



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA CUTÍCULA DE
TORONJA, *Citrus paradisi* (Macf.)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MAYRA BEATRIZ GÓMEZ PATIÑO



TUTORES
DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
DR. DANIEL ARRIETA BAEZ

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno
Gómez
Patiño
Mayra Beatriz
55 85 45 48
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302738724

2. Datos del tutor
Dr.
Manuel
Jiménez
Estrada

3. Datos del co-tutor
Dr.
Daniel
Arrieta
Baez

4. Datos del sinodal 1
Dr.
Héctor Manuel
Luna
Contla

5. Datos del sinodal 2
Dr.
Ricardo
Reyes
Chilpa

6. Datos del sinodal 3
Dra.
Julia
Cassani
Hernández

Datos del trabajo escrito
Análisis estructural de la cutícula de toronja, *Citrus
paradisi* (Macf.)
113 p
2010

AGRADECIMIENTOS

Al PROYECTO PAPIIT 1N224508 y al INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM, especialmente a los departamentos de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de masas.

Al Dr. Manuel, por abrirme las puertas de su laboratorio, por confiar en que nuestro trabajo valía la pena, pero sobre todo por estar siempre pendiente de mí, no sólo en cuestiones laborales sino también en las personales.

Al Dr. Daniel, admiro muchas cosas de ti y no tengo tanto espacio para escribir. Primero que nada gracias por haberme aceptado en este proyecto. Por tu tiempo, dedicación, paciencia y entrega. Por confiar en mí y en que podíamos lograrlo aún sin conocerme. Eres un gran investigador y una gran persona.

A la Dra. Julia, gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio en la UAM-X, por tu dedicación y por enseñarme tantas cosas.

Al Dr. Ricardo, te agradezco que hayas aceptado ser mi sinodal sabiendo que tienes bastante trabajo. Valoro mucho las buenas y acertadas sugerencias que hiciste para mejorar mi tesis.

Al Dr. Héctor, gracias por dedicarme parte de su tiempo pues sé que es una persona muy ocupada. Por haber revisado este trabajo tan meticulosamente, como usted mismo lo dijo: “como si estuviera a cargo de él”.

A mis compañeros del laboratorio 2-10, por ayudarme siempre que lo necesité, por regalarme una sonrisa cada día y por estar pendiente de mí no sólo como tesista sino como persona.

A mis tres amigas del alma, Brenda, María y Viviana, porque con ustedes he vivido lo que nunca imaginé. Gracias por los miles de momentos que me han regalado; se quedarán por siempre en mi mente y en mi corazón.

A Bombón, Regis y Susi, por seguir a mi lado después de tanto tiempo. Aunque no nos vemos tanto como quisiéramos; con una llamada, un mensaje o hasta en Messenger han estado ahí para escucharme y alentarme.

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias, gracias por formar parte de esta etapa tan importante de mi vida, sobre todo a mis amigos desde primer semestre; juntos escribimos una historia para recordar.

A Malenita, por preocuparte tanto y tanto por mí, porque desde que era una bebé me has llenado de mucho amor y atención, gracias por cuidarme y por ser mi abu.

A mi abu Tanis, por haberme heredado tantas cosas, porque cada detalle que compartimos hace que sigas vivo, por haberme regalado tantos momentos de felicidad y por preocuparte por mí hasta el último momento. Te extraño, pero sé que nos reuniremos más adelante.

A ti vida, porque llegaste a darme más amor y más alegría. Por apoyarme en mis buenos y malos momentos, siempre alentándome a seguir sin parar y recordándome que soy capaz de llevar a cabo lo que me propongo.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo, el cual simboliza un círculo más que cerrado, a las tres personas más importantes de mi vida, quienes me han llenado nada más que de amor.

A la Bichita, por haber peleado tanto para traerme a este mundo y por todo lo que te has sacrificado para que yo viva una vida de princesa en todos los sentidos. Por todos nuestros momentos de risa, de warres, de llanto, de alegría... por aceptar ser mi madre y por confiar en mí y recordarme cada que me invade la duda, que soy capaz de lograr todas mis metas y de encontrar mi camino. Espero algún día poder darte aunque sea un poco de lo mucho que tu me has dado.

A mi mamá Betty, no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho conmigo, sólo puedo decirte que eres un ejemplo a seguir y que en ti he encontrado no sólo a una madre sino a una amiga y a una cómplice. Gracias por tus consejos siempre tan atinados sensei y por amarme tanto cada día.

Al Gordis, porque aunque somos tan difíciles, has estado para apoyarme siempre que has podido y porque en mi corazón sé que nuestra manera de amarnos es especial, gracias por todo papi. Nunca lo dudes, eres muy importante para mí.

Los escogí para ser mis padres porque sabía que me amarían y que me harían una mujer de bien, ¿ahora lo ven?, no me equivoqué. Los amo muchísimo.

I NEVER SAW A WILD THING SORRY FOR ITSELF.
A SMALL BIRD WILL DROP FROZEN DEAD FROM A BOUGH
WITHOUT EVER HAVING FELT SORRY FOR ITSELF.

D. H. LAWRENCE

ABREVIATURAS

HF	Ácido Fluorhídrico
KOH	Hidróxido de potasio
TFA	Ácido Trifluoroacético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Resonancia Magnética Nuclear)
PG-HCL	Floroglucinol – ácido clorhídrico
EM	Espectrometría de masas
FT-IR	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier
UV/Vis	Espectroscopia ultravioleta/visible
¹³ C NMR-CPMAS	Resonancia Magnética Nuclear de estado sólido con polarización entrecruzada con rotación en ángulo mágico
CAL	Lipasa de <i>Candida antarctica</i>
PCL	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> sp
LAP	Polvo acetónico de hígado de borrego
¹ H NMR	Resonancia Magnética Nuclear de protón
EM -IE	Espectrometría de masas de impacto electrónico
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
MeOH	Metanol
C ₆ H ₁₄	Hexano
AcOEt	Acetato de etilo
CHCl ₃	Cloroformo
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	i
ÍNDICE	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ESQUEMAS	viii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE ESPECTROS (ANEXOS)	ix

CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL	i
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
- Funciones biológicas de las cutículas.	5
- Estudios estructurales de las cutículas.	5
ANTECEDENTES	7
1. ¿Qué es un fruto?	7
2. La Familia Rutaceae y sus usos.	7
3. El origen de la toronja.	9
4. Variedades comerciales de la toronja y su problemática actual.	9
5. Mejora genética.	10
6. Estudios estructurales realizados con diferentes cutículas.	11
6.1 Trabajos realizados con la toronja.	19
7. Técnicas utilizadas para la obtención y el estudio de las cutículas.	23
7.1 Químicas.	23
7.2 Análisis espectroscópico.	24
OBJETIVOS	31
JUSTIFICACIÓN	32
REACTIVOS	33
METODOLOGÍA	34

RESULTADOS	39
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	64
ANEXOS (Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear, Infrarrojo y Espectrometría de masas).	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cutícula en un corte transversal de hoja de muérdago (<i>Viscum album</i>) (400x).	2
Figura 2. Representación esquemática de la cutícula A y de la suberina B.	2
Figura 3. Monómeros de las familias C ₁₆ y C ₁₈ que conforman la red polimérica de la cutina.	3
Figura 4. Estructura molecular de la cutina.	3
Figura 5. Estructura molecular de la suberina.	4
Figura 6. Corte transversal del peridermo de la raíz madura de <i>Arabidopsis</i> que muestra el tejido suberizado en color rojo. XY, xilema; PD, peridermo.	4
Figura 7. (A) Corte transversal de una Toronja Michoacana. (B) Corte Transversal de una Toronja Veracruzana.	8
Figura 8. Espectros que muestran los pasos de aislamiento de la cutícula del limón. Tratamiento con (a) oxalato, (b) celulasa, (c)	12

pectinasa, (d) hemicelulasa y (e) extracciones en Soxhlet.

Figura 9. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutina del limón obtenidos (a) antes del tratamiento, (b) después de 8 h de tratamiento con KOH metanólico y (c) después de 22 h de tratamiento con KOH metanólico. 12

Figura 10. Estructura del dímero aislado de la hidrólisis parcial de la cutina del jitomate con KOH. 13

Figura 11. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de (A) cáscara de jitomate seca y (B) residuo de la cáscara de jitomate seco después del tratamiento con 1.5 M KOCH_3 y extracción con CHCl_3 . 14

Figura 12. Estructura molecular del 1 Pentámero; 2,3 monómeros; 4 oligómero, obtenidos de la cutícula del limón. 15

Figura 13. Espectro ^1H HR-MAS NMR de la cutina del jitomate disuelta en DMSO. 16

Figura 14. Caracterización de la morfología de la superficie externa de la cutina de un jitomate joven (A) y uno maduro (B) con diferentes resoluciones. 16

Figura 15. (A) Espectro HR-MAS NMR ^1H - ^1H TOCSY (B) Espectro HR-MAS NMR ^1H - ^{13}C HSQC, de la mezcla de cutina/cutana de *Agave americana* disuelto en DMSO (C) Modelo propuesto de la cutina/cutana. 17

Figura 16. Distribución de la longitud de de las cadenas de monómeros alifáticos obtenidos por transesterificación de la cutina y 18

suberina de *Arabidopsis*.

- Figura 17. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la suberina purificada de la papa después de diversos tratamientos de 90 minutos a diferentes concentraciones de TFA. 19
- Figura 18. Material (A) control y (B) inoculado, derivado de la cáscara de la toronja, purificado después de la digestión con enzimas. Las muestras se montaron en PG-HCL, el control muestra fragmentos de xilema (x) coloreados y de cutícula (c) sin reacción histoquímica. La muestra B contiene material reactivo de PG-HCL (i), así como fragmentos de xilema y cutícula. 20
- Figura 19. Estructuras de las furanocumarinas aisladas del jugo de la toronja. 21
- Figura 20. Principales flavononas del género *Citrus*. 22
- Figura 21. Contenido de ácido D-glucárico obtenido por HPLC de nueve variedades de toronja en tres fechas diferentes. 23
- Figura 22. Diagrama de un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear. 27
- Figura 23. Diagrama de un espectrómetro de masas. 30
- Figura 24. Cromatografía en capa fina que muestra los principales compuestos solubles presentes en la cáscara de la toronja. Fcc. 6: Bergaptol, Fcc. 9: Geranil cumarina, Fcc. 11: Naringenina. Las placas fueron eluidas con hexano:acetato (7:3, v/v) y reveladas con sulfato sérico. 39

Figura 25. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de toronja.	41
Figura 26. Espectro de sólidos ^{13}C NMR-CPMAS donde se observan los cambios en las señales después de la hidrólisis con TFA 10 mM, 1 M y 2 M.	42
Figura 27. Estudio de azúcares en placa fina; (a) Toronja Michoacana (b) Toronja Veracruzana. (1) Fructosa, (2) Galactosa, (3) Glucosa, (4) acuoso de 10 mM TFA, (5) acuoso de 1 M TFA, (6) acuoso de 2 M TFA. Las placas fueron eluidas con acetonitrilo:agua (80:20, v/v) y reveladas con una solución de <i>alfa</i> -naftol.	43
Figura 28. Placas de las principales fracciones obtenidas de la columna cromatográfica de la hidrólisis con KOH (Fracción soluble). Se utilizó un sistema de diclorometano:metanol (95:5, 9:1, v/v) como fase móvil y las placas fueron eluidas en un sistema cloroformo:metanol (9:1, v/v).	44
Figura 29. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS del comparativo después del tratamiento con KOH.	45
Figura 30. Comparación de los espectros de ^1H RMN obtenidos de los productos aislados de la reacción del monómero 1 con lipasas, donde se indica la formación de ésteres con el rectángulo.	46
Figura 31. Cutícula de toronja (A) Michoacana y (B) Veracruzana.	49

Figura 32. Cutícula de toronja descrita por Lai <i>et al.</i> , 2003.	50
Figura 33. Cutícula de la toronja obtenida.	50
Figura 34. Espectros de ^{13}C NMR-CPMAS de la hidrólisis con TFA (Toronja Michoacana).	52
Figura 35. Espectros de ^{13}C NMR-CPMAS de la hidrólisis con TFA (Toronja Veracruzana).	52
Figura 36. Espectros de ^{13}C NMR-CPMAS del material cuticular del limón (Trabajo experimental: Propiedades bioplásticas de los monómeros de la cutícula del limón, Martínez-Villa).	54
Figura 37. Modelos de dominios propuestos para las cutículas de toronja (A) y limón (B).	55
Figura 38. Espectro de FT-IR del material cuticular residual de la hidrólisis con KOH.	57
Figura 39. Esquema de fragmentación del monómero 1.	58
Figura 40. Espectro de HMBC del monómero 1.	58
Figura 41. Espectro de HMBC del monómero 2.	59
Figura 42. Esquema de fragmentación del monómero 2.	60

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Diagrama de flujo para la obtención de la cutícula de toronja.	34
Esquema 2. Hidrólisis de la cutícula con Ácido Trifluoroacético (TFA).	35
Esquema 3. Hidrólisis del material residual de la cutina con Hidróxido de Potasio (KOH).	37
Esquema 4. Reacciones de polimerización del monómero 1.	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Monómeros detectados en la cutícula de limón y su contenido porcentual (Ray y col., 1995).	13
Tabla 2. Composición de los carotenoides de la cáscara de diferentes cítricos.	22
Tabla 3. Porcentaje del sólido residual (fracción insoluble II) y la fracción acuosa de la hidrólisis con TFA a partir de 150 mg de cutícula.	42
Tabla 4. Porcentaje de la fracción soluble e insoluble de la hidrólisis con KOH, así como de los monómeros obtenidos de la columna cromatográfica a partir de 1 g de cutícula.	43

Tabla 5. Porcentajes de polimerización del monómero 1 con cada enzima a diferentes tiempos. 46

Tabla 6. Composición monomérica de la cutícula de la toronja y del limón. 60

LISTA DE ESPECTROS (ANEXOS)

Espectro A. Espectro de ^1H RMN del Bergaptol. 67

Espectro B. Espectro de ^1H RMN de la Geranil cumarina. 68

Espectro B.1 Espectro de COSY de la Geranil cumarina. 69

Espectro B.2 Espectro de HMBC de la Geranil cumarina. 70

Espectro B.3 Espectro de HMQC de la Geranil cumarina. 71

Espectro C. Espectro de ^1H RMN de la Naringenina. 72

Espectro C.1 Espectro de COSY de la Naringenina. 73

Espectro 1. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de la toronja. 74

Espectro 2. Espectro de FT-IR de la cutícula de Toronja Michoacana. 75

Espectro 3. Espectro de FT-IR de la cutícula de Toronja Veracruzana. 76

Espectro 4. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de Toronja Michoacana TFA 10 mM.	77
Espectro 5. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de Toronja Michoacana 1 M.	78
Espectro 6. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de Toronja Michoacana 2 M.	79
Espectro 7. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de Toronja Veracruzana 10 mM.	80
Espectro 8. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de Toronja Veracruzana 1 M.	81
Espectro 9. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de Toronja Veracruzana 2 M.	82
Espectro 10. Espectro de FT-IR de la fracción insoluble KOH Toronja Michoacana.	83
Espectro 11. Espectro de FT-IR de la fracción insoluble KOH Toronja Veracruzana.	84
Espectro 12. Espectro de FT-IR del monómero 1.	86
Espectro 13. Espectrometría de masas (IE) del monómero 1.	87
Espectro 14. Espectro de ^1H NMR del monómero 1. Análisis del FID con el programa ACD-Predictor para confirmar la estructura.	88

Espectro 15. Espectro de ^1H NMR del monómero 1.	89
Espectro 16. Espectro de COSY del monómero 1.	90
Espectro 17. Espectro de HMBC del monómero 1.	91
Espectro 18. Espectro de FT-IR del monómero 2.	93
Espectro 19. Espectro de masas (IE) del monómero 2.	94
Espectro 20. Espectro de masas (FAB) del monómero 2.	95
Espectro 21. Espectro de ^1H NMR del monómero 2. Análisis del FID con el programa ACD-Predictor para confirmar la estructura.	96
Espectro 22. Espectro de ^1H NMR del monómero 2.	97
Espectro 23. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS del monómero 2.	98
Espectro 24. Espectro de HMBC del monómero 2.	99
Espectro 25. Espectro de ^1H NMR del producto de la reacción de polimerización del monómero 1 con CAL.	101

Espectro 26. Espectro de HMBC del producto de la reacción de polimerización del monómero 1 con CAL.	102
Espectro 27. Espectro de ^1H RMN del producto de la reacción de polimerización del monómero 1 con LAP.	103
Espectro 28. Espectro de HMBC del producto de la reacción de polimerización del monómero 1 con LAP.	104
Espectro 29. Espectro de ^1H RMN del producto de la reacción de polimerización del monómero 1 con PCL.	105
Espectro 30. Espectro de HMBC del producto de la reacción de polimerización del monómero 1 con PCL.	106

RESUMEN

La cutícula o membrana cuticular es una membrana continua extracelular de lípidos solubles y polimerizados, que se encuentra en contacto con el medio. La estructura y composición de las cutículas varía según el tipo de planta y órganos, pero está compuesta principalmente de una matriz de cutina y una capa de ceras. Las cutículas se dividen de acuerdo a su composición en dos: cutina y suberina. La cutina se puede definir como una red polimérica de ácidos grasos oxigenados principalmente de las familias C_{16} y C_{18} , unidos por enlaces éster y se encuentra unida a la cara exterior de la epidermis por una capa de pectina. Los ácidos grasos hidroxilados e hidroxi-epoxilados que forman la red de cutina se derivan de los ácidos grasos celulares comunes. Los principales estudios de la composición monomérica de las cutinas se han realizado principalmente en jitomate, limón, toronja y *Agave americana*. Sin embargo, la estructura tridimensional de este importante biopolímero permanece sin elucidarse. Conocer dicha estructura resulta importante para entender la dinámica de interacción entre el fruto y su medio, así como con herbicidas y su conservación en anaqueles. De la misma manera, esta información resultará útil para poder obtener especies genéticamente más resistentes a estos factores bióticos y abióticos.

Se ha demostrado que el Ácido Trifluoroacético (TFA) hidroliza de manera eficiente y gradual azúcares no celulósicos y componentes alifáticos de algunas cutículas donde se ha utilizado. Dependiendo de las concentraciones acuosas que se utilicen, el TFA puede ser utilizado como disolvente o como agente hidrolítico para el material celulósico o lignolítico en estudio.

En el presente trabajo se comparan los resultados obtenidos de los estudios realizados con TFA en dos variedades de toronja y a partir de los análisis de NMR de sólidos y de FT-IR, se proponen modelos de los dominios de los grupos alifáticos y azúcares presentes en los biopolímeros protectores de esta fruta.

INTRODUCCIÓN

La cutícula o membrana cuticular es una membrana continua extracelular de lípidos solubles y polimerizados, que se encuentra en contacto con el medio ambiente (Fig. 1). La estructura y composición de las cutículas varía según el tipo de planta y órganos, pero está compuesta principalmente de una matriz de cutina y una capa de ceras (Heredia, 2003).

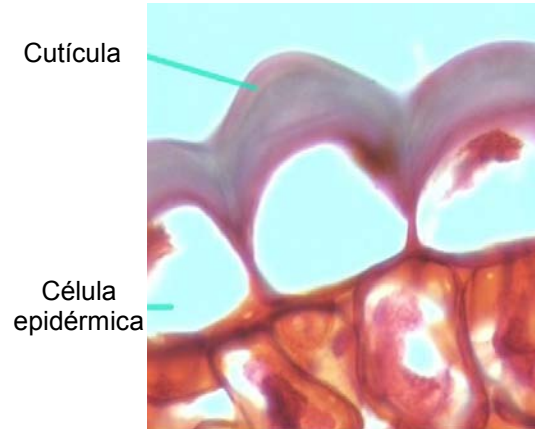


Figura 1. Cutícula en un corte transversal de hoja de muérdago (*Viscum album*) (400x) (INEA).

Se sabe que sólo las células epidérmicas son capaces de sintetizar los componentes de la cutícula (Fig. 2A), por otro lado es un hecho que siempre se encuentra ausente en la epidermis de las raíces (Riederer y Müller, 2006).

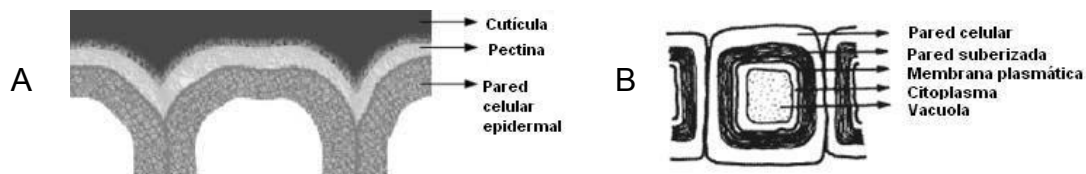


Figura 2. Representación esquemática de la cutícula A y de la suberina B (Kolattukudy, 2001).

De acuerdo a su composición química, las cutículas suelen dividirse en dos grupos: cutinas y suberinas (Fig. 2B).

Las **cutinas** se pueden definir como una red polimérica de ácidos grasos oxigenados principalmente de las familias C_{16} y C_{18} , unidos por enlaces éster (Fig. 3,4) (Heredia, 2003). Los ácidos grasos que forman la red de cutina se derivan de

los ácidos grasos celulares comunes. La cutina se encuentra unida a la cara exterior de la epidermis por una capa de pectina (Fig. 2A) (Kolattukudy, 2001).

