claridades Agropecuarias Nov. 1998. 63 pp. 4-6
3. Badui D. S. "Química de los alimentos"  
Ed. Alhambra, México. 1996. pp. 282 – 283.
4. Candelo B.C. "Determinación simultanea de ácido nicotínico, nicotinamida,  
piridoxina, tiamina y rivoftavina de origen animal y vegetal por HPLC".  
Universidad la Salle. México. 1995. pp. 72 – 77, 80 – 82.
5. Dabrio M. V. "Cromatografía y electroforesis en columna".  
Ed. Springer – Verlag Ibérica, Barcelona, 2000. pp. 174 – 180.
6. Diagro. "Producción de los principales cultivos en México"  
[www.diagro.com](http://www.diagro.com). 2000.
7. Fennema O. R. "Fruit science and technology".  
Ed. Acribia. España. 1995. pp. 39 – 49, 669.
8. F.A.O. "Frutos cítricos frescos y elaborados".  
Estadísticas Anuales. 2000. pp. 7 – 16.
9. García A. P. "Liquid chromatographic methodology for the characterization of  
orange juice".  
J. AOAC. 71, 3. 1988. pp. 469

10. Gonzalo F. "Apuntes de cromatografía líquida de alta resolución".  
Perkin – Elmer Hispania S.A. pp. 13, 14, 17, 17, 39, 64, 65, 78.
11. Gutiérrez J. L. "Estadística. Gran enciclopedia científica cultural".  
Ed. Almira. España, 1982. pp. 39.
12. Harborne J. B. "The flavonoids".  
Ed. Academic Press N.Y. 1986. pp. 46 – 48.
13. Infoagro. "El cultivo de las naranjas"  
[www.infoagro.com](http://www.infoagro.com). 2000.
14. Infoagro. "El cultivo de los pomelos"  
[www.infoagro.com](http://www.infoagro.com). 2000.
15. Kefford, J. F. "The chemicals constituents of citrus fruits". *Advances in food research*.  
Ed. Academic Press. N. Y. 1970.
16. Pinto J. A. "Los constituyentes de los zumos cítricos"  
*Revista Alimentaria*. Abril 1994. pp. 23.
17. Pierre, M. "Simultaneous separation of flavones glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juice using liquid chromatography".  
*Journal of chromatography* 1998. pp. 178.
18. Pryde, A. y Gilbert M. T. "Applications of high performance liquid chromatography".  
Ed. Chapman and Hall, 1979. Pp. 3, 4, 15, 48 – 50.

19. Pupin A. M. "Flavanone glycosides in Brazilian orange juices".  
Food Chemistry, Vol 61, 1998.
20. Reyo A. y Sabal S. "Los flavonoides en la tecnología de alimentos".  
ATAM, Vol.25 No. 4, 1980. pp. 5 – 13.
21. SAGAR. "Sistema – producto Naranja".  
Datos básicos, 1990. Pp. 43 – 47.
22. Sendra J. M. y Navarro J. L. "C<sub>18</sub> Solid-phase isolation and high-performance liquid chromatography/ultraviolet diode array determination of fully methoxilated flavones in citrus juices".  
Journal of Cromatographic Science, Vol. 26, 9, 1988, pp 444
23. Steven N. y Phillip E. S. "Citrus science and tecnologia"  
The Avi publishing company INC, vol 1, 1977. Pp. 397 – 398.
24. Ting S. V. Y Rouseff R. L. "Determination of some metoxilated flavones in citrus juices by high performance liquid cromatography"  
Journal of food science 44, 1979. pp. 69 – 71.
25. Valdivia A. L. y Iturbe F. "Aplicaciones de la cromatografía de líquidos de alta presión en alimentos".  
Departamento de alimentos y biotecnología, Facultad de Química UNAM, 1992. pp. 1, 3, 10, 17 – 24, 32.
26. Vasconcello J. A. "Alimentos funcionales conceptos y beneficios para la salud".  
[www.worldfoodscience.org](http://www.worldfoodscience.org). Departamento de ciencias de alimentos y nutrición  
Universidad Chapman Orange California.