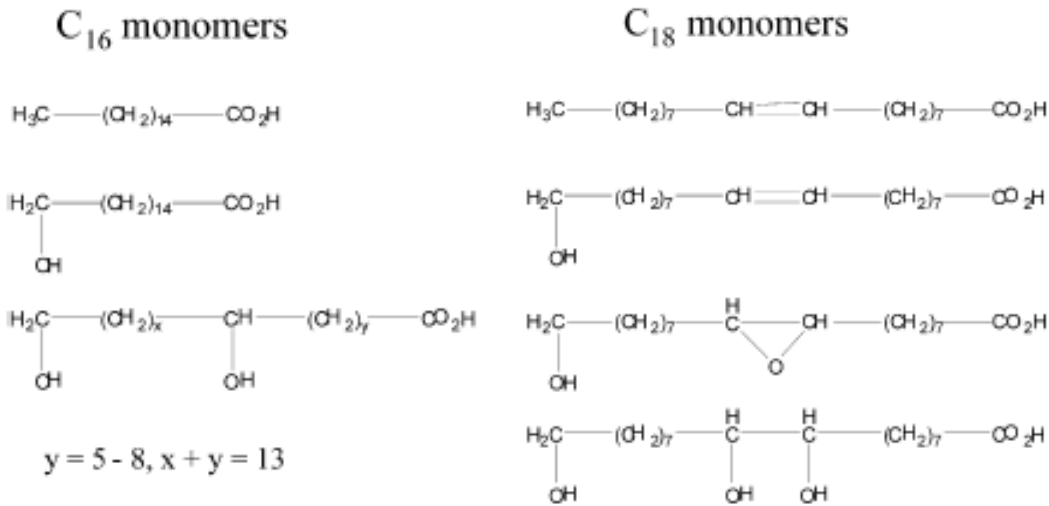


Figura 3. Monómeros de las familias C₁₆ y C₁₈ que conforman la red polimérica de la cutina (Deshmukh *et al.*, 2003).

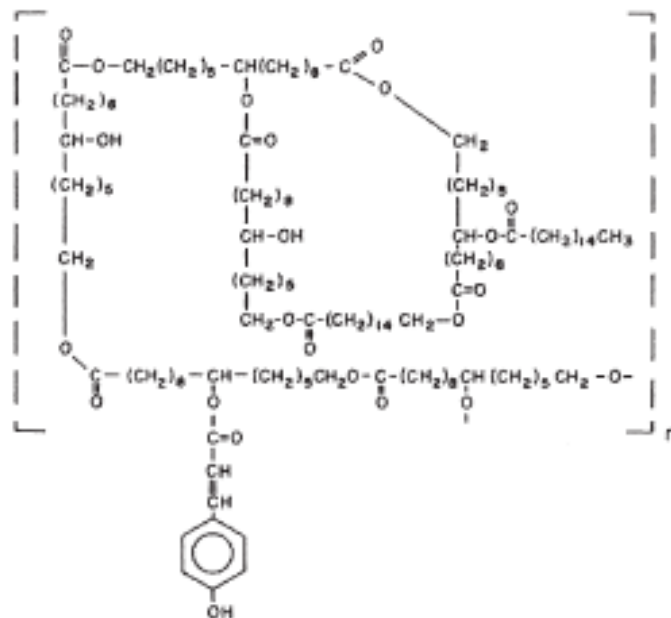


Figura 4. Estructura molecular de la cutina (Kolattukudy, 1980).

La **suberina**, al igual que las cutinas son polímeros naturales. Sin embargo este biopoliéster natural está formado por dos dominios: uno alifático y otro aromático (Fig. 5). Los dominios aromáticos se derivan principalmente de los ácidos hidroxicinámicos y los componentes alifáticos se derivan de los ácidos grasos

celulares comunes. Los principales componentes de la suberina son alcoholes alifáticos, ácidos grasos, ácidos grasos ω -hidroxilados, ácidos α,ω -dicarboxílicos y ácidos aromáticos, todos de cadenas largas que van de los 16 a los 30 carbonos; se ha propuesto que pueden estar unidos a través de puentes de glicerol (Gandini *et al.*, 2006). El peridermo, la epidermis y la hipodermis de las raíces son algunos lugares donde comúnmente encontramos a la suberina (Fig. 6) (Kolattukudy, 2001).

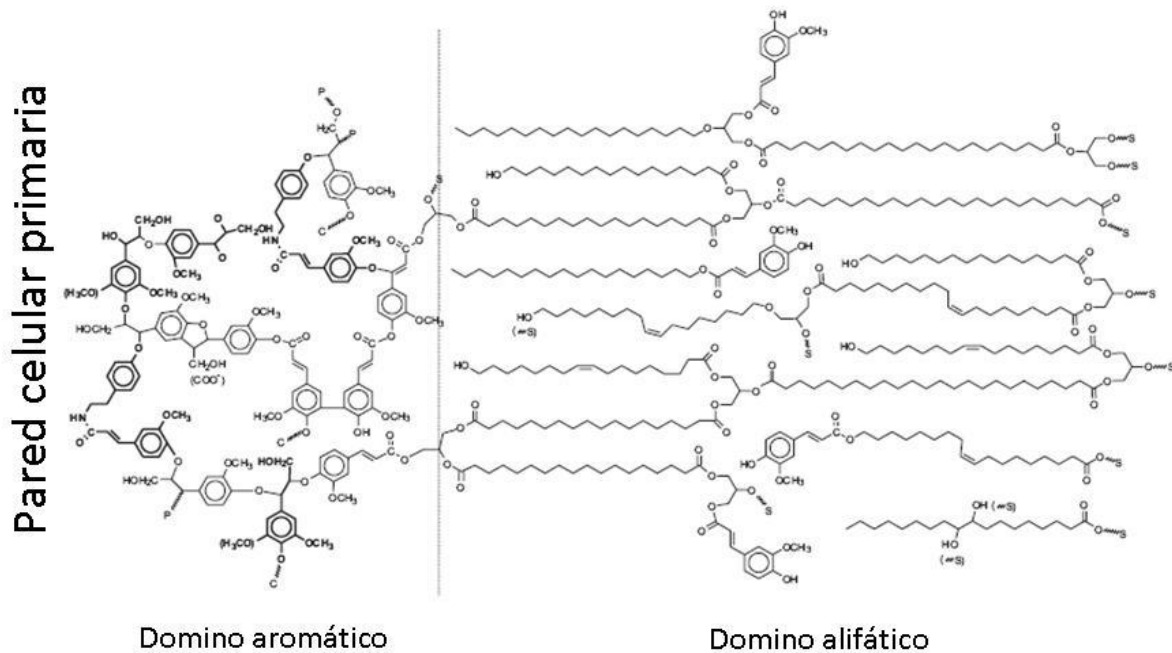


Figura 5. Estructura molecular de la suberina (Bernards, 2002).

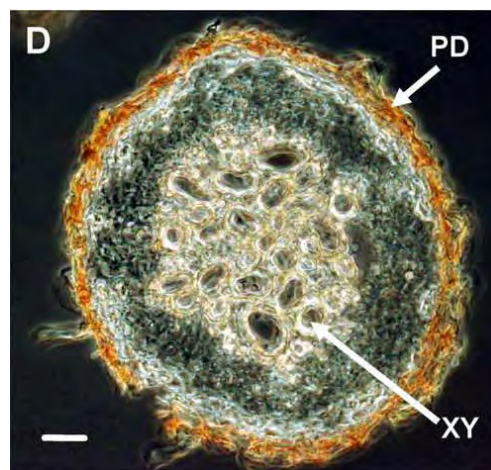


Figura 6. Corte transversal del peridermo de la raíz madura de *Arabidopsis* que muestra el tejido suberizado en color rojo. XY, xilema; PD, peridermo (Franke y col., 2005).

La cutina se encuentra en las partes aéreas de diversos vegetales, comúnmente en la cáscara de diversos frutos, incluido el grupo de los cítricos. A diferencia de esta, la suberina se localiza principalmente en las raíces, un ejemplo muy recurrido es la papa. Existen casos especiales, como en *Arabidopsis*, en los cuales podemos encontrar la presencia de cutina y suberina (Franke *et al.*, 2005).

FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS CUTÍCULAS

Las principales funciones de las cutículas son las siguientes:

1. Restringir la pérdida de agua en forma de vapor.
2. Limitar la pérdida e incorporación de sustancias de la parte interna de los tejidos.
3. Protección contra patógenos, daños mecánicos y ataques de herbivoría (Heredia, 2003; Graça y Santos, 2007).
4. Transporte de sustancias lipofílicas.
5. Repelencia de agua y partículas.
6. Atenuación de la radiación UV.
7. Evita la fusión de los órganos durante el desarrollo de la planta (Riederer y Müller, 2006).

ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LAS CUTÍCULAS

El estudio de las cutículas se ha realizado principalmente en frutos como el jitomate y el limón. Se ha propuesto una metodología básica para la obtención de las cutículas que consta de tres pasos: a) una hidrólisis enzimática con pectinasa, b) una hidrólisis enzimática con celulasa y hemicelulasa, y c) extracciones con Soxhlet o lavados con cloruro de metileno y metanol (Pacchiano *et al.*, 1993). Por otro lado se han propuesto protocolos donde se utilizan nuevas técnicas para la obtención de monómeros, dímeros y oligómeros. Entre ellos esta el uso de ácido fluorhídrico (HF) (Fang *et al.*, 2001) o la hidrólisis alcalina con Hidróxido de potasio (KOH) (Ray *et al.*, 1995). En el presente trabajo proponemos el uso complementario del Ácido Trifluoroacético (TFA) en el proceso de hidrólisis para el análisis estructural de estos importantes biopolímeros protectores.

Se ha demostrado la eficiencia del TFA para remover sistemáticamente dominios alifáticos y de polisacáridos presentes en estos polímeros naturales, y con ello determinar sus estructuras moleculares y relacionarlas con sus funciones biológicas.

A la fecha, sólo los estudios realizados en papa (*Solanum tuberosum*) han arrojado resultados para proponer un esquema tridimensional de la cutícula llamada suberina.

ANTECEDENTES

1. ¿Qué es un fruto?

El fruto botánicamente significa ovario maduro, aunque no es precisamente una definición muy acertada debido a que hay frutos que pueden desarrollarse sin la fertilización o el desarrollo de la semilla, este fenómeno es conocido como partenocarpia, el cual es típico de especies que poseen un gran número de óvulos por fruto, como el plátano, el melón, la piña y el jitomate.

Morfológicamente los frutos se encuentran clasificados en base a dos criterios: el primero se refiere a la dureza del pericarpo o pared del fruto, donde el fruto puede ser seco y duro o suave y jugoso; el segundo criterio se refiere a la habilidad del fruto de abrirse para liberar la semilla o no durante la maduración (Fahn, 1882; Esau, 1977).

En el presente trabajo se menciona una clasificación si bien no morfológica, muy útil dentro del mercado global donde los frutos se clasifican comúnmente de acuerdo a la región donde se desarrollan:

- Frutos de zonas templadas: frutos pomo (manzana, pera Asiática, quince), frutos de semilla dura o “piedra” (cereza, durazno y ciruela) y frutos pequeños o bayas (uva, fresa, arándano).
- Frutos de zonas subtropicales: cítricos (toronja, limón, lima) y no cítricos (aguacate, chirimoya, kiwi).
- Frutos tropicales: frutos tropicales mayoritarios (plátano, mango, piña) y frutos tropicales minoritarios (carambola, tamarindo, lichi) (Knee, 2002).

2. La Familia Rutaceae y sus usos.

Los cítricos (*Citrus spp.*) pertenecen a la familia Rutaceae donde se encuentran reconocidas sesenta especies, con muchos híbridos entre ellas: *C. sinensis* (naranja), *C. limon* (limón), *C. aurantifolia* (lima), *C. reticulata* (mandarina), *C. paradisi* (toronja), etc. (COVECA).

A continuación se muestra la clasificación taxonómica de la toronja (TROPICOS).

Magnoliophyta Cronquist, Takht. Y Zimm. ex Reveal

Magnoliopsida Brongn

Rosidae Takht.

Sapindales Benth. y Hook.

Rutaceae Juss.

Citrus paradisi Macf.

Dentro de la Botánica, la toronja está descrita como un árbol con porte reducido, tronco corto y copa compacta, brotes color púrpura y escasa espinosidad. Sus hojas son de tamaño medio, algo vellosas, con alas grandes, nervios muy marcados y olor típico. Las flores son grandes de color verdoso y estambres reducidos (Fig. 7A). El fruto es un herperidio que consta de: exocarpo (flavedo: presenta vesículas que contienen aceites esenciales), mesocarpo (albedo: pomposo y de color blanco) grueso y endocarpo (pulpa: presenta tricomas con jugo) blanco, rosa o rojo; de tamaño grande y forma redonda y algo aplastada (Fig. 7B). La superficie contiene glándulas prominentes con aceites esenciales (COVECA).

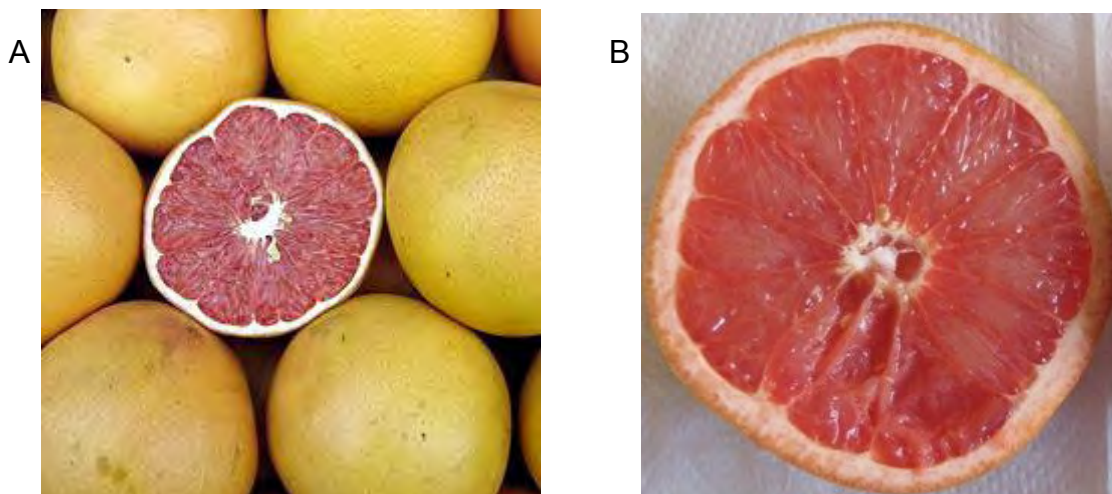


Figura 7. (A) Corte transversal de una Toronja Michoacana. (B) Corte Transversal de una Toronja Veracruzana.

Algunas de las especies de cítricos actualmente son utilizadas como fuente de extracción de aceites esenciales (*Citrus limon* → aceite de limón, *C. aurantium bergamia* → bergamota) y otras tantas han alcanzado gran importancia en el mercado de alimentos. Cabe mencionar que una parte significativa de aceites industriales se obtienen de los residuos de cítricos después de haber sido exprimidos para utilizar su jugo (Schery, 1972).

El jugo de cítricos, especialmente el de toronja, es fuente importante de flavonoides (sustancia antioxidante), folato (ácido fólico) y vitamina C (ácido ascórbico), así como de nutrimentos: proteínas, sacarosa, glucosa, fructosa, calcio, hierro, niacina, betacaroteno, licopeno, pectina, etc. (USDA).

3. El origen de la toronja.

El origen de los cítricos fue al parecer hace aproximadamente 20 millones de años en Asia; la toronja en especial, es un híbrido natural (naranja dulce *Citrus sinensis* X pummelo *Citrus grandis*) que se produjo en las Islas Barbados en el siglo XVII. Se cree que su distribución fue de Asia a África y Europa, y posteriormente a América, alrededor del año 1500 (CONCITVER). La toronja hizo su aparición en México en 1940, cuando se estableció la primera huerta comercial en Oaxaca, extendiéndose en los 60's a otros estados como Veracruz, Tamaulipas y Nuevo León. Actualmente, los principales estados productores son: Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Puebla, Michoacán, Yucatán, Sonora, Tabasco y Campeche, que en conjunto producen el 90% del total de la producción nacional (SENASICA, 2008). En tiempos pasados la producción de fruta era usualmente para autoconsumo, en muchos lugares del mundo esto sigue siendo así, pero en otros tantos los pequeños cultivos caseros han sido reemplazados por grandes plantaciones gracias al desarrollo de nuevos equipos para transporte, refrigeración, congelamiento y conservación (Schery, 1972).

4. Variedades comerciales de toronja y su problemática actual.

Las variedades de toronja que se comercializan actualmente en México y en el mundo se clasifican en dos grupos. En el primer grupo se incluyen las variedades blancas o comunes, siendo la variedad *Marsh* la más importante. El

segundo grupo engloba las variedades pigmentadas, que están adquiriendo mayor popularidad entre los consumidores, y por lo mismo están desplazando cada vez más a las variedades blancas. Las variedades blancas o comunes son las siguientes: Duncan y Marsh (Marsh seedles). Las variedades pigmentadas deben su color a la presencia de licopeno, a diferencia de las naranjas, en las que el color se debe a las antocianinas. Las principales variedades pigmentadas son: Burgundy, Ruby (Ruby red, Redblush, Henninger), Star Ruby (doble rojo) y Thompson o Pink Marsh (COVECA).

Los cultivos de cítricos comerciales se encuentran sujetos a dos limitantes principales, la gran variedad de suelos donde pueden crecer y las condiciones climáticas que conllevan diversos tipos de estrés. Por otro lado, los árboles son afectados por plagas y enfermedades causadas por hongos, nemátodos, bacterias, spiroplasmas, fitoplasmas, virus y viroides, lo cual causa pérdidas económicas considerables. Estas limitantes han dado la pauta para que se generen nuevos programas de crianza para la mejora de cítricos; aunque los avances no han sido tan grandes como se quisiera, la mayoría de los pies de importancia y que son usados actualmente siguen sin cambios. De hecho las variedades de importancia económica se originaron por mutaciones espontáneas de la yema y por variedades oportunistas.

5. Mejora genética.

La mejora de los cítricos mediante métodos convencionales se encuentra muy limitada debido a la complejidad de sus características genéticas y reproductivas; poseen un sistema de reproducción complejo, con muchos casos de esterilidad total o parcial del óvulo o polen. Por otro lado, se desconoce el modo de herencia de la mayor parte de caracteres agronómicos de interés y mucho menos se tiene un panorama cuantitativo de los caracteres heredados (COVECA; Gmitter y col., 2007; Peña y col., 2007)

El desarrollo de técnicas moleculares se ha convertido en una herramienta potencial para la mejora de los frutos, se han realizado mapas de ligamiento del genoma de los cítricos y se dispone de marcadores de ADN asociados a

caracteres de interés, los cuales son útiles para la selección temprana de la progenie con los caracteres deseados en programas de mejora clásica. Aún con estas herramientas y con el interés actual en biotecnologías derivadas del cultivo de tejidos, el número de marcadores asociados a genes importantes sigue siendo aún muy escaso en citricultura (COVECA; Gmitter y col., 2007; Peña y col., 2007)

6. Estudios estructurales realizados con diferentes cutículas.

La fitoquímica juega un papel fundamental en la elucidación estructural y el reconocimiento de rutas biogénicas ligadas a ciertas características biológicas. La cutícula del fruto la cual controla el intercambio de agua e impide el ataque de ciertos patógenos podría ser modificada con su ayuda para obtener frutos más resistentes.

La mayoría de los estudios realizados en cutículas se han enfocado al jitomate y al limón, y recientemente al agave. En el caso de la toronja, los principales trabajos realizados con la cáscara han sido para estudiar los metabolitos secundarios del tipo de los flavonoides, y no precisamente a los estudios estructurales de la cutícula. Se han propuesto protocolos para el estudio de las cutículas de diversos frutos y partes aéreas. Dichos protocolos han sido aceptados de acuerdo a la variación en la composición monomérica de las cutículas.

En 1993, Pacchiano y colaboradores realizaron estudios en el limón y la papa por medio de un protocolo eficiente el cual combina métodos enzimáticos y químicos para el aislamiento de la cutícula del limón y la suberina de la papa en base a sustratos modelo de pared celular y a la variación en el tiempo y concentración de las enzimas. Por otro lado compararon por medio de Resonancia Magnética Nuclear de sólidos, (por sus siglas en inglés: ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance - Cross Polarization Magic Angle Spinning; ^{13}C NMR-CPMAS) dos métodos alternativos para la mejor separación de la cutícula y la cáscara del limón, el primero fue un buffer de oxalato de amonio y el segundo un buffer de acetato de sodio con pectinasa de *Aspergillus niger* (Fig. 8).

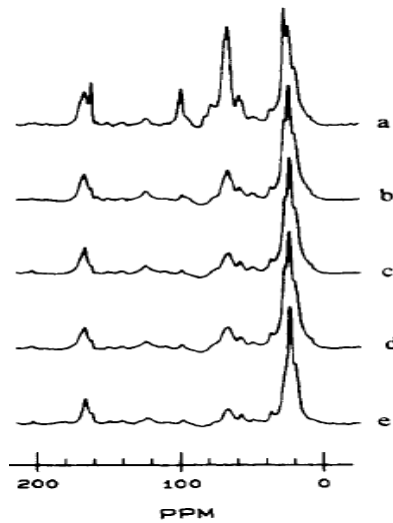


Figura 8. Espectros de ^{13}C NMR-CPMAS que muestran los pasos de aislamiento de la cutícula del limón. Tratamiento con (a) oxalato, (b) celulasa, (c) pectinasa, (d) hemicelulasa y (e) extracciones en Soxhlet (Pacchiano y col., 2003).

En 1995, el grupo del Dr. Ray identificó los diez principales monómeros constituyentes de la cutina del limón, encontrando que el ácido 10-oxo-16 hidroxihexadecanoico y el ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico se encuentran en mayor proporción (Tabla 1). Los monómeros fueron obtenidos por medio de la hidrólisis con hidróxido de potasio (Fig. 9) y con una técnica innovadora que se basa en la transesterificación con trifluoruro de boro metanólico.

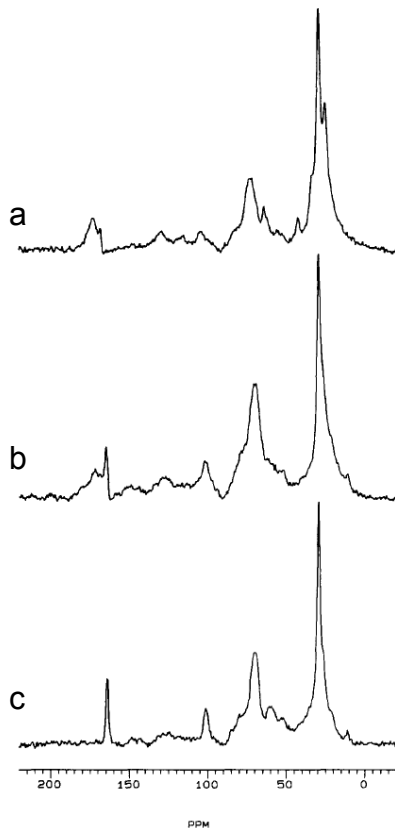


Figura 9. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutina del limón obtenida (a) antes del tratamiento, (b) después de 8 h de tratamiento con KOH metanólico y (c) después de 22 h de tratamiento con KOH metanólico. (Ray y col., 1995).

Tabla 1. Monómeros detectados en la cutícula de limón y su contenido porcentual (Ray y col., 1995).

Monómero	Ácido	
	Tr (min)	Área (%)
Hexadecanoico, octadecanoico	2.4	3.7
10-hidroxihexadecanoico	9.5	0.95
18-hidroxi-octadeca-9,12-dienoico	13.8	0.8
18-hidroxi-octadeca-9-enoico	14.4	1.7
16-hidroxihexadecanoico	15.5	2.8
16-hidroxi-9-oxo-hexadecanoico	21.7	4.8
16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico	22.7	51.0
9,16-dihidroxihexadecanoico	26.6	2.9
10,16-dihidroxihexadecanoico	28.1	27.9

Debido a los resultados obtenidos y el interés industrial por sus características no tóxicas y biodegradables, el protocolo para el estudio de estos biopolímeros fue modificado para aislar y caracterizar oligómeros y estructuras superiores por medio de una hidrólisis parcial alcalina de la cutina de jitomate. Entre los compuestos que se obtuvieron destaca la caracterización completa de un dímero, uno de los primeros compuestos aislados que retienen su enlace éster (Fig. 10).

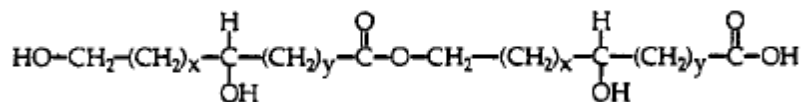


Figura 10. Estructura del dímero aislado de la hidrólisis parcial de la cutina del jitomate con KOH (Osman y col., 1995).

En 1999, Osman y col., modificando el protocolo anterior realizaron una depolimerización con hidróxido de potasio metanólico y adicionalmente realizaron extracciones y precipitaciones con disolventes con el fin de obtener una mayor cantidad de monómeros y oligómeros (Fig. 11A, B).

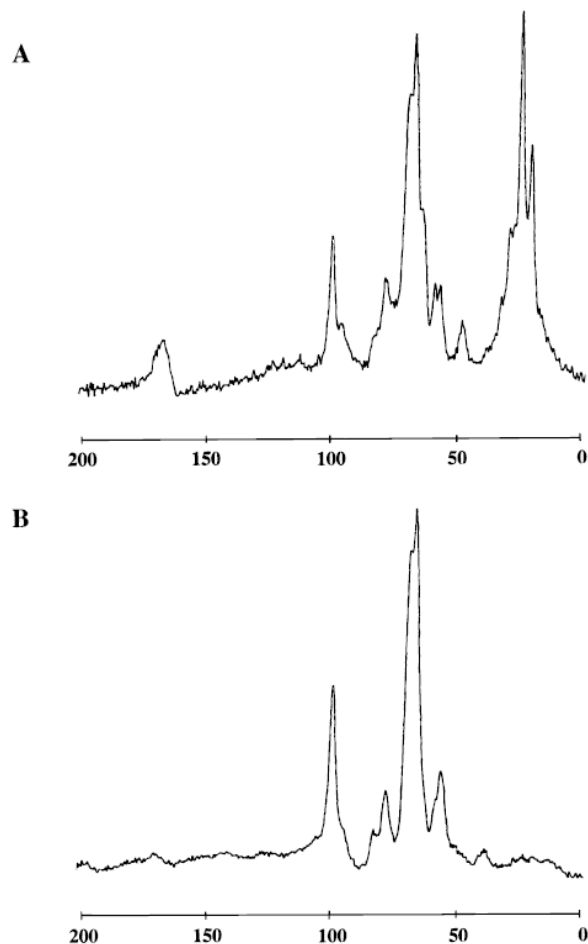


Figura 11. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de (A) cáscara de jitomate seca y (B) residuo de la cáscara de jitomate seco después del tratamiento con 1.5 M KOCH_3 y extracción con CHCl_3 (Osman y col., 1999).

Fang y col. (2001), utilizaron un protocolo para estudiar la cutícula de limón usando ácido fluorhídrico, el cual rompe preferentemente los azúcares de las glicoproteínas y las uniones glicosídicas de azúcares neutros en los polisacáridos. De los productos aislados se lograron identificar las uniones esterificadas de los monómeros presentes, proporcionando nueva información arquitectónica de este importante biopolímero (Fig. 12). Otros análisis realizados en el polímero intacto por medio de ^{13}C NMR-CPMAS, mostraron evidencias de que hay unidades glicosídicas unidas covalentemente a los ácidos grasos hidroxilados.

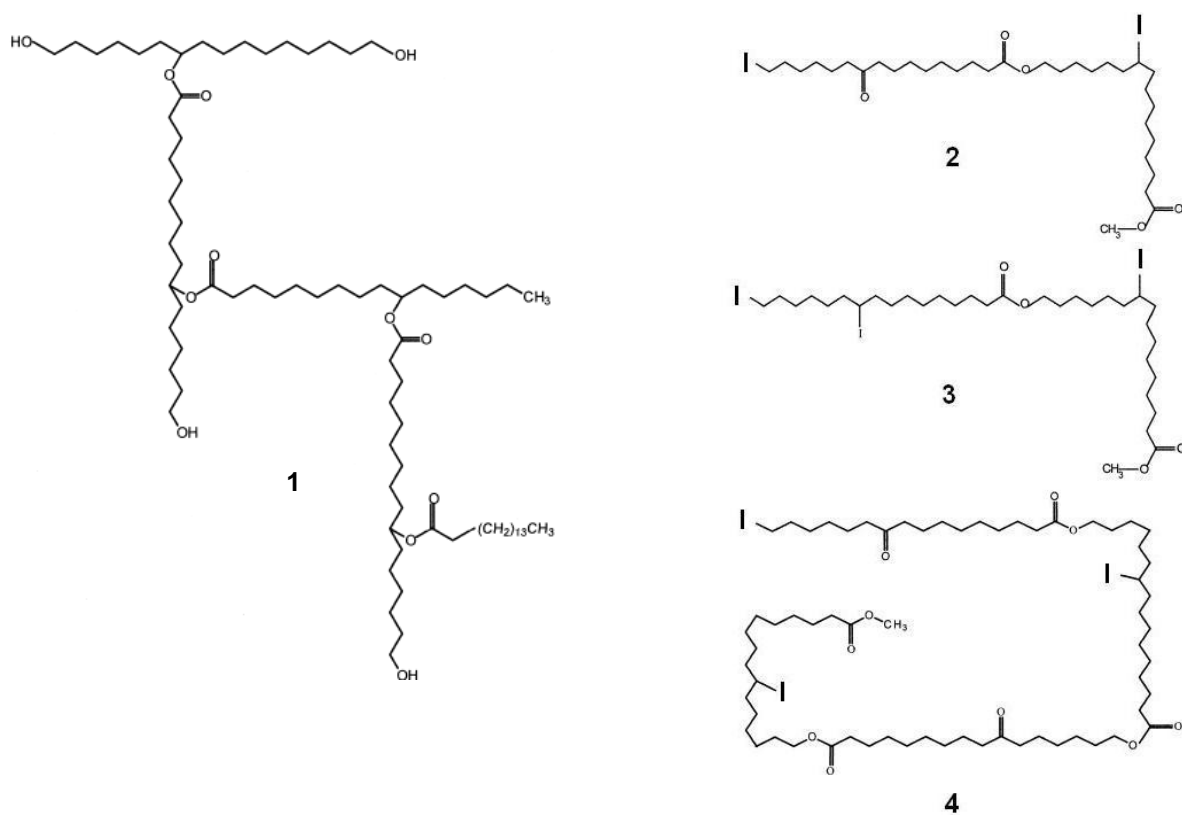


Figura 12. Estructura molecular del 1 Pentámero; 2,3 monómeros; 4 oligómero, obtenidos de la cutícula del limón (Fang y col., 2001).

El primer trabajo detallado de la estructura de la cutina del jitomate, fue realizado por Deshmukh y col., en el 2003. Con la ayuda de la ¹³C NMR-CPMAS en una y dos dimensiones, demostraron la presencia de ácidos grasos α -ramificados y ésteres con hidroxilos a mitad de la cadena, los cuales podrían apuntar hacia los enlaces entrecruzados responsables de la insolubilidad de la cutina (Fig. 13).

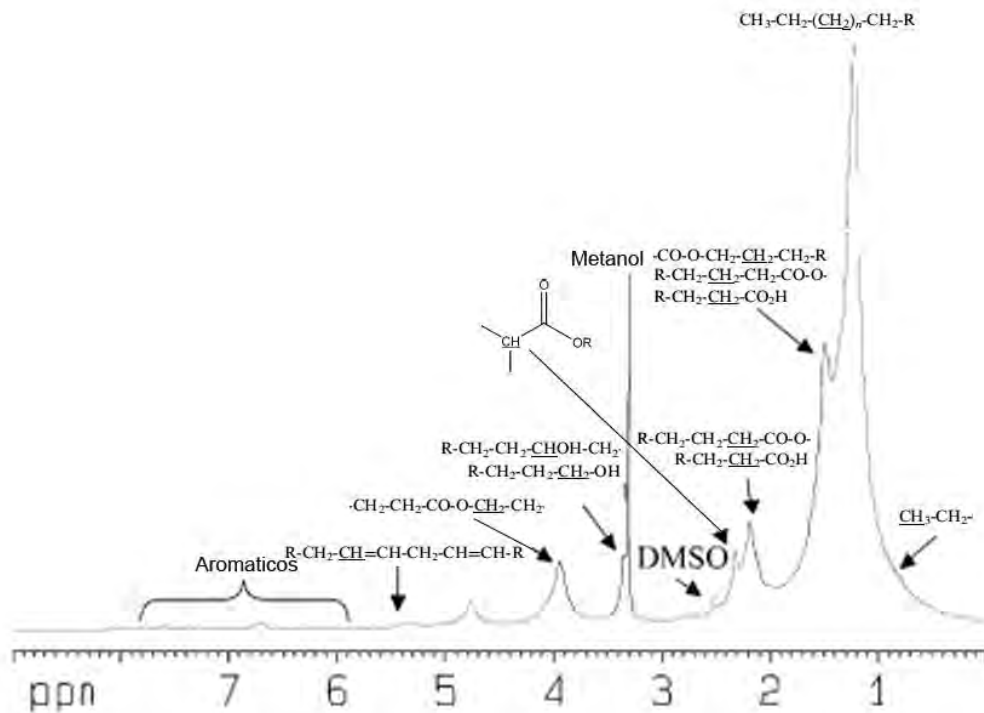


Figura 13. Espectro ^1H HR-MAS NMR de la cutina del jitomate disuelta en DMSO (Deshmukh y col., 2003).

Un año después Benítez y col., realizaron la caracterización molecular de la cutina del jitomate en un fruto joven y uno maduro de manera que pudieron establecer diferencias de los grados de entrecruzamiento del biopolímero. Concluyeron que la textura de las muestras es una consecuencia del grado de entrecruzamiento, de manera que en un fruto joven se pueden observar arrugas suaves y espaciadas (Fig. 14A), mientras que en uno maduro la textura es lisa (Fig. 14B).

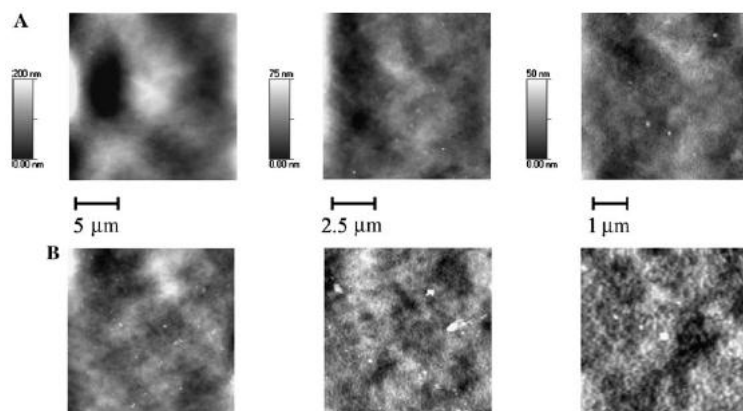


Figura 14. Caracterización de la morfología de la superficie externa de la cutina de un jitomate joven (A) y uno maduro (B) con diferentes resoluciones (Benítez y col., 2004).

Deshmukh y col., (2005) describieron la estructura de la cutina y la mezcla de cutina/cutana encontrada en las hojas de *Agave americana*. Demostraron que la principal diferencia de la cutina del agave con respecto a la del jitomate y limón es la presencia de grupos epóxidos en los monómeros. En cuanto a la cutana descubrieron que aparte de los hidroxilos primarios libres y las cadenas de ácidos carboxílicos que forman las uniones éster con unidades de benceno trihidroxiladas, existen evidencias de ácidos bencenocarboxílicos unidos por enlaces éster a alcoholes grasos (Fig. 15).

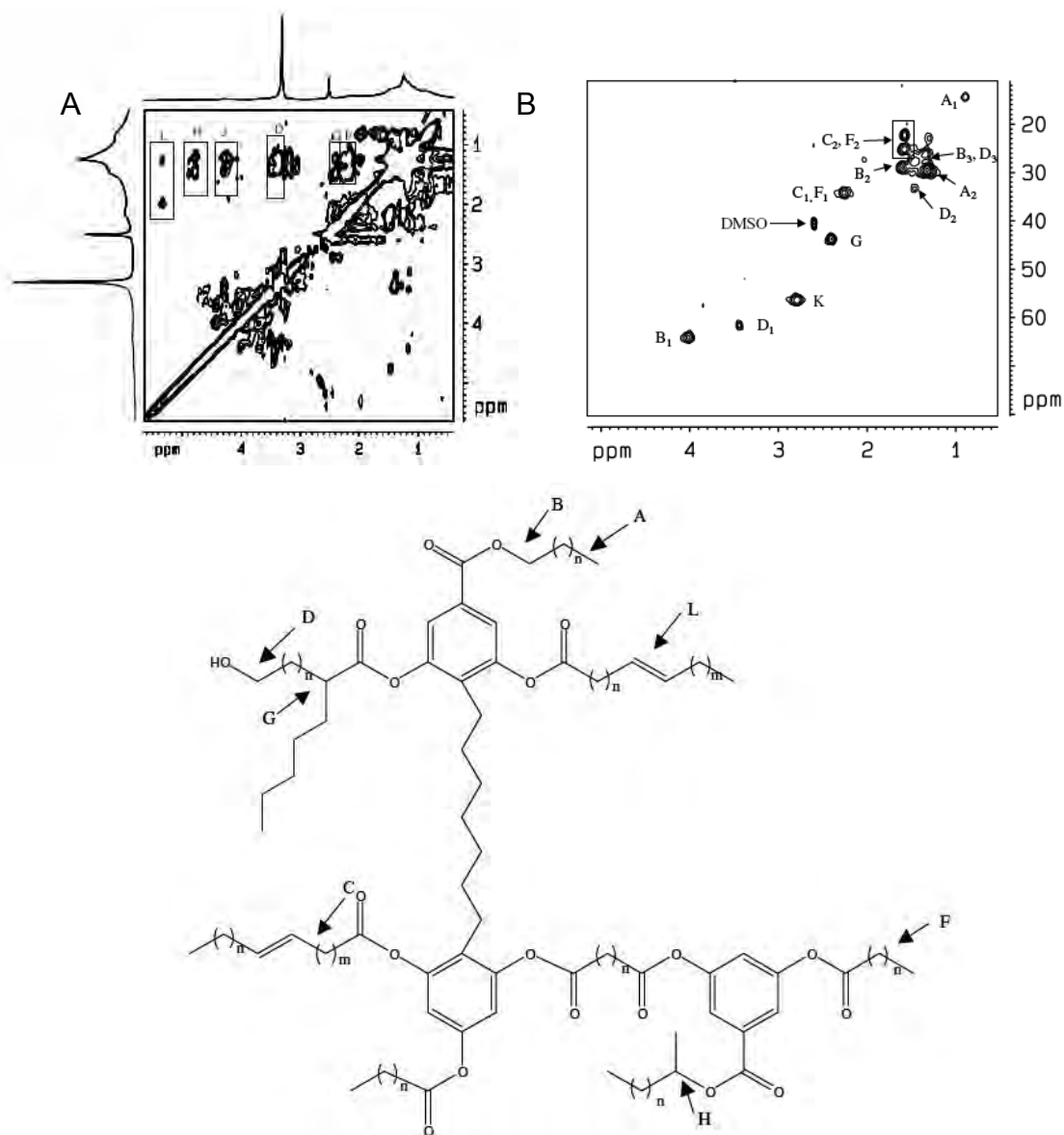


Figura 15. (A) Espectro HR-MAS NMR ^1H - ^1H TOCSY (B) Espectro HR-MAS NMR ^1H - ^{13}C HSQC, de la mezcla de cutina/cutana de *Agave americana* disuelta en DMSO (C) Modelo propuesto de la cutina/cutana (Deshmukh y col., 2005).

En el mismo año Franke y col., llevaron a cabo un estudio de la composición de la cutina y suberina en *Arabidopsis*, donde reportaron que los componentes mayoritarios de la cutina son α,ω -diácidos y α -hidroxi ácidos, lo cual la convierte en una cutina particular ya que tiene similitud con la suberina. Sin embargo, los estudios de la composición de la suberina fueron similares a la de otras especies (ω -hidroxi ácidos, α,ω -diácidos, ácidos carboxílicos, alcoholes y α -hidroxi ácidos) (Fig. 16).

El TFA diluido a diferentes concentraciones y con tiempos variados para la remoción de polisacáridos residuales de la pared celular del peridermo suberizado de la papa, fue implementado por Arrieta-Báez y Stark en el 2006 (Fig. 17). Entre los fragmentos aislados se caracterizaron dos derivados hidroxifenólicos reportados previamente en ligninas y un nuevo trímero éster alifático-aromático, el cual fue identificado provisionalmente. Estos estudios demostraron la importancia del TFA para el estudio de este tipo de materiales, hidrolizando de una manera controlada el dominio alifático presente en la suberina, y de gran interés para su aplicación a cutículas alifáticas, como es el caso de las cutinas.

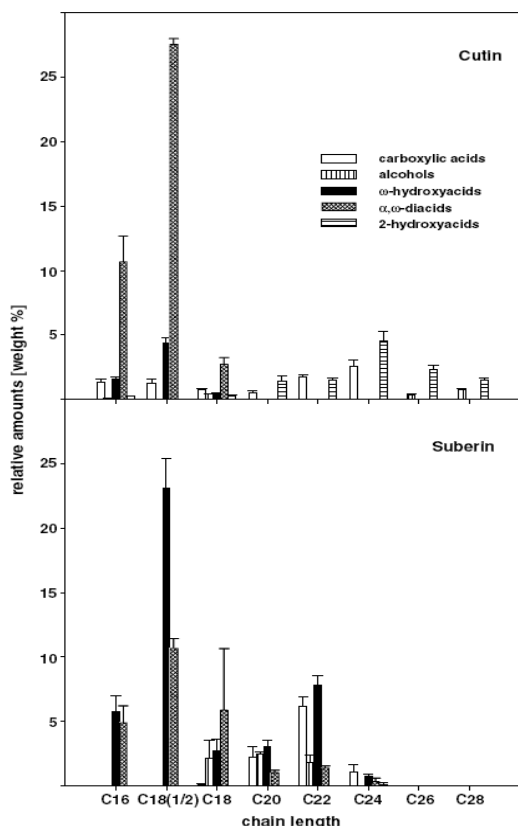


Figura 16. Distribución de la longitud de las cadenas de monómeros alifáticos obtenidos por transesterificación de la cutina y suberina de *Arabidopsis* (Franke y col., 2005).

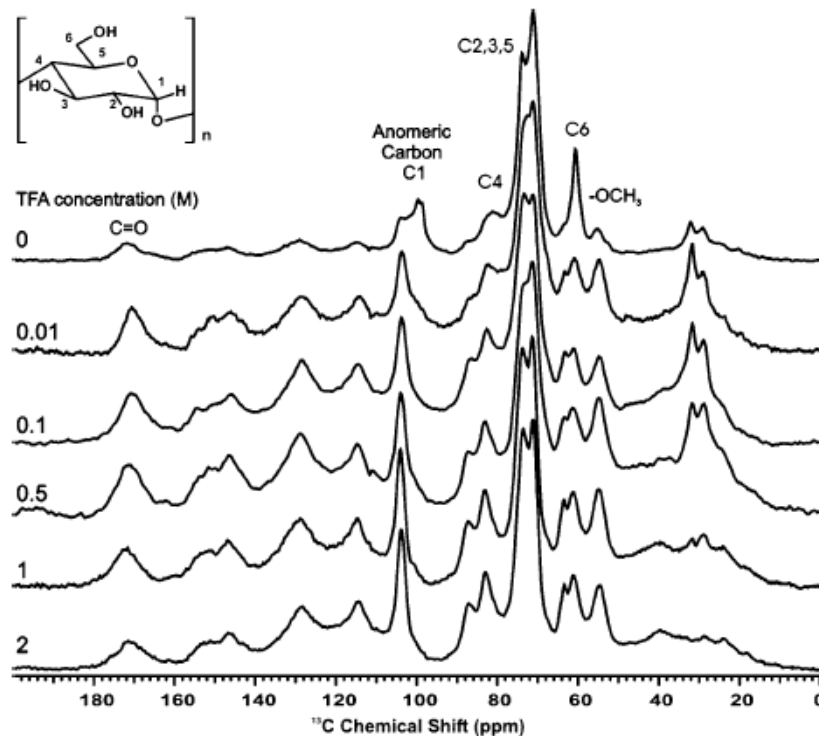


Figura 17. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la suberina purificada de la papa después de diversos tratamientos de 90 minutos a diferentes concentraciones de TFA (Báez y Stark, 2006).

6.1 Trabajos realizados con la toronja.

La cáscara de toronja ha sido objeto de pocos análisis, y en especial de la estructura molecular o composición molecular de su cutícula, estos son casi nulos. La mayoría de los trabajos realizados con toronja están enfocados al estudio de sus metabolitos secundarios, en especial su composición de flavonoides y carotenoides.

Lai y col. (2003) realizaron pruebas con la cáscara de toronja previamente infectada con inóculos de *Penicillium digitatum*. Los estudios demostraron que los tejidos adyacentes a las heridas inoculadas contenían material reactivo al floroglucinol-HCl (por sus siglas en inglés: PG-HCl) así como fragmentos de xilema y cutícula (Fig. 18). La reacción al PG-HCl indica la presencia de tejido no reactivo a la infección, el cual se describe como suberina, cutina o un material gomoso formado de celulosa. Estos resultados demostraron la inducción de

suberina, como un material protector, por medio de un agente infeccioso. Por otro lado hallaron que en la cáscara intacta se encuentran presentes celulosa, hemicelulosa y adicionalmente se encontraron cantidades relevantes de cutina en los residuos de la digestión con enzimas.

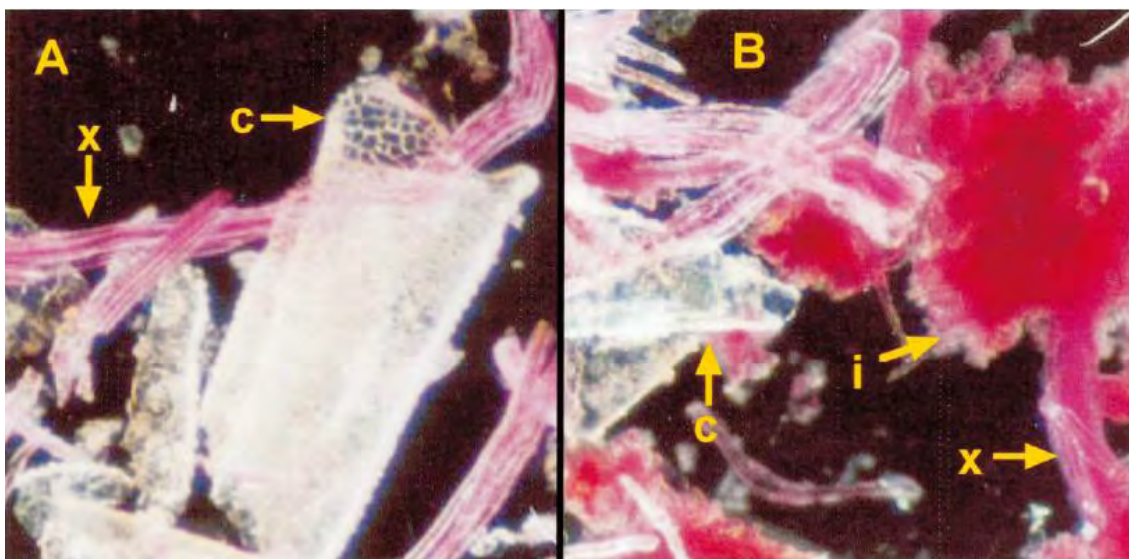


Figura 18. Material (A) control y (B) inoculado, derivado de la cáscara de la toronja, purificado después de la digestión con enzimas. Las muestras se montaron en PG-HCL, el control muestra fragmentos de xilema (x) coloreados y de cutícula (c) sin reacción histoquímica. La muestra B contiene material reactivo de PG-HCL (i), así como fragmentos de xilema y cutícula (Lai y col., 2003).

Giamperi y col. (2004) evaluaron la actividad antioxidante de los extractos de las semillas de la toronja obtenidos, en etanol y en agua, con tres diferentes métodos: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), 5-lipoxigenasa y quimioluminiscencia luminol/xantina/xantina oxidasa. El extracto utilizado en solución acuosa demostró mejores propiedades antioxidantes que el de solución alcohólica.

Manthey y Buslig (2005) aislaron dímeros de bergamotín, 6',7'-dihidroxi bergamotín, 6',7'-epoxi bergamotín y 7-geranyloxicumarina del jugo de la toronja y los analizaron por HPLC-MS (Fig. 19). Otras furanocumarinas que también fueron aisladas, no fueron identificadas, pero tienen el objetivo de analizar los efectos de estos componentes sobre ciertos fármacos posteriormente.

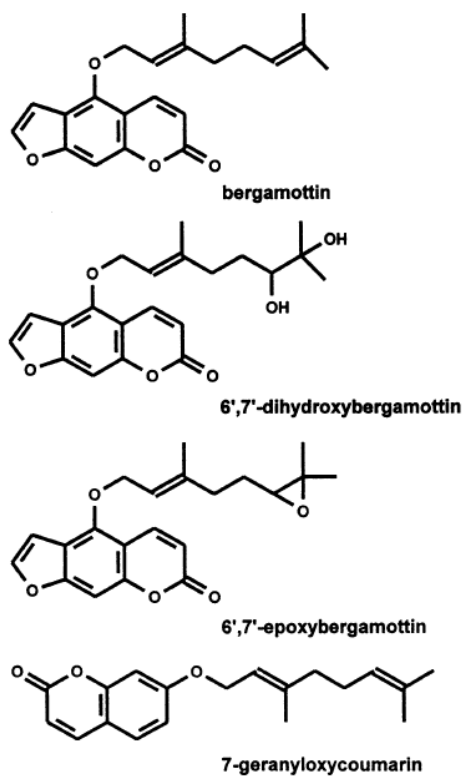


Figura 19. Estructuras de las furanocumarinas aisladas del jugo de la toronja (Manthey y Buslig, 2005).

Peterson y col. (2006) desarrollaron una base de datos de las flavononas (clase dominante de flavonoides del género *Citrus*), documentando y estandarizando por taxones y unidades toda la literatura científica existente acerca de los flavonoides de la toronja, limón y lima (Fig. 20).

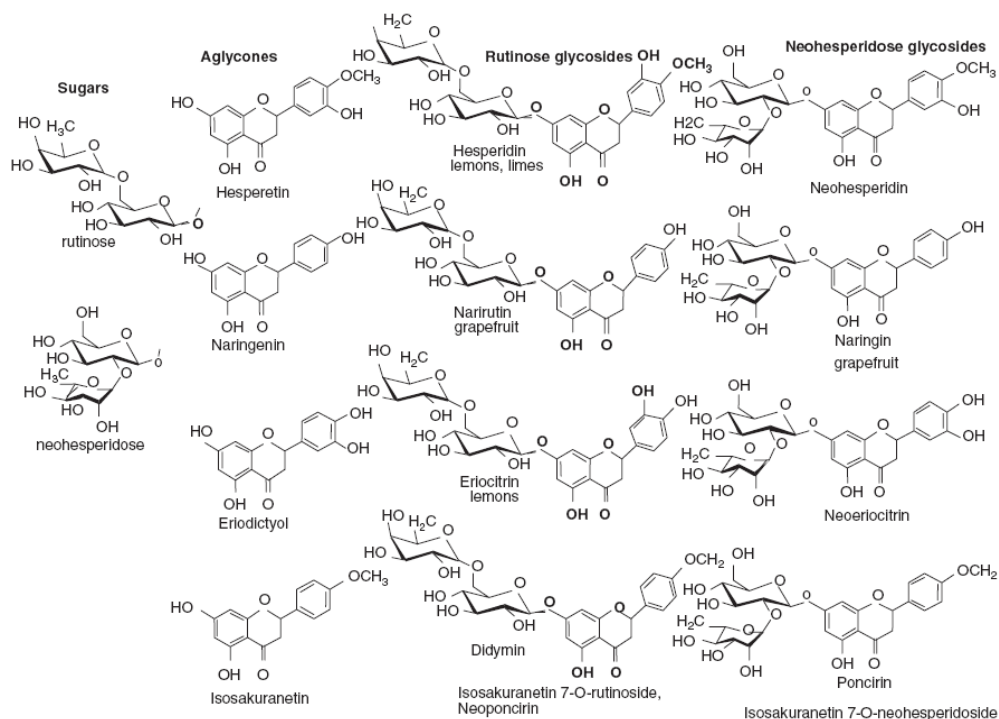


Figura 20. Principales flavononas del género *Citrus* (Peterson y col., 2006).

Agócs y col. (2007) compararon la composición de carotenoides de la cáscara y la pulpa de varios cítricos incluyendo la toronja (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de los carotenoides de la cáscara de diferentes cítricos.

Peak	Carotenoid	Orange	Mandarin	Clementine	Kumquat	Grapefruit	Lemon
1	Unidentified	0.6	0.4	0.2	0.8	1.7	0.5
2	Unidentified	1.4	0.3	0.8	0.8	1.0	0.5
3	Unidentified	2.2	0.6	0.6	0.2	1.1	0.3
4	Unidentified	1.2	0.4	0.7	0.2	5.8	2.5
5	Neochrome	1.6	3.1	5.7	1.5	2.2	4.3
6	Violaxanthin+ furanoid	13.6	8.7	1.4	9.8	8.9	0.2
7	Unidentified	—	2.1	0.7	—	—	—
8	β -Citaurin	10.8	13.3	28.0	16.6	9.3	4.0
9	(Z)- β -citaurin	0.9	1.0	2.1	1.4	1.5	0.1
10	(Z)- β -citaurin	1.0	1.2	2.5	1.0	0.7	0.1
11	Luteoxanthin	2.9	1.6	6.1	3.7	2.1	0.5
12	(9Z)-violaxanthin	33.8	18.0	7.9	16.9	6.4	1.6
13	(13Z)-violaxanthin	1.4	0.3	0.2	1.7	1.7	0.1
14	Lutein	6.6	5.4	4.1	5.5	7.6	8.3
15	Unidentified	—	—	—	2.1	—	—
16	Unidentified	0.8	0.2	0.6	0.8	1.3	1.3
17	Unidentified	0.8	0.3	1.0	0.8	1.3	1.0
18	Monofuranoid like (λ_{max} =450, 423 nm)	0.9	0.6	0.4	1.1	0.7	1.4
19	Cryptochrome	3.5	2.8	2.8	5.7	4.3	1.4
20	Diepoxide like	0	1.4	1.9	0	0	7.4
21	Unidentified	0.4	0.4	1.6	0.8	1.2	10.9
22	Monoepoxide like (λ_{max} =475, 450 nm)	—	—	—	1.2	1.5	3.1
23	Monofuranoid like (λ_{max} =450, 423 nm)	2.1	4.5	3.7	3.8	2.1	7.9
24	α -Cryptoxanthin	0.3	0.3	0.2	0.2	1.4	1.5
25	β -Cryptoxanthin	3.5	23.4	13.4	11.4	11.3	19.9
26	(Z)- β -cryptoxanthin	1.2	3.9	4.0	2.8	1.6	3.6
27	ξ -Carotene	1.2	1.8	0.3	0.9	7.5	7.2

Debido al reciente interés por las propiedades anticancerígenas del ácido D-glucárico, Perez y col. (2008) desarrollaron un método para cuantificarlo por medio de cromatografía de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés: HPLC) en nueve variedades de toronja. Notaron que los niveles del ácido aumentan de acuerdo a la madurez del fruto. Este fue el primer trabajo de cuantificación de dicho ácido en diferentes variedades de toronja y en diferentes fechas de cosecha (Fig. 21).

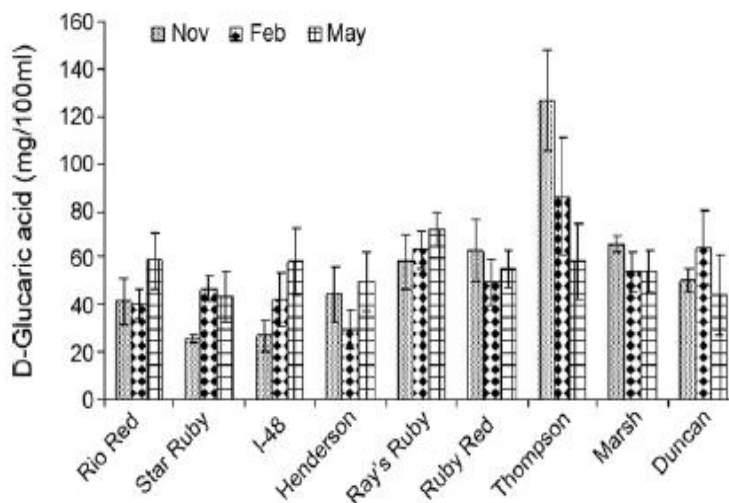


Figura 21. Contenido de ácido D-glucárico obtenido por HPLC de nueve variedades de toronja en tres fechas diferentes (Pérez y col., 2008).

7. Técnicas utilizadas para la obtención y el estudio de cutículas.

7.1 Químicas.

Oxalato de amonio – la separación física de la cutícula y la pectina se ha hecho con un buffer de oxalato de amonio en vez de utilizar pectinasa de *A. niger*, lo cual no ha dado resultados tan favorables debido a que el oxalato queda atrapado en la matriz polimérica, y aún con sucesivos tratamientos enzimáticos y lavados, no se elimina completamente quedando rastros del mismo (Pacchiano *et al.*, 1993).

KOH - La hidrólisis con una solución metanólica de hidróxido de potasio ha sido utilizada con éxito en varios protocolos para obtener monómeros y oligómeros

de la cutina de frutos como el limón y el jitomate (Ray *et al.*, 1995; Osman *et al.*, 1995).

TFA - El Ácido Trifluoroacético se ha utilizado en vez del ácido clorhídrico y el ácido sulfúrico en el análisis de polisacáridos no celulósicos de la pared celular de las plantas así como en el análisis de azúcares neutros y ácidos del suelo. El TFA es un ácido de similar fuerza a la de los ácidos anteriormente mencionados, pero posee una característica que lo hace muy práctico; debido a su volatilidad puede ser removido fácilmente por medio de evaporación o liofilización (Amelung *et al.*, 1996; Morrison y Stewart, 1998). Por otro lado se piensa que el TFA hincha las moléculas de manera que deja salir lo que se encuentra atrapado, en este caso a los polisacáridos (Arrieta-Baez y Stark, 2006).

HF – El ácido fluorhídrico se ha utilizado preferentemente para romper enlaces glicosídicos de azúcares neutrales en polisacáridos, produciendo así oligómeros solubles que retienen enlaces éster con azúcares de los polisacáridos de la pared celular de la cutina, dando así información importante acerca de la composición y arquitectura de este poliéster (Fang *et al.*, 2001)

6.2 Análisis espectroscópico.

La determinación estructural de los compuestos orgánicos es parte muy importante de la química orgánica; siempre que se obtiene un compuesto nuevo es esencial conocer su estructura y confirmarla, de manera que posteriormente se puedan hallar formas de sintetizarlo y se puedan emprender otros estudios como determinar su comportamiento biológico. Para ello se hace uso de técnicas espectroscópicas. La espectroscopia es el estudio de la interacción del espectro electromagnético con una muestra (Yurkanis, 2008).

Algunas de las técnicas espectroscópicas más utilizadas para la determinación estructural de las cutículas y de los compuestos orgánicos en general son:

- *Espectroscopia Infrarroja (IR)*: Es el estudio de la interacción de la radiación infrarroja con una muestra. Una forma de definir su frecuencia es el número de ondas en cm^{-1} , es por esto que sus unidades son centímetros recíprocos (Yurkanis, 2008).

La incidencia de la radiación infrarroja, que es parte del espectro electromagnético, hace que los enlaces entre dos átomos se comportan como resortes, ya sea que experimente movimientos de estiramiento y/o de flexión, simétricos o asimétricos y en un plano o fuera de él, por lo que estos movimientos se pueden clasificar como: vibraciones de estiramiento simétrico o asimétrico, vibraciones de flexión simétrica: en el plano (tijeras) y fuera del plano (torsión), y vibraciones de flexión asimétrica: en el plano (oscilación) y fuera del plano (balanceo) (Yurkanis, 2008). Las vibraciones de determinado enlace suceden con una frecuencia característica y es precisamente lo que presenta la radiación infrarroja, siendo los límites de número de onda de 4000 a 600 cm^{-1} (Yurkanis, 2008).

Un espectro infrarrojo se obtiene haciendo pasar radiación infrarroja a través de la muestra de un compuesto (sólido, líquido o gas), obteniendo una gráfica con picos hacia abajo, llamados bandas de absorción, los cuales muestran la absorción de energía dependiendo del tipo de enlace. Esta característica hace de la espectroscopia del infrarrojo una técnica muy importante para determinar la presencia de grupos funcionales en las muestras analizadas (Yurkanis, 2008). Actualmente existe un nuevo espectrofotómetro con transformada de Fourier en IR (FT-IR), el cual es más sensible porque en lugar de explorar las frecuencias una por una, puede medir todas en forma simultánea, la información se digitaliza y con una computadora se determina su transformada de Fourier para finalmente producir el espectro FT-IR (Yurkanis, 2008).

Un espectro infrarrojo se divide en dos zonas: de 4000 a 1400 cm^{-1} se encuentra la región correspondiente a diferentes vibraciones (estiramiento, distorsiones dentro y fuera del plano) que caracterizan a los grupos funcionales y de 1400 a 600 cm^{-1} donde se encuentra la región dactiloscópica, la cual es característica de cada compuesto (Yurkanis, 2008).

- *Resonancia Magnética Nuclear* (NMR): esta técnica ayuda a identificar los carbonos e hidrógenos en un compuesto orgánico y posee una ventaja sobre las demás, ya que no sólo hace posible identificar la funcionalidad en un carbono

específico, sino que también permite determinar la conexión entre carbonos vecinos (Yurkanis, 2008).

Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H NMR)

En general se utiliza el acrónimo “NMR” para referirse a la ^1H NMR. Esta técnica se utiliza únicamente para estudiar núcleos que poseen un número impar de protones o neutrones o ambos, algunos ejemplos son los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, debido a que su número cuántico de espín es distinto a cero y cuando giran generan un campo magnético parecido al que generaría un imán pequeño. En ausencia de un campo magnético aplicado, los espines nucleares se orientan aleatoriamente, sin embargo cuando una muestra se coloca entre los polos de un imán potente, los núcleos con espín positivo se orientan en forma paralela al campo; denominado estado de espín *alfa*, contrariamente los núcleos con espín negativo se orientan en dirección antiparalela al campo magnético; denominado estado de espín *beta* (Yurkanis, 2008; SINORG).

La diferencia de energía (ΔE) entre los dos estados de espín *alfa* y *beta* depende de la fuerza del campo magnético aplicado, B_0 , de manera que cuanto mayor sea el campo magnético, habrá mayor diferencia de energía entre los dos estados de espín (SINORG; Yurkanis, 2008).

Cuando se irradia una muestra brevemente con un impulso cuya energía es igual a la diferencia de energías entre ambos estados del espín, los núcleos en estado alfa son llevados a un estado beta, a esta transición se le llama “inversión del espín”. La radiación que se utiliza se encuentra en la región de las radiofrecuencias (rf) del espectro electromagnético por eso se le denomina radiación rf. Cuando los núcleos absorben la radiación rf invierten su espín produciendo señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía entre los estados de espín *alfa* y *beta*, estas señales son detectadas por el espectrómetro de NMR y registradas como una gráfica de frecuencia de señal contra intensidad, resultando en un espectro de NMR. El término resonancia magnética nuclear procede del hecho de que los núcleos están en resonancia con

la radiofrecuencia o la radiación rf, es decir, los núcleos pasan de un estado de espín a otro como respuesta a la radiación rf a la que son sometidos (SINORG; Yurkanis, 2008).

Los espectrómetros de NMR (Fig. 22) actualmente funcionan con frecuencias entre 60 y 900MHz, así mientras mayor sea la frecuencia de operación y mientras más potente sea el magneto, mejor será la resolución del espectro (SINORG; Yurkanis, 2008).

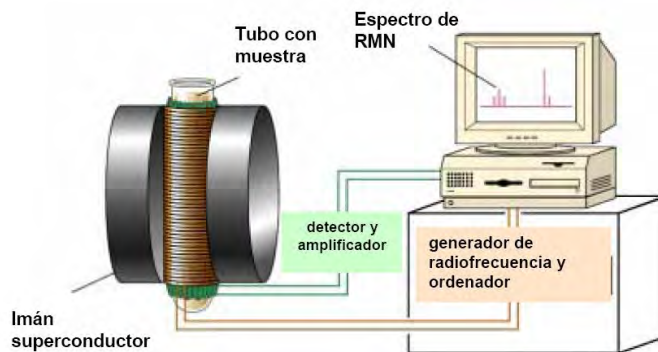


Figura 22. Diagrama de un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (SINORG).

Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C

Los principios de ambas NMR son en esencia iguales, aunque existen algunas características que los diferencian, por otro lado cabe mencionar que la resonancia magnética nuclear de ^{13}C es complementaria a la de ^1H . La primera determina los átomos de carbono, mientras que la segunda determina los átomos de hidrógeno (SINORG).

Aproximadamente el 99% de los átomos de carbono en una muestra natural son del isótopo ^{12}C , el cual carece de espín magnético de manera que no puede dar lugar a señales de resonancia magnética nuclear, es por eso que las señales de ^{13}C son más débiles que las de ^1H , sólo el 1% de los átomos de carbono posee espín y por tanto es muy pequeña la probabilidad de que un núcleo de ^{13}C esté adyacente a otro núcleo de ^{13}C (SINORG).

Una de las ventajas de la ^{13}C NMR con respecto a la de protón es que los desplazamientos químicos de los átomos de carbono se extienden sobre unas 200 ppm, los de protón se extienden alrededor de 12 ppm, lo cual hace menos probable que las señales se traslapen. Una desventaja de la ^{13}C NMR es que el

área bajo una señal no es proporcional al número de carbonos que la producen, así que no se puede determinar su número por integración (SINORG).

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE SÓLIDOS (^{13}C NMR-CPMAS)

Un espectro de NMR convencional de un líquido o una disolución está formado por señales muy estrechas y bien resueltas que contienen información molecular. Sin embargo, un experimento similar con un sólido produce señales muy anchas, que pueden llegar a ser de varios kHz o incluso MHz, lo que impide la obtención de información de manera fácil. Este ensanchamiento implica, además, una pérdida de sensibilidad, especialmente cuando se estudian núcleos poco abundantes como, por ejemplo, el ^{13}C (1.1 %). La diferencia en la forma de línea de sólidos y líquidos proviene de la diferente movilidad de las moléculas. En estado líquido o en disolución, las moléculas se reorientan muy rápidamente promediando las interacciones anisótropas, que están presentes en muestras sólidas. De este modo, la obtención de espectros de alta resolución de sólidos exige la aplicación de técnicas especiales.

Anisotropía de desplazamiento químico

La anisotropía de desplazamiento químico proviene de la interacción del campo magnético externo B_0 con los electrones que rodean el núcleo, que también poseen momento magnético.

Los campos magnéticos secundarios débiles que se generan se suman o restan a B_0 , modificando el campo magnético efectivo (H_e) que experimenta el núcleo de ^{13}C o ^1H , y por lo tanto su frecuencia de resonancia. Cuando H_e disminuye se denomina “protección diamagnética o apantallamiento”, cuando H_e aumenta se denomina “paramagnetismo, desprotección o desapantallamiento”. Ambos dan lugar al desplazamiento químico.

Giro al ángulo mágico (por sus siglas en inglés: Magic Angle Spinning; MAS)

El giro al ángulo mágico se utiliza rutinariamente en la mayoría de los experimentos de NMR de estado sólido. El objetivo fundamental es eliminar la

anisotropía del desplazamiento químico, y ayudar en la anulación de las interacciones dipolares heteronucleares. Además, también se utiliza para estrechar las líneas de núcleos cuadrupolares y disminuir los efectos del acoplamiento dipolar homonuclear. Cuando el vector internuclear forma un ángulo $\theta=54.74^\circ$, el ángulo mágico, con el campo estático, el término $(3\cos^2\theta-1)=0$ y las interacciones dipolares heteronucleares se anulan. Asimismo, también se anulan la anisotropía de desplazamiento químico cuando el eje principal z de la molécula forma el ángulo mágico con el campo estático B_0 .

Polarización cruzada (por sus siglas en inglés: Cross Polarization; CP)

La detección directa de núcleos diluidos como el ^{13}C , el ^{29}Si o el ^{15}N conduce normalmente a una baja polarización de espín por su escasa abundancia isotópica y su baja γ , y por lo tanto, a una relación señal/ruido baja. Además, los tiempos de relajación son largos debido a la ausencia de interacciones dipolares homonucleares asociados a núcleos poco abundantes. Para aumentar la intensidad de la señal de núcleos escasos como el ^{13}C y el ^{15}N , muchos experimentos de RMN de estado sólido incluyen la transferencia de polarización de núcleos abundantes (normalmente ^1H) utilizando una técnica que se denomina polarización cruzada (PC), normalmente combinada con el MAS (CP/MAS).

Espectrometría de masas

Otra técnica muy importante para completar los estudios de elucidación estructural de los compuestos es la espectrometría de masas (EM). Esta técnica permite determinar la masa molecular y la fórmula molecular de un compuesto por medio de la relación masa/carga (m/z), además puede ayudar a elucidar algunas de sus características estructurales. La medición de las masas moleculares involucra tres pasos básicos: producción, separación y detección de iones moleculares en fase gaseosa; los iones moleculares con distinto número de cargas y de m/z se originan de cada molécula. Una de las ventajas de este tipo de análisis es que se necesitan bajas concentraciones de la muestra (picomoles). La muestra se introduce en un aparato llamado espectrómetro de masas (Fig.23),

donde se vaporiza y después se ioniza (de cada molécula se elimina un electrón) (Yurkanis, 2008).

Existen varias técnicas de ionización en espectrometría de masas:

Ionización en fase gaseosa: Ionización electrónica (EI), Ionización química (CI), Ionización de campo (FI) (SINORG; Yurkanis, 2008).

Ionización por desorción: Desorción de campo (FD), Bombardeo con átomos rápidos (FAB), Espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), Ionización por termonebulización (TS), Ionización por electrovaporización (ESI), Ionización química a presión atmosférica (APCI), Desorción de matriz asistida por LASER (MALDI) (SINORG; Yurkanis, 2008).

En este estudio utilizamos la ionización electrónica. En esta técnica, las moléculas se bombardean con un haz de electrones (70eV), cuando este choca con una molécula, expulsa un electrón produciendo así iones positivos y negativos, los iones son expulsados de la cámara y dirigidos al tubo analizador el cual hace que los fragmentos con carga positiva tomen una trayectoria curva, el grado con el que se desvía la trayectoria depende la relación de m/z , de esta manera se pueden separar las partículas dependiendo de sus valores de m/z . Cuando llegan al detector, este registra la cantidad relativa de los fragmentos con determinada m/z que pasan por la rendija, dando como resultado un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de cada fragmento (Yurkanis, 2008).

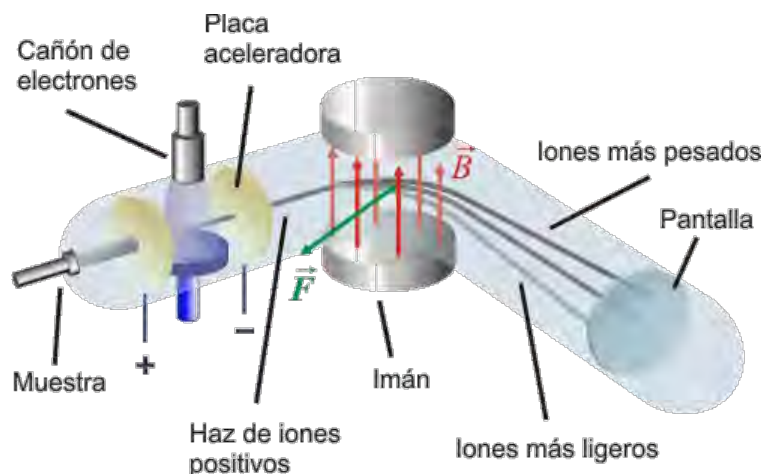


Figura 23. Diagrama de un espectrómetro de masas (EUIT).

OBJETIVOS

General:

- Estudiar la estructura química de la cutícula de dos variedades de toronja.

Particulares:

- Obtener la cutícula de dos variedades de toronja.
- Analizar las cutículas obtenidas por medio de resonancia magnética nuclear de sólidos.
- Estudiar la reacción de hidrólisis con TFA y KOH.
- Analizar los componentes solubles e insolubles por medio de métodos espectroscópicos.
- Estudiar la polimerización del monómero principal con lipasas.

JUSTIFICACIÓN

Por sus funciones biológicas, las cutinas representan un factor importante en la conservación y preservación de los frutos. El intercambio controlado de agua en un ambiente estéril, aunado a la protección que brindan en contra de patógenos permite un determinado tiempo de vida de anaquel. De la misma manera, las interacciones que tienen con el medio ambiente determinan el intercambio con agentes químicos externos tales como los insecticidas, herbicidas, etc.

La composición monomérica de algunas cutículas, como el limón y el jitomate, es ampliamente conocida, sin embargo la estructura tridimensional aún permanece sin elucidarse. Es de vital importancia conocer y entender cómo se dan las uniones entre monómeros y con otros componentes presentes en las cutículas, tales como los polisacáridos, para poder estudiar las dinámicas de interacción entre el fruto y su medio (herbicidas y patógenos) y el proceso de conservación en anaqueles. De la misma manera, esta información resultará útil para poder obtener especies genéticamente más resistentes a ciertos factores bióticos y abióticos.

La cáscara de toronja representa un buen material de estudio por las siguientes razones: a) tenemos el antecedente de que el grupo de los cítricos tiene una composición monomérica parecida, la cual deriva de ácidos lineales hidroxilados de dieciséis carbonos, b) los trabajos realizados con toronja son escasos y en ninguno se refiere a la arquitectura tridimensional de su cutícula; y c) este cítrico ha tomado mucha importancia en el mercado nacional y mundial, por lo que nuestro trabajo es una aportación más para el esfuerzo que se está haciendo por obtener especies más resistentes.

Es importante recalcar que el conocimiento detallado de la arquitectura molecular de las cutinas de las plantas puede señalar el camino hacia el diseño de protocolos mejorados para la protección de los cultivos así como la creación de materiales plásticos, no derivados del petróleo, no tóxicos, biodegradables y obtenidos de desechos agroindustriales.

REACTIVOS

Acetato de etilo

Acetato de sodio

Acetonitrilo

Ácido acético

Ácido clorhídrico

Ácido sulfúrico

Ácido Trifluoroacético

Agua

Alfa-naftol

Celulasa de *Aspergillus niger*

Diclorometano

Dietanolamina

Hemicelulasa de *A. niger*

Hexano

Hidróxido de potasio

Metanol

Pectinasa de *A. niger*

Tolueno

2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

Enzimas

Lipasa de *Candida antartica*

Lipasa de *Pseudomonas cepacia* sp

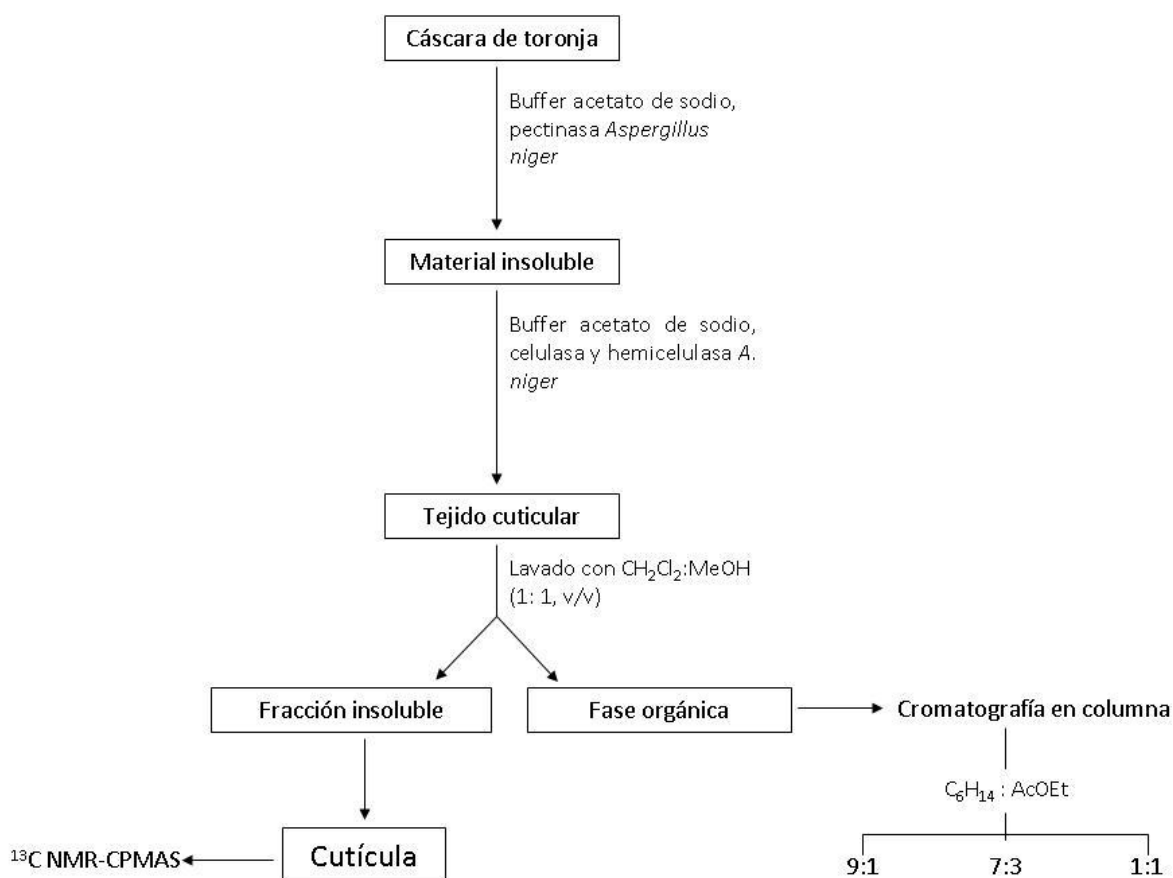
Polvos Acetónicos de hígado de borrego

Material para cromatografía

Sílica gel

Placas de sílica gel

METODOLOGÍA



Esquema 1. Diagrama de flujo para la obtención de la cutícula de toronja.

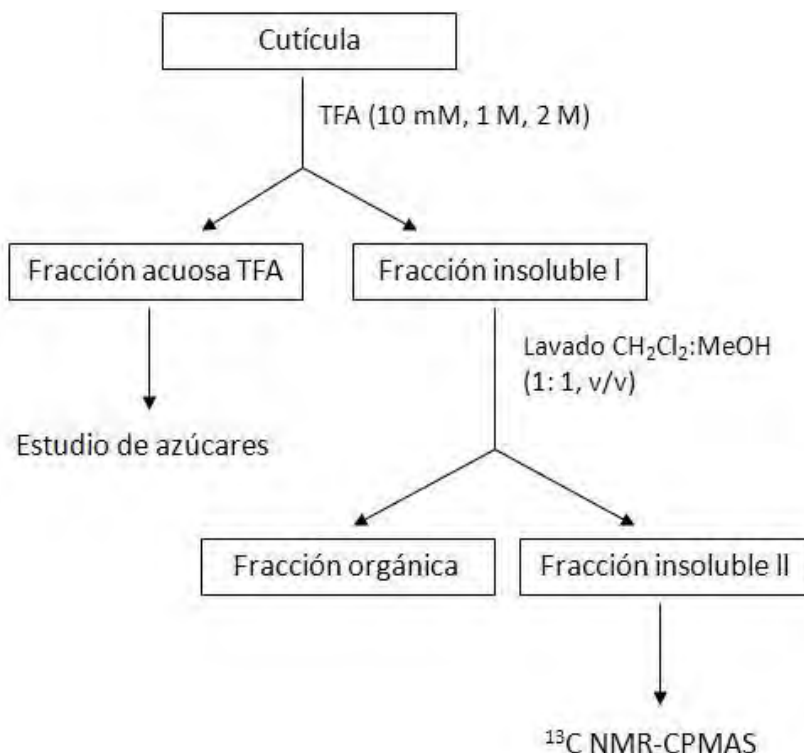
OBTENCIÓN DE LA CUTÍCULA

Las variedades de toronja, *Citrus paradisi* (Macf.) que se utilizaron fueron la Michoacana o ruby red y la Veracruzana; star rubi o doble rojo. La primera se obtuvo de Lázaro Cárdenas, Michoacán y la segunda se compró en la Central de Abasto de la Ciudad de México, proveniente de Tolome, Veracruz. La cáscara obtenida de las toronjas se dejó en agitación durante 5 días a 150 rpm a 44 °C en una solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM a pH 4 con 10 ml/L de pectinasa de *Aspergillus niger*, Transcurrido el tiempo el material cuticular se lavó con abundante agua y se dejó en una solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM a pH 5 con 1 g/L de celulasa y 1 g/L de hemicelulasa de *A. niger*, durante 5 días a 150 rpm a 37 °C. Transcurrido el tiempo el material se lavó con abundante

agua. El tejido cuticular se lavó con una mezcla de diclorometano:metanol (1:1, v/v) durante 2 horas, se filtró y la fase orgánica se apartó. El procedimiento se repitió una vez más y la cutícula obtenida se dejó secar por completo a temperatura ambiente para su posterior análisis por medio de ^{13}C NMR-CPMAS (Esquema 1).

ANÁLISIS DE LA FASE ORGÁNICA

La fase orgánica se concentró por medio de un rotavapor. El extracto obtenido fue objeto de una cromatografía en columna con sílica gel (tamaño de poro de 0.063-0.200 mm) y se eluyó con sistema de hexano:acetato de etilo (9:1, 7:3 y 1:1, v/v) como fase móvil. La separación fue seguida por cromatografía en capa fina eluída con un sistema hexano:acetato de etilo (7:3, v/v) y revelada con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) para detectar compuestos con actividad antioxidante. Las fracciones puras fueron analizadas por ^{13}C NMR-CPMAS y EM para elucidar su estructura.



Esquema 2. Hidrólisis de la cutícula con Ácido Trifluoroacético (TFA).

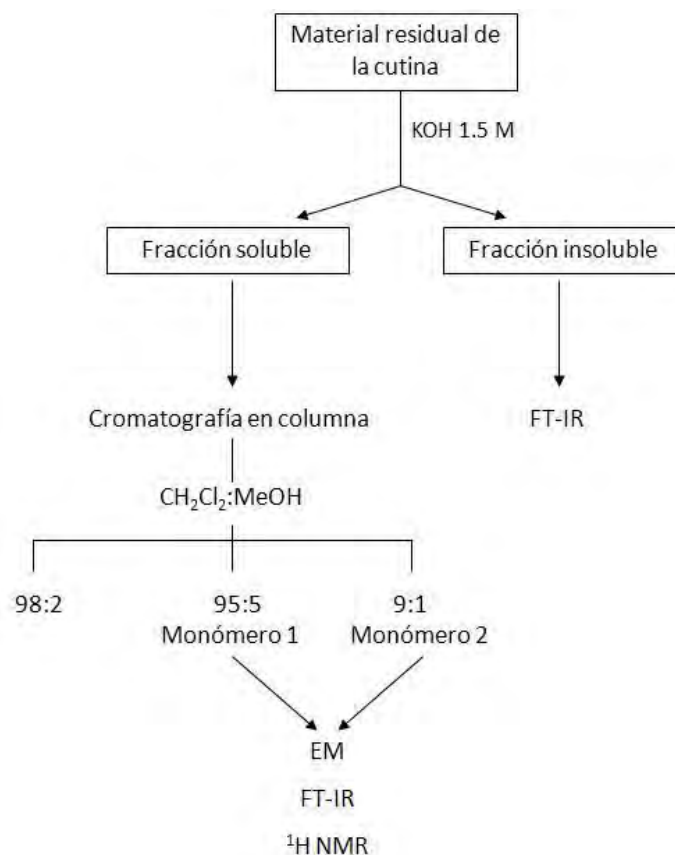
ANALISIS DE LA HIDRÓLISIS DE LA CUTÍCULA CON TFA

La cutícula se dejó en agitación durante 2 horas a 110-115 °C, en una solución de TFA (10 mM, 1 M, 2 M). Transcurrido el tiempo, la solución se filtró; la fracción acuosa de TFA se concentró en un rotavapor y el concentrado se guardó para estudios posteriores. La fracción insoluble I se lavó durante media hora con una mezcla de diclorometano:metanol (1:1, v/v) se filtró (Fracción insoluble II), se dejó secar a temperatura ambiente y se analizó por medio de ¹³C NMR-CPMAS. La fracción orgánica se concentró en un rotavapor y el extracto fue objeto de una separación cromatográfica en columna (Esquema 2).

ESTUDIO DE AZÚCARES EN CAPA FINA

El extracto de la fracción acuosa TFA fue objeto de un análisis para detectar la presencia de azúcares por medio de cromatografía en capa fina.

Las placas de sílica gel se impregnaron con una mezcla de dietanolamina 0.1 M y de ácido acético 10 mM, en acetonitrilo y se activaron a temperatura ambiente por una hora. Las muestras fueron eluidas con acetonitrilo:agua (80:20, v/v), y reveladas con una solución de *alfa*-naftol al 4% en etanol, ácido sulfúrico y agua (80:10:10, v/v) calentando en una plancha a 100 °C. Se utilizaron referencias de glucosa, fructosa y galactosa.



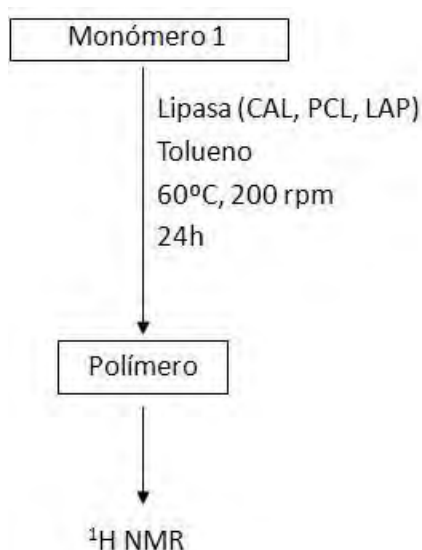
Esquema 3. Hidrólisis del material residual de la cutina con Hidróxido de Potasio (KOH).

HIDRÓLISIS DEL MATERIAL CUTICULAR CON KOH

La fracción insoluble II (material residual de la cutina) de la hidrólisis anterior se dejó en reflujo durante 22 a 24 h en una solución de KOH 1.5 M. Pasado este tiempo se filtró; la fracción insoluble se dejó secar a temperatura ambiente y se analizó por medio de ^{13}C NMR-CPMAS y FT-IR.

La fracción soluble se concentró a presión reducida en un rotavapor y el concentrado fue objeto de una cromatografía en columna de sílica gel (tamaño de poro de 0.063-0.200mm) y se eluyó con los siguientes sistemas: diclorometano:metanol (98:2, 95:5, 9:1, v/v), para obtener el monómero 1 (21.7%); y el monómero 2 (14.7%). La separación fue seguida por cromatografía en capa fina eluída en un sistema de cloroformo:metanol (9:1, v/v) y los compuestos

obtenidos se analizaron por espectroscopias tales como EM, FT-IR y ^1H NMR (Esquema 3).



Esquema 4. Reacciones de polimerización del monómero 1.

REACCIONES DE POLIMERIZACIÓN DEL MONOMERO 1

Para cada caso se utilizó 20 mg de:

Lipasa de *Candida antarctica* (CAL)

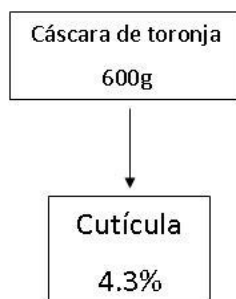
Lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PCL)

Polvo acetónico de hígado de borrego (LAP) (Pacheco y col., 2006)

10 mg de monómero 1 y 1 ml de tolueno previamente calentado a 60 °C. Las soluciones se dejaron en agitación a 200 rpm a una temperatura de 60 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo cada solución se filtró para recuperar la enzima, lo restante se secó y se analizó por ^1H NMR (Esquema 4).

RESULTADOS

Después de los tratamientos enzimáticos a los que se sometió la cáscara de toronja (600g peso fresco) obtuvimos 2.6 g de cutícula, es decir, aproximadamente el 4.3%.



La cromatografía en columna que se llevó a cabo con el concentrado de la fase orgánica obtenida del proceso enzimático de la obtención de las cutículas dio como resultado la obtención de tres compuestos: bergaptol (compuesto A), geranil cumarina (compuesto B) y naringenina (compuesto C), los cuales al ser revelados por cromatografía en capa fina con DPPH demostraron tener propiedades antioxidantes (Fig. 24).

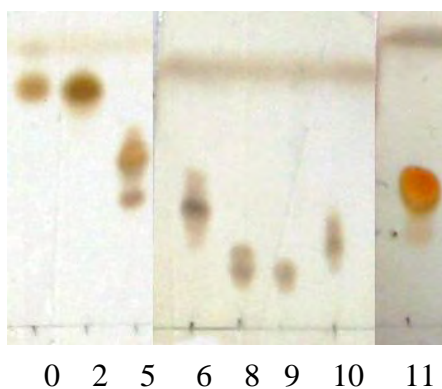
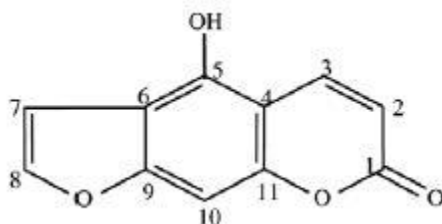


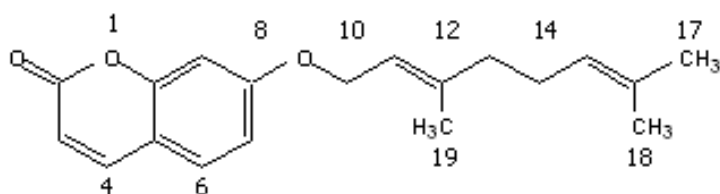
Figura 24. Cromatografía en capa fina que muestra los principales compuestos solubles presentes en la cáscara de la toronja. Fcc. 6: Bergaptol, Fcc. 9: Geranil cumarina, Fcc. 11: Naringenina. Las placas fueron eluidas con hexano:acetato (7:3, v/v) y reveladas con sulfato sérico.

De la fracción 6 del sistema hexano:acetato de etilo (9:1, v/v) se obtuvo el siguiente compuesto:



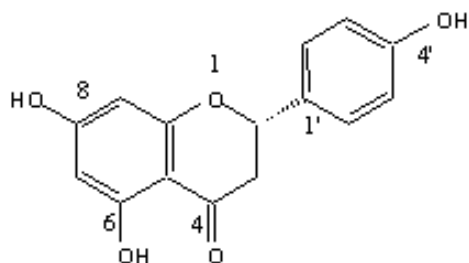
Compuesto A: Bergaptol. Sólido de color crema $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 6.28 (1H, *d*, $J = 9.9$ Hz, H-3), 7.32 (1H, *s*, H-8), 7.75 (1H, *m*, H-9), 7.82 (1H, *d*, $J = 2.2$ Hz, H-10), 8.61 (1H, *d*, $J = 9.9$ Hz, H-4) (Girenavar y col., 2007).

De la fracción 9 del sistema hexano:acetato de etilo (9:1, v/v) se obtuvo el siguiente compuesto:



Compuesto B: Geranyl cumarina. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.63 (*d*, $J = 9.4$ Hz, 1H), 7.36 (*d*, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.89 – 6.77 (*m*, 2H), 6.24 (*dd*, $J = 9.5$ Hz, 1H), 5.46 (*dd*, $J = 6.6, 5.4$ Hz, 1H), 5.13 – 4.99 (*m*, 1H), 4.60 (*d*, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.10 (*t*, $J = 8.1$ Hz, 4H), 1.65 (*s*, $J = 8.8$ Hz, 3H), 1.60 (*s*, 6H) (Girenavar y col., 2007).

De la fracción 11 del sistema hexano:acetato de etilo (1:1, v/v) se obtuvo el siguiente compuesto:



COMPUESTO C: Naringenina. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.29 (*d*, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.81 (*d*, $J = 8.6$ Hz, 1H), 5.83 (*d*, $J = 2.4$ Hz, 2H), 5.40 (*dd*, $J = 12.8, 2.9$ Hz, 1H), 3.32 – 3.09 (*m*, 2H) (Ibrahim, 2000).

La cutícula obtenida fue analizada en el Instituto de Química de la UNAM por ^{13}C NMR-CPMAS en un espectrómetro Varian Unityplus 300 equipado para análisis de sólidos. La frecuencia de resonancia fue 74.443 MHz, con un tiempo de adquisición de 30 ms, un tiempo de retraso (delay time) de 2s entre las adquisiciones sucesivas, y un tiempo de contacto CP de 1.5 ms. Un experimento rutinario incluye la inserción de 30-60 mg de muestra empacada en un rotor de 5 mm y colocado en una velocidad de giro de 7 kHz a temperatura ambiente por 12 h. El resultando da un espectro típico que se asigna de acuerdo a señales características de los dominios presentes: compuestos alifáticos (20-40 ppm), en seguida se observan señales para un grupo de polisacáridos (60-80 ppm) con los carbonos anoméricos a 100 ppm y finalmente se encuentra un pico de carbonilos (180 ppm) (Fig. 25) (Lai *et al.*, 2003).

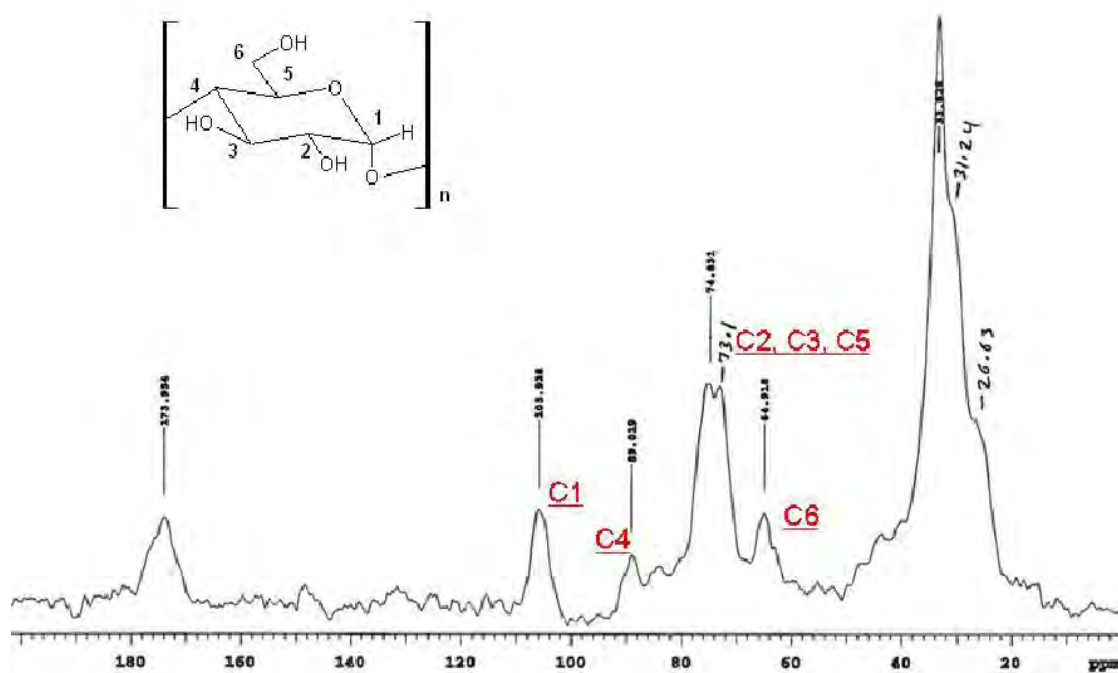


Figura 25. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de toronja.

Hidrólisis con TFA

Tabla 3. Porcentaje del sólido residual (fracción insoluble II) y de la fracción acuosa de la hidrólisis con TFA a partir de 150 mg de cutícula.

Concentración TFA	TORONJA MICHUACANA		TORONJA VERACRUZANA	
	Sólido residual (%)	Fracción acuosa TFA (%)	Sólido residual (%)	Fracción acuosa TFA (%)
10mM	78	11	76	10
1M	41	18	59	17
2M	33	36	50	35

Los sólidos residuales de TFA con diferentes concentraciones fueron analizados por ^{13}C NMR-CPMAS para poder compararlos y seleccionar la molaridad óptima (Fig. 26).

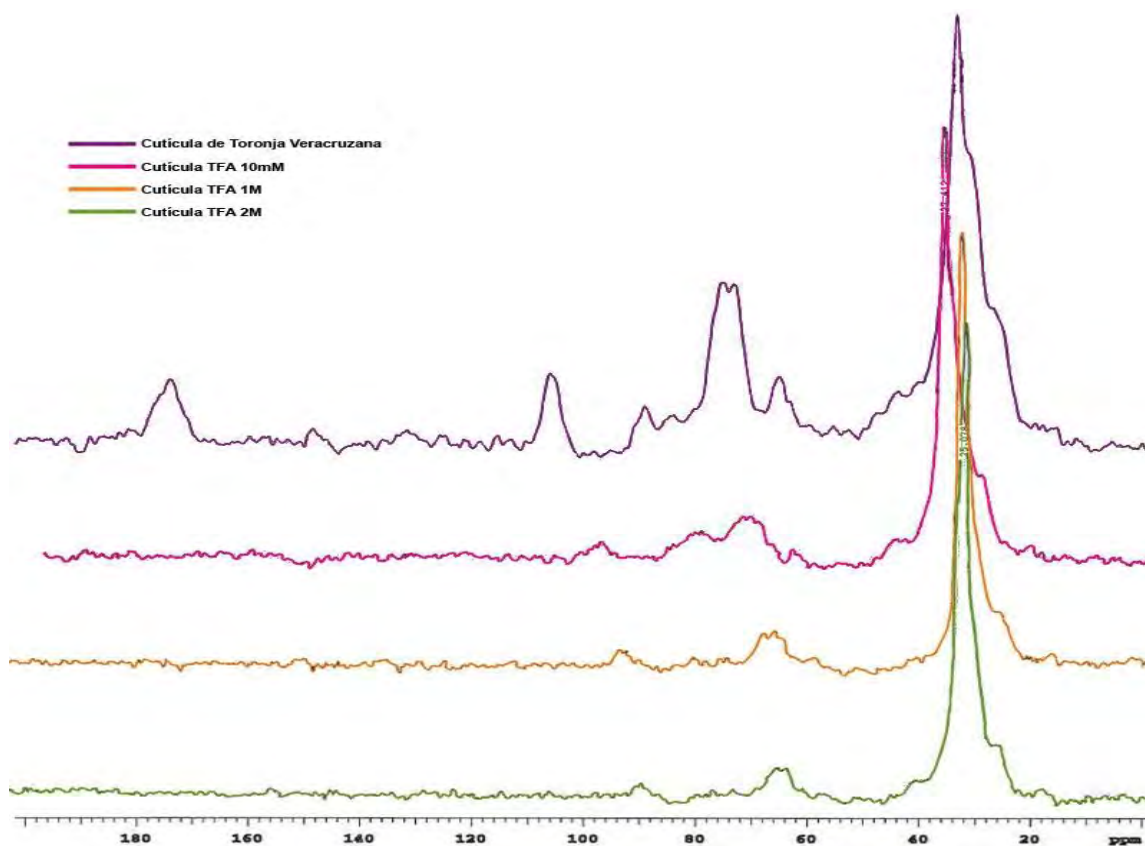


Figura 26. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS donde se observan los cambios en las señales después de la hidrólisis con TFA 10 mM, 1 M y 2 M.

Fracción acuosa TFA. Estudio de azúcares

El extracto de la fracción acuosa TFA fue objeto de un análisis para detectar la presencia de azúcares por medio de cromatografía en placa. En las placas podemos observar la presencia de fructosa (color rosa) (Fig. 27).

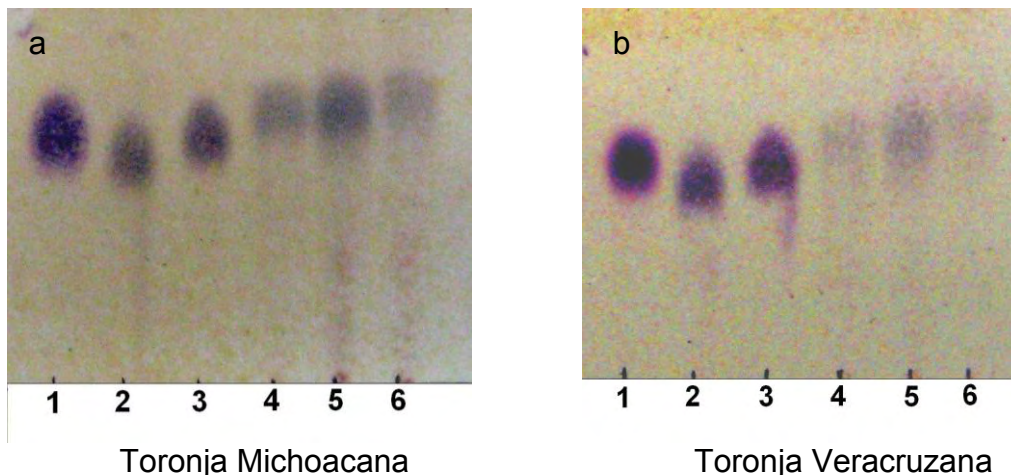


Figura 27. Estudio de azúcares en placa fina; (a) Toronja Michoacana (b) Toronja Veracruzana. (1) Fructosa, (2) Galactosa, (3) Glucosa, (4) acuoso de 10 mM TFA, (5) acuoso de 1 M TFA, (6) acuoso de 2 M TFA. Las placas fueron eluidas con acetonitrilo:agua (80:20, v/v) y reveladas con una solución de *alfa*-naftol.

Hidrólisis con KOH

Tabla 4. Porcentaje de la fracción soluble e insoluble de la hidrólisis con KOH, así como de los monómeros obtenidos de la columna cromatográfica a partir de 1 g de cutícula.

	Fracción insoluble KOH (%)	Fracción soluble KOH (%)	Monómero 1 (%)	Monómero 2 (%)
Columna 1 TM (s/temperatura)	84.37	15.63	56.07	31.77
Columna 2 TM (c/temperatura)	77.05	22.95	7.5	5.55
Columna 3 TV (c/temperatura)	91.69	8.31	1.62	6.83

Los porcentajes del monómero 1 y 2 se obtuvieron a partir del peso de la fracción soluble KOH. TM, Toronja Michoacana; TV, Toronja Veracruzana.

La fracción soluble obtenida de la hidrólisis con KOH fue objeto de una cromatografía en columna de donde obtuvimos los monómeros principales. Las placas muestran el monómero 1 (Fig. 27. 3, 4) obtenido con un sistema diclorometano-metanol (95:5, v/v) y el monómero 2 (Fig. 28. 6-8) obtenido con un sistema diclorometano:metanol (9:1, v/v).

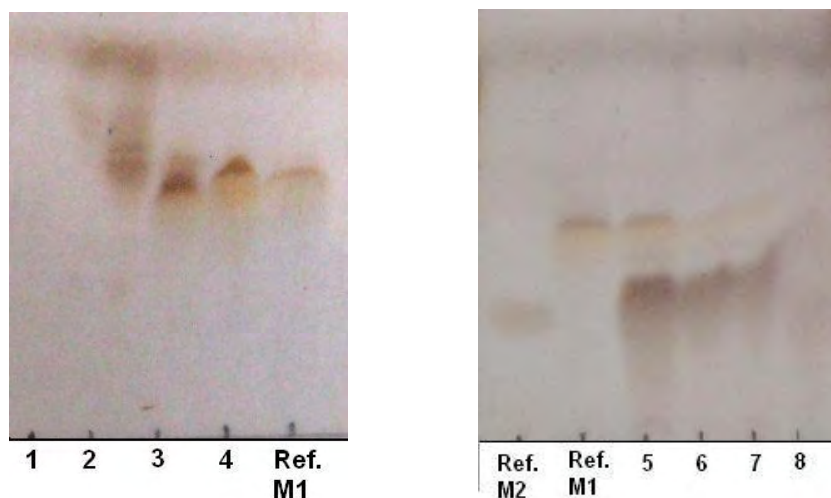


Figura 28. Placas de las principales fracciones obtenidas de la columna cromatográfica de la hidrólisis con KOH (Fracción soluble).

Se utilizó un sistema de diclorometano:metanol (95:5, 9:1, v/v) como fase móvil y las placas fueron eluidas en un sistema cloroformo:metanol (9:1, v/v).

De la fracciones 3 y 4 del sistema diclorometano:metanol (95:5, v/v) se obtuvo el monómero 1, identificado como Ácido 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico, cuya estructura es la siguiente:

Monómero 1: Ácido 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico. EM-IE (70 eV) m/z 286 $C_{16}H_{30}O_4$. m/z 269 $[M - H_2O]^+$, 251 $[M - 2H_2O]^+$, 185. IR $\nu^{-1}(cm^{-1})$ 3200 (COOH), 1695 (C=O), 1065 (-CH₂-COOH). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.15 - 1.45 (*m*, 15 H) 1.48 - 1.71 (*m*, 8 H) 2.25 - 2.46 (*m*, 6 H) 3.64 (*t*, *J*= 6.45 Hz, 2 H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 212.07 (C=O), 178.96 (-COOH), 62.93 (-CH₂OH).

De la fracciones 6-8 eluidas con diclorometano:metanol (9:1, v/v) se obtuvo el monómero 2, identificado como Ácido 10, 16 dihidroxihexadecanoico, cuya estructura es la siguiente:

Monómero 2: Ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico. EM-IE (70 eV) m/z 288 $C_{16}H_{32}O_4$. m/z 271 $[M - H_2O]^+$, 253 $[M - 2H_2O]^+$, 235 $[M - 3H_2O]^+$, 187 $[M - C_6H_{13}O]^+$, 169 $[M - C_6H_{13}O - H_2O]^+$. IR $\nu^{-1}(cm^{-1})$ 3302 (COOH), 1701 (C=O), 1067 (-CH₂-COOH). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 1.16 - 1.49 (*m*, 21 H) 1.50 - 1.69 (*m*, 6 H) 2.27 (*t*, $J = 7.52$ Hz, 2 H) 3.42 - 3.71 (*m*, 3 H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 176.33 (-COOH), 71.27 (-CHOH-), -61.87 (-CH₂OH).

El material residual de la cutícula después de la hidrólisis con KOH fue analizado por medio de ¹³C NMR-CPMAS y se comparó con los espectros obtenidos de la hidrólisis con TFA y de la cutícula intacta (Fig. 29).

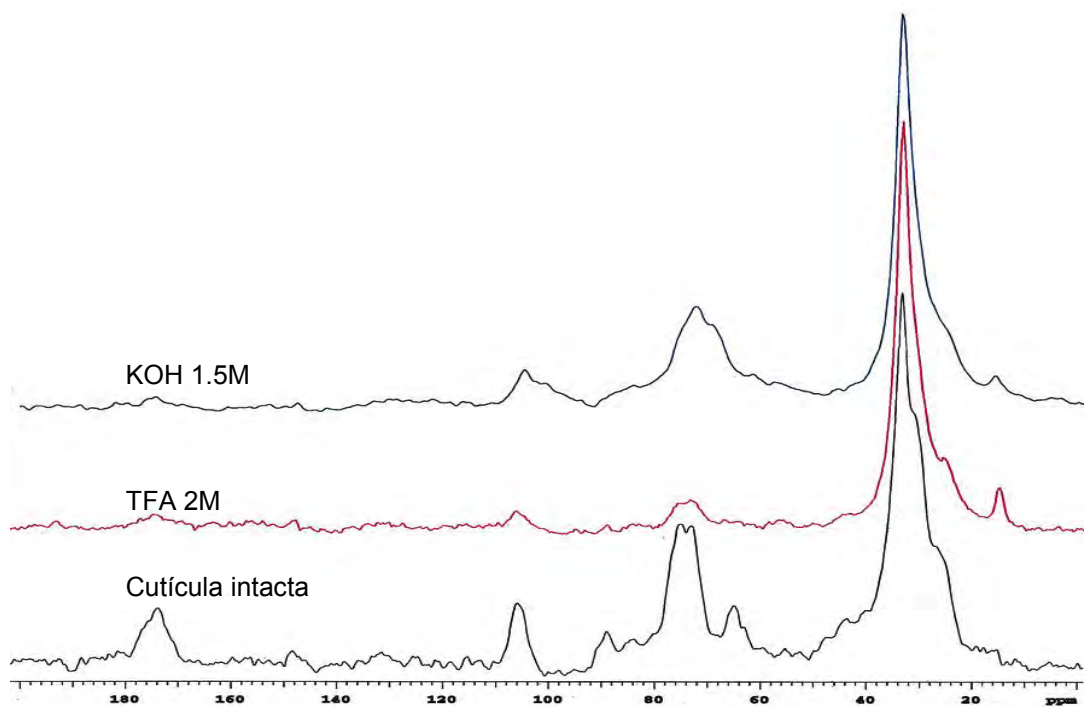


Figura 29. Espectro de ¹³C NMR-CPMAS comparativo después del tratamiento con KOH.

Reacciones de polimerización

Se realizaron reacciones enzimáticas con el monómero 1 (Ácido 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico) y tres enzimas diferentes, las muestras se tomaron a diferentes tiempos siendo las 24 h el tiempo máximo de reacción y se analizaron por NMR (Fig. 30).

Tabla 5. Porcentajes de polimerización del monómero 1 con cada enzima a diferentes tiempos.

Monómero	Enzima	1 h (%)	2 h (%)	3 h (%)	24 h (%)
1	CAL	100	-	-	-
1	PCL	100	-	-	-
1	LAP	20	20	20	20

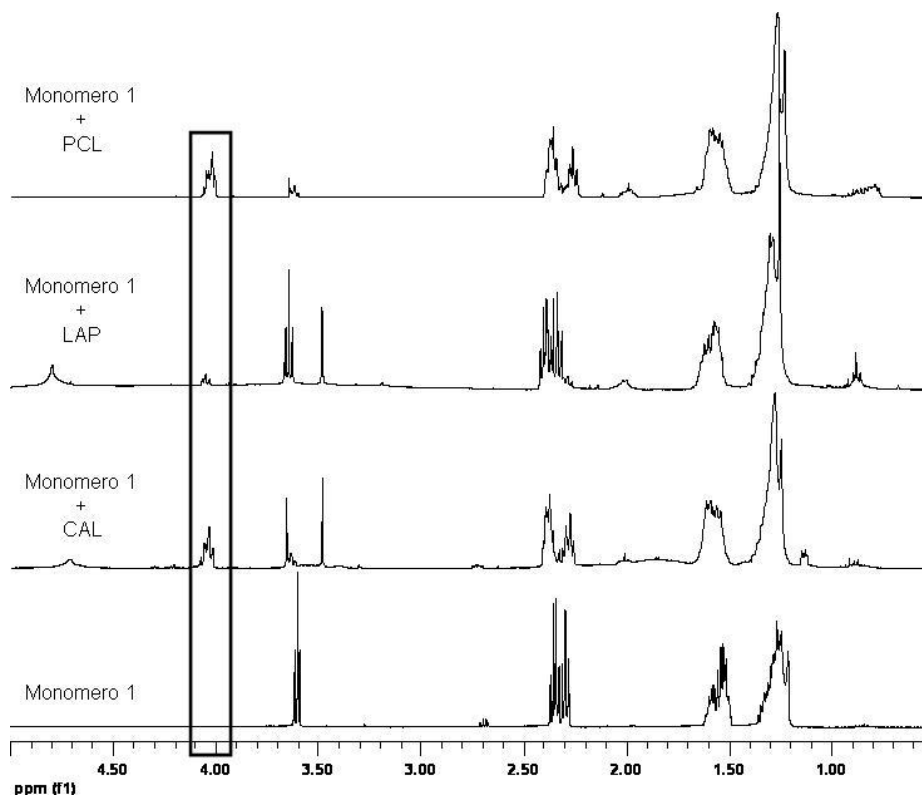


Figura 30. Comparación de los espectros de ^1H NMR obtenidos de los productos aislados de la reacción del monómero 1 con lipasas, donde se indica la formación de ésteres con el rectángulo.

DISCUSIÓN

Obtención de la cutícula de toronja.

Las dos principales características físicas que distinguen a las variedades de toronja utilizadas en este trabajo son el color y grosor de su cáscara, así como el color de su pulpa. La toronja Michoacana posee una cáscara delgada de color amarillo y pulpa de color rosa, a diferencia de la Veracruzana que posee una cáscara gruesa de color naranja y una pulpa de color rojizo.

Las cáscaras de las toronjas se obtuvieron teniendo cuidado de que en la cáscara se fuera la menor cantidad de pectina, para evitar que la hidrólisis enzimática no consumiera una gran cantidad de pectinasa, celulosa y hemicelulosa. Se utilizaron 600 gr de cáscara en estado fresco, de los cuales sólo se obtuvieron aproximadamente 2.5 gr. de cutícula, lo que significa un rendimiento aproximado del 4.3%.

La cáscara de la toronja así como la de los cítricos en general contiene diversos mono y disacáridos, siendo los principales la glucosa, la sacarosa y la fructosa, por otro lado contiene también polisacáridos como la celulosa, la hemicelulosa y la pectina. Para obtener las cutículas lo más limpias posible, es necesario remover estos polisacáridos. Es por ello que en las primeras etapas de la obtención de cutículas se utilizan enzimas específicas como la pectinasa, celulasa y hemicelulasa. La efectividad de estas hidrólisis enzimáticas ha sido comprobada y utilizada para hidrolizar los desechos de la cáscara de toronja para obtener monosacáridos que puedan ser usados por diversos microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* para producir etanol y otros productos obtenidos por medio de fermentación (Wilkins *et al.*, 2007).

Después de la segunda hidrólisis enzimática (celulasa y hemicelulasa), el tejido cuticular se lavó con diclorometano y metanol con el fin de eliminar componentes orgánicos solubles. El extracto orgánico obtenido fue objeto de una cromatografía en columna la cual fue seguida por cromatografía en capa fina eluída con hexano-acetato de etilo (7:3, v/v) y revelada con DPPH con el fin de poner de manifiesto compuestos con capacidad antioxidante.

Se obtuvieron 3 fracciones importantes con actividad antioxidante. En la fracción 11 (Fig. 28 de la sección de resultados) se obtuvo un compuesto mayoritario que al analizarlo por resonancia magnética nuclear de hidrógeno se observa la presencia de dos sistemas aromáticos: un sistema AB a 7.29 (2H) y 6.81 (2H) ppm con una $J = 8.6$ Hz, indicando la presencia de hidrógenos en posición orto. Otro sistema A'B' a 5.83 ppm con una $J = 2.4$ Hz correspondiente a hidrógenos en posición meta. Un sistema ABX correspondientes a la presencia de hidrógenos alifáticos acoplados a 5.40 y 3.32-3.09 que indicaban la presencia de la naringenina. Los análisis de los espectros de ^{13}C , COSY y HMBC n la presencia de este compuesto. Los datos obtenidos fueron comparados con los ya reportados (Benavente-García *et al.*, 1997) para comprobar su estructura.

El análisis de ^1H NMR de la fracción 6 (Fig. 28 de la sección de resultados) muestra un sistema sencillo de 2 sistemas aromáticos orto, uno a 8.61 y 6.28 ppm y el otro a 7.82 y 7.32 ppm. Un singulete a 7.35 ppm indica la presencia de el bergaptol (Fisher y Trama, 1979). Estos compuestos pueden cumplir una función antioxidante en los cítricos de manera que los protegen contra la radiación UV.

El espectro de ^1H NMR de la fracción 9 (Fig. 28 de la sección de resultados) muestra un sistema aromático AB a δ 7.63 y 6.24 ppm, con una $J = 9.5$ Hz correspondiente a un sistema orto y otro sistema aromático ABX a δ 7.36 ($J = 8.4$ Hz) y 6.84 ($J = 8.4$ y 2.3 Hz). El espectro de HMBC muestra un sistema alifático con dos insaturaciones y tres metilos acoplado al sistema aromático indicando la presencia de la geranil cumarina (Manthey y Buslig, 2005)

La cutícula de la toronja se aprecia como hojuelas muy delgadas de color café muy claro para la variedad michoacana (Fig. 31A), y de color café oscuro en el caso de la veracruzana (Fig. 31B). Aunque su textura es lisa y de fino espesor, es un material sumamente resistente, si se trata de romperlo con las manos resulta difícil. Una vez obtenida la cutícula, esta se pulveriza utilizando hielo seco o nitrógeno. La textura de la cutícula, que recubre los frutos para impedir su deshidratación, se puede comparar con la de una bolsa de plástico.

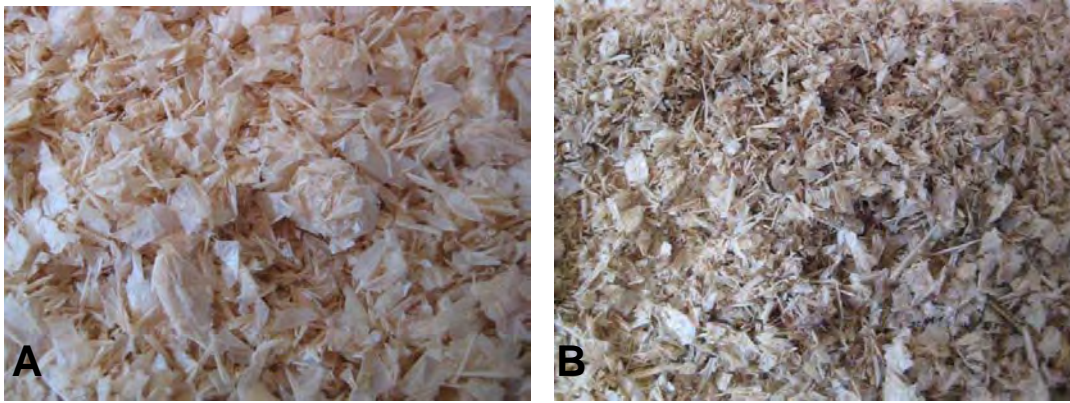


Figura 31. Cutícula de toronja (A) Michoacana y (B) Veracruzana.

La cutícula intacta fue analizada por medio de resonancia magnética nuclear de sólidos (^{13}C NMR-CPMAS) y el espectro obtenido fue comparado con otro reportado previamente en la literatura (Lai *et al.*, 2003) para confirmar el correcto aislamiento de la cutícula (Fig. 32). El análisis del espectro obtenido muestra señales correspondientes a carbonos alifáticos (20-40 ppm), en seguida se observa un grupo de señales que corresponden a la presencia de diversos polisacáridos, entre los que se encuentra la celulosa, de 60-80 ppm y los carbonos anoméricos de estos a 100 ppm. A continuación se aprecia una pequeña zona de compuestos aromáticos (100-120 ppm) y finalmente se encuentra un pico correspondiente al carbonilo (180 ppm) (Fig. 33).

Como se observa en el espectro, las señales correspondientes a los carbonos alifáticos muestran una gran intensidad con respecto a la presencia de azúcares, por lo que podemos decir que el procedimiento utilizado se realizó de forma correcta. Los polisacáridos que se observan pueden corresponder a parte de la celulosa de la pared celular que se encuentra en contacto directo con la cutícula.

El material cuticular obtenido para las dos variedades fue utilizado para llevar a cabo los análisis con TFA y KOH posteriores.

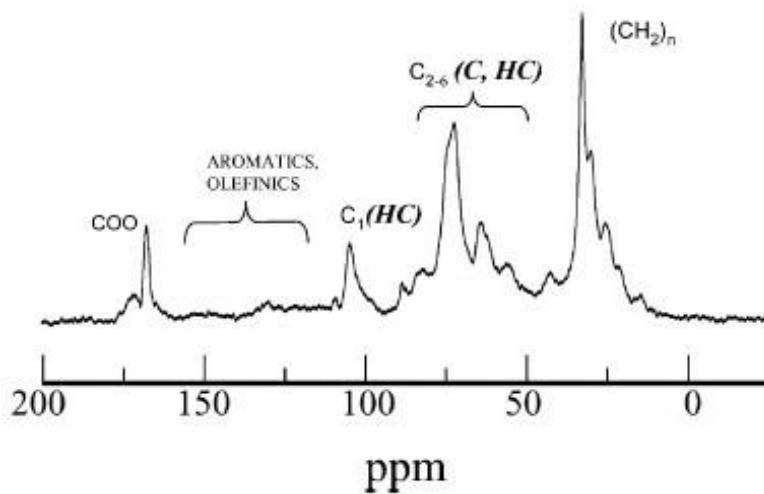


Figura 32. Cutícula de toronja descrita por Lai *et al.*, 2003.

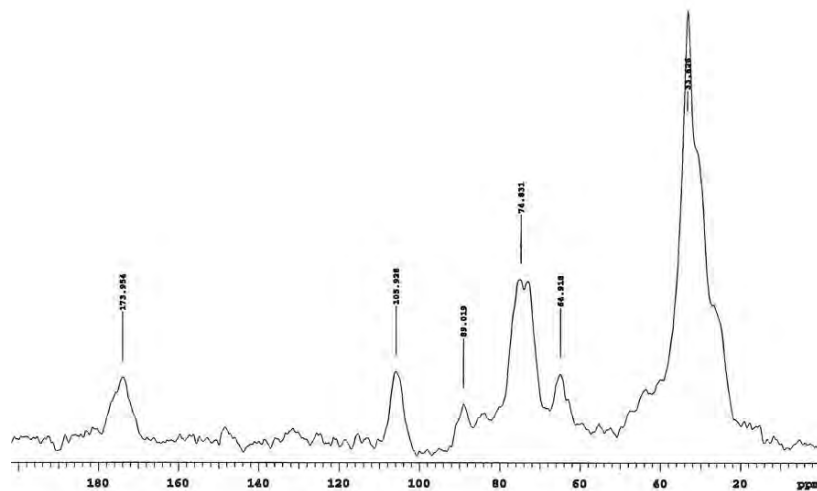


Figura 33. Cutícula de la toronja obtenida.

Hidrólisis con TFA.

Como ya se ha mencionado, el Ácido Trifluoroacético (TFA por su siglas en inglés) actúa sobre los enlaces covalentes de polisacáridos no celulósicos (Morrison y Stewart, 1998), característica que lo hace idóneo para reducir el dominio de polisacáridos que está presente en la cutícula.

Sin embargo, el uso de TFA en la suberina de papa reportado por Arrieta-Baez y Stark en el 2002, mostró que el principal dominio hidrolizado con este reactivo fue el formado por compuesto alifáticos de cadena larga, razón por la cual

resulta idóneo para ser utilizado en cutículas con componentes alifáticos tal como las cutinas de algunas frutas, en este caso la toronja.

Para estudiar el comportamiento de las cutículas con el TFA se realizaron tres experimentos para cada variedad de cutícula que consistieron en variar la concentración de TFA (10 mM, 1 M y 2 M) a 110 °C durante 1 hora. Después de este tiempo, se separó el material sin reaccionar y se lavó con una mezcla de diclorometano:metanol (1:1, v/v). El material cuticular residual se secó para después analizarlo por medio de ^{13}C NMR-CPMAS.

En ambas variedades el comportamiento fue similar de manera que, conforme aumentamos la concentración de TFA obtuvimos los mismos resultados. A diferencia de lo observado por Arrieta-Baez y Stark en 2002, el dominio alifático no fue hidrolizado, solo la región de los polisacáridos mostró una disminución en las señales. El análisis de los espectros nos indicó que en el caso de la toronja Michoacana, con el uso de TFA 10 mM la reducción en la señal de los azúcares es notable y estos casi desaparecen al usar una solución de TFA 1 M, pero cuando lo comparamos con la concentración de 2 M podemos ver que la reducción de azúcares no parece tan significativa ya que el núcleo de alifáticos también se ve reducido (Fig. 34).

El caso de la toronja Veracruzana es diferente, conforme la molaridad aumenta, los azúcares se reducen y el núcleo alifático no se ve afectado como en el caso de la variedad Michoacana, en realidad se pueden notar las señales de los compuestos alifáticos sin más presencia de azúcares con TFA 1 M (Fig. 35).

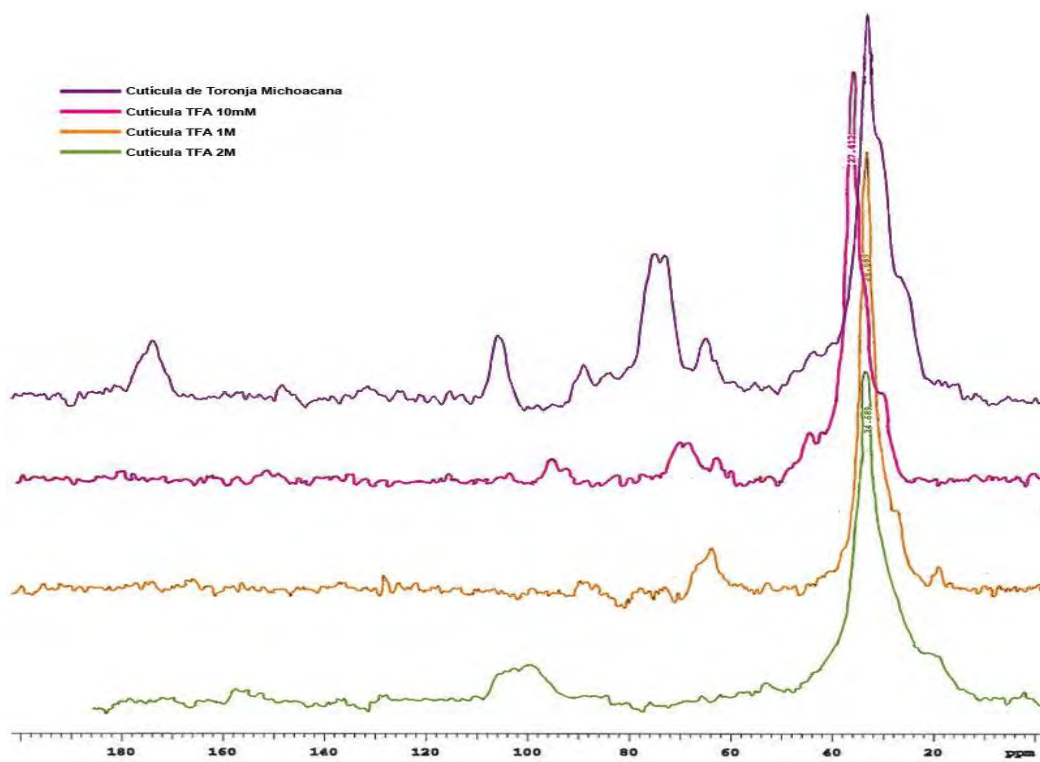


Figura 34. Espectros de ^{13}C NMR-CPMAS de la hidrólisis con TFA (Toronja Michoacana).

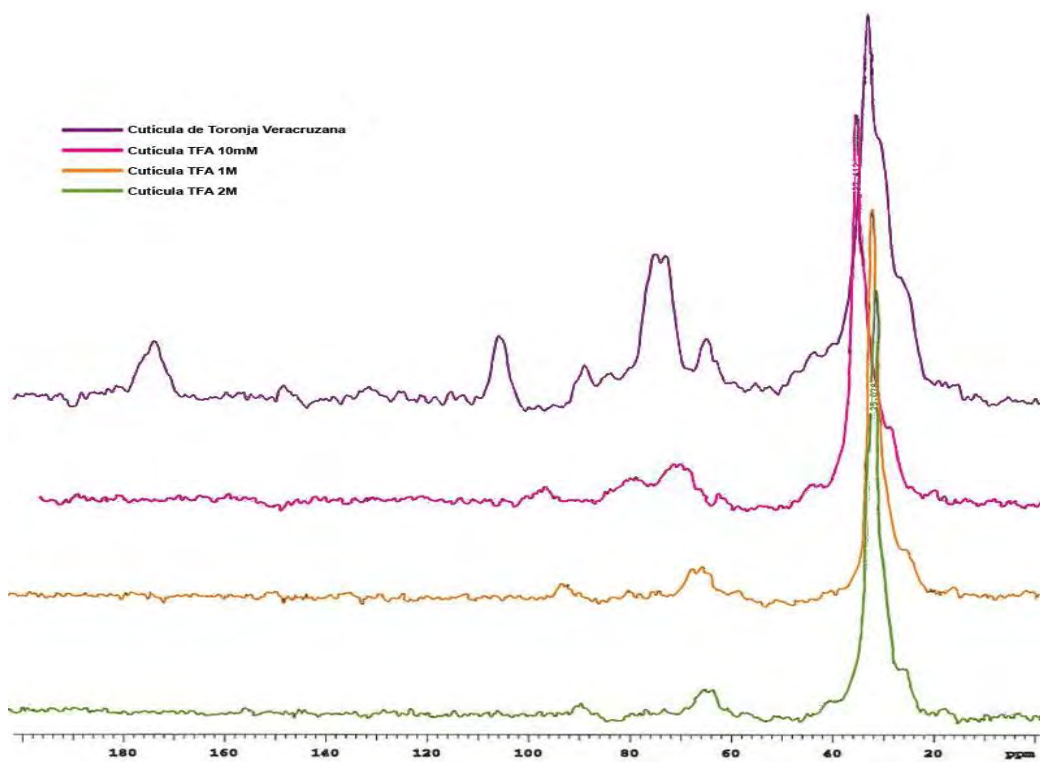


Figura 35. Espectros de ^{13}C NMR-CPMAS de la hidrólisis con TFA (Toronja Veracruzana).

El análisis de estos datos nos sugiere la presencia de un dominio compacto de compuestos alifáticos. Si estos compuestos estuvieran intercalados con diferentes polisacáridos, ambos grupos de señales estarían reducidos.

Así, el uso de TFA solo afecta al dominio de polisacáridos, como ha sido sugerido por diferentes autores, es decir, este actúa a bajas concentraciones disolviendo o “liberando” a los azúcares que pudieran quedar atrapados en las redes cuticulares al momento de su obtención. En el caso de concentraciones mayores, este tiene la capacidad de hidrolizar dichos polisacáridos que tengan la característica de no ser celulósicos. Muy probablemente los azúcares residuales que observamos en los materiales cuticulares después de las hidrólisis correspondan a este tipo de azúcares.

En otros trabajos relacionados llevados a cabo con las cutículas de jitomate y limón, y que se están desarrollando al mismo tiempo, se ha observado la misma tendencia: la hidrólisis o “liberación” de los azúcares presentes en los materiales cuticulares.

En las cutículas de limón, aún cuando existe pérdida de material con cada una de las concentraciones de TFA utilizadas, los espectros de sólidos obtenidos en cada caso son similares (Fig. 36). En este caso, los resultados nos indican que los dominios alifáticos y de polisacáridos pueden estar alternados. Si la hidrólisis se da en la parte de azúcares como se propone, al llevar a cabo la reacción esta implicaría también una hidrólisis en la parte del dominio alifático contiguo, pero la composición de dominios alternados no se vería alterada obteniéndose las mismas características espectrales en cada concentración de TFA.

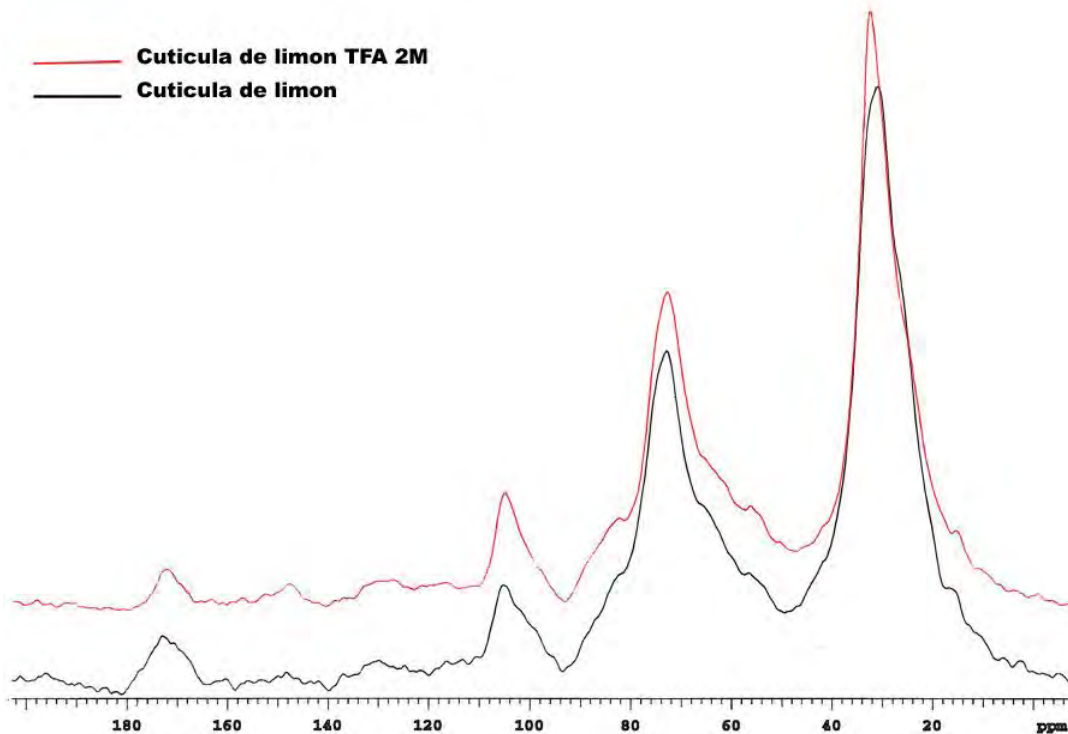


Figura 36. Espectros de ^{13}C NMR-CPMAS del material cuticular del limón (Trabajo experimental: Propiedades bioplásticas de los monómeros de la cutícula del limón, Martínez-Villa).

Toda esta información nos llevó a proponer los siguientes modelos tanto para la toronja como para el limón. En el primero se pueden observar bloques sin intercalamiento, es decir, encontramos un núcleo de polisacáridos que pertenecen a la pared celular primaria, después un núcleo de compuestos alifáticos y finalmente otro de polisacáridos, es por eso que cuando el TFA se aplica en mayor concentración los alifáticos se empiezan a reducir también, debido a que ya se rompieron todos los enlaces azúcar-azúcar y ahora también se empiezan a romper los enlaces que restan, es decir, los azúcar-alifático (Fig. 37A). El caso del limón es sumamente diferente, para este proponemos bloques intercalados de polisacáridos y alifáticos, esta es la razón por la que los espectros siempre se ven iguales después de la hidrólisis con TFA, es decir, el TFA rompe los enlaces glicosídicos entre los polisacáridos y los alifáticos, de manera que esos dos bloques se reducen pero finalmente siguen quedando los mismos bloques de compuestos, lo que pasa en este caso específicamente es que sí existe una

disminución en la cantidad de azúcares y alifáticos, pero no existe una alteración en su arquitectura (Fig. 37B).

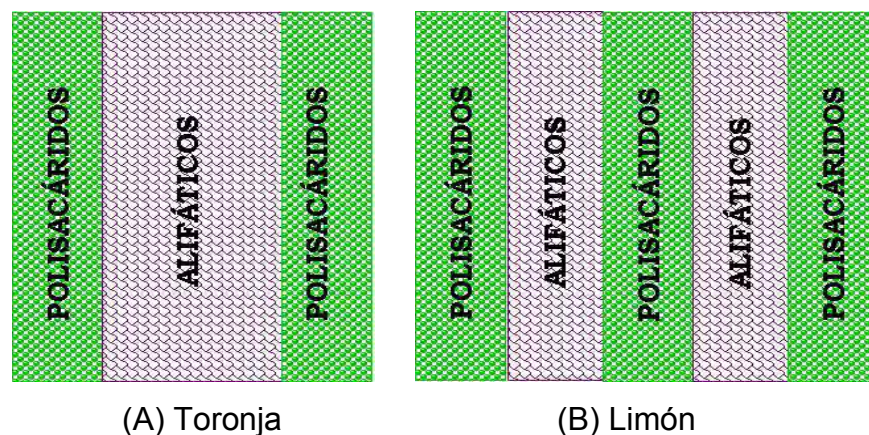


Figura 37. Modelos de dominios propuestos para las cutículas de toronja (A) y limón (B).

Estudio de azúcares.

El análisis anterior fue complementado con un estudio de la fracción soluble I. La mayor parte de los compuestos obtenidos en esta fracción corresponden a los azúcares (Fig. 26 sección de resultados); los porcentajes de las dos fracciones obtenidas de la hidrólisis con TFA se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 (sección de resultados). Porcentaje del sólido residual y la fracción acuosa de la hidrólisis con TFA a partir de 150 mg de cutícula.

Concentración TFA	TORONJA MICHOACANA		TORONJA VERACRUZANA	
	Sólido residual (%)	Fracción acuosa TFA (%)	Sólido residual (%)	Fracción acuosa TFA (%)
10mM	78	11	76	10
1M	41	18	59	17
2M	33	36	50	35

Para saber qué tipo de azúcares no celulósicos obtuvimos de la hidrólisis con TFA, se realizó una prueba cualitativa con cromatografía en capa fina. Las placas de sílica aminadas se eluyeron en una mezcla de acetonitrilo-agua (80:20 v/v). Una vez desarrolladas, las placas fueron reveladas con *alfa*-naftol para poner de

manifiesto los azúcares presentes. En las placas cromatográficas podemos observar que las manchas sugieren la presencia de fructosa, pero no de galactosa ni glucosa (Fig. 26 de la sección de resultados).

Hidrólisis con KOH.

Con el fin de analizar los componentes alifáticos mayoritarios en el material cuticular realizamos una hidrólisis básica con KOH. Se sugiere que estas condiciones hidrolizan preferentemente ésteres de alcoholes secundarios, lo cual se traduce en la remoción de fragmentos de cadenas largas, que finalmente aparecen como monómeros solubles (Ray *et al.*, 1995).

Para una hidrólisis más efectiva realizamos dos pruebas con la toronja michoacana. La primera prueba consistió en realizar la hidrólisis a temperatura ambiente y la segunda se dejó a reflujo durante 22-24 h aproximadamente, para saber cuál de las dos opciones nos llevaría a obtener un mayor porcentaje de alifáticos hidrolizados para un mejor análisis de los componentes mayoritarios. Dejando la reacción a reflujo, efectivamente se obtiene un mayor porcentaje de fracción soluble y una mayor cantidad de monómeros.

La fracción insoluble obtenida de la hidrólisis fue analizada por medio de FT-IR, el espectro muestra la presencia de una gran banda en la región de 3300 cm⁻¹ indicativo de una gran presencia de grupos OH (Fig. 38).

Curiosamente cuando este material cuticular se dejó a temperatura ambiente para que se secase, absorbió mucha humedad. Aunque se intentó secar en el horno, al retirarla inmediatamente volvía a hidratarse.



Figura 38. Espectro de FT-IR del material cuticular residual de la hidrólisis con KOH.

Análisis de la fracción soluble.

La fracción soluble fue separada mediante una cromatografía en columna de silica-gel, eluída con un sistema diclorometano:metanol (98:2, 95:5, 9:1, v/v), del que obtuvimos 2 fracciones principales y de donde se purificaron los monómeros mayoritarios, denominados como monómero 1 y monómero 2 para fines prácticos, previamente reportados para el género *Citrus* (Ray *et al.*, 1995).

El monómero se parecía físicamente como un polvo fino de color blanco amarillo muy claro y se identificó como ácido 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico mediante el análisis de espectrometría de masas y NMR.

El espectro de IE de masas del compuesto mayoritario 1 (monómero 1) no mostró el ion molecular esperado a m/z 286 correspondiente a $C_{16}H_{30}O_4$, sin embargo, la fragmentación observada a m/z 269 $[M - H_2O]^+$, 251 $[M - 2H_2O]^+$, 185, indican la presencia de un compuesto con esta fórmula condensada (Fig. 39).

Figura 39. Esquema de fragmentación del monómero 1.

El espectro de ^1H NMR muestra un triplete a δ 3.64, con una integración para 2 hidrógenos, correspondientes a la posición 16. Un multiplete a 2.37 ppm que integra para 6 hidrógenos, los cuales fueron asignados a las posiciones 2,9 y 11 de acuerdo al análisis del espectro de HMBC donde se observan correlaciones entre estas señales y dos carbonilos diferentes a δ 179.6 y 212.0 correspondientes al ácido carboxílico y a la cetona respectivamente (Fig. 40).

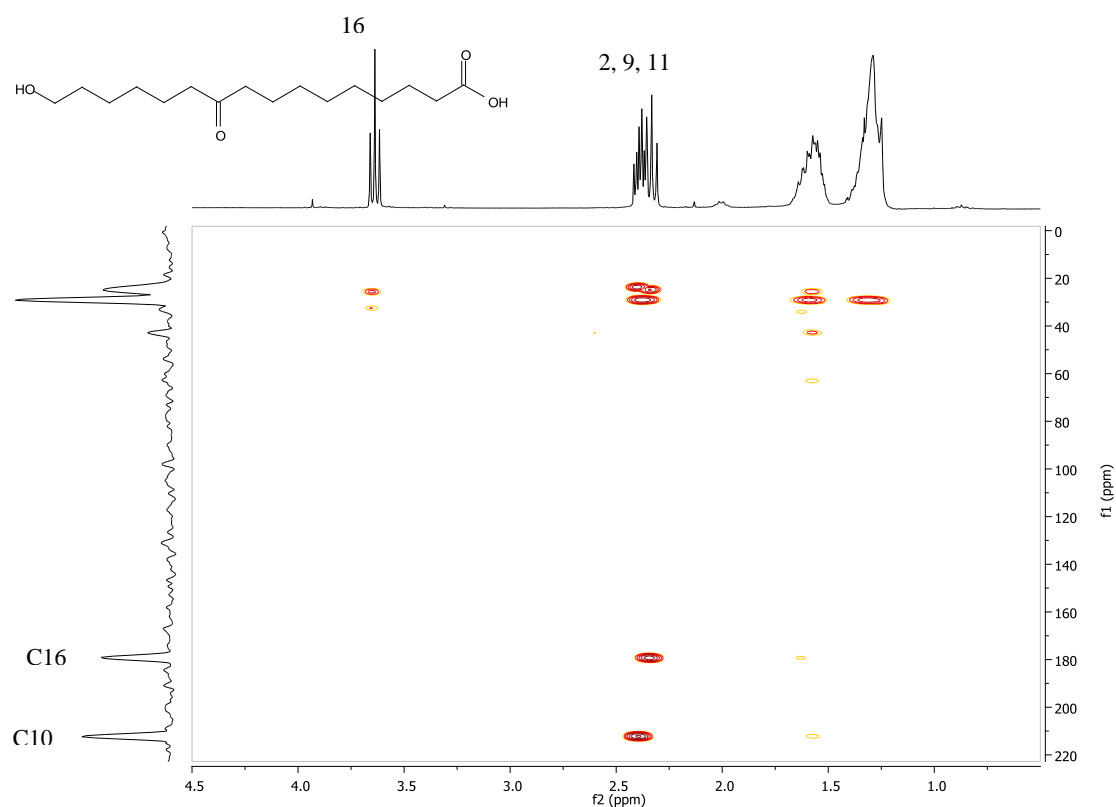


Figura 40. Espectro de HMBC del monómero 1.

La posición de la cetona en el monómero 1 fue asignada de acuerdo a la fragmentación observada en el espectro de masas de impacto electrónico a m/z 185 entre el C-10 y el C-11, y confirmando la presencia del ácido 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico (monómero 1).

El monómero 2 posee un color amarillo más fuerte que el monómero 1 y fue identificado como ácido 10, 16 dihidroxihexadecanoico.

Los espectros de masas de IE y de FAB muestran un ion molecular a m/z 289 correspondientes a la fórmula molecular $C_{16}H_{32}O_4$.

El espectro de 1H NMR muestra un triplete y un multiplete a δ 3.53, con una integración para 3 hidrógenos, correspondientes a la posición 10 y 16. Un triplete a 2.28 ppm que integra para 2 hidrógenos, asignado a la posición 2 de acuerdo al análisis del espectro de HMBC donde se observan correlaciones entre esta señal y el grupo carbonilo a δ 176.5 correspondientes al ácido carboxílico (Fig. 41).

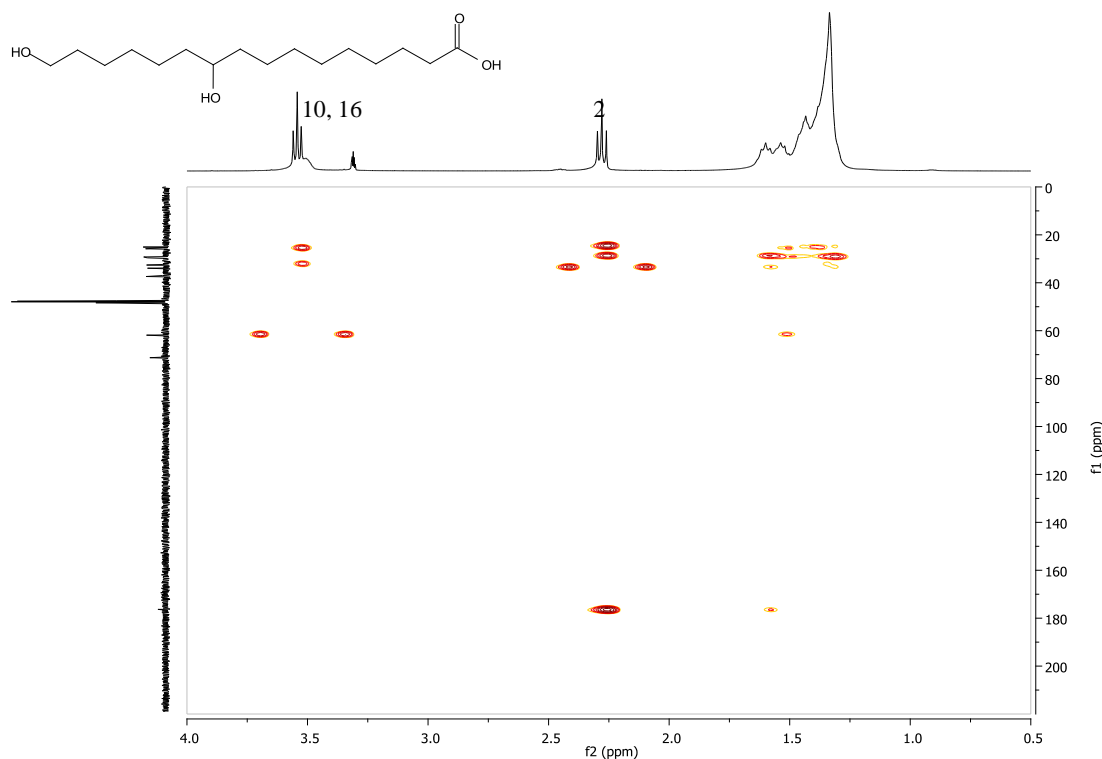


Figura 41. Espectro de HMBC del monómero 2.

El análisis de la fragmentación en el espectro de masas de IE nos indica la presencia del OH intermediario en la posición 10 (m/z 169, 131) y nos corrobora la presencia del ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico (monómero 2), (Fig. 42).

Figura 42. Esquema de fragmentación del monómero 2.

La cutícula del limón, al igual que la cutícula de toronja, está compuesta principalmente por los dos monómeros anteriormente descritos, pero sus proporciones son inversas, en la toronja el monómero 1 es el más abundante, a diferencia del limón, donde el monómero 2 es el componente mayoritario (Tabla 6) (Ray *et al.*, 1995).

Tabla 6. Composición monomérica de la cutícula de la toronja y el limón.

Fruto	Monómero 1 (%)	Monómero 2 (%)
Toronja	21.7	14.7
Limón	3.5	10.2

Reacciones de polimerización.

La obtención de los monómeros 1 y 2 en buena cantidad y pureza, nos abrió la posibilidad de estudiar las reacciones de polimerización principalmente con el monómero 1 (ácido 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico) que fue el que se obtuvo en mayor cantidad. Las principales enzimas involucradas en estas reacciones son las lipasas.

Las lipasas son enzimas que se encuentran en sistemas vivos; ya sean microbios, plantas o animales, y que catalizan la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos en ambientes acuosos. Estas enzimas son sumamente estables en disolventes

orgánicos y pueden ser usadas para reacciones de esterificación y transesterificación; raramente han desarrollado estructuras estables que les permiten sobrevivir a los efectos de los disolventes orgánicos. Otra de las ventajas que se tiene al utilizar lipasas es que aceptan una amplia gama de sustratos, así que dependiendo del disolvente pueden ser aplicadas para reacciones de hidrólisis o síntesis (Varma y col., 2005).

Las lipasas son hidrolasas y estererasas que pueden hidrolizar triglicéridos o ésteres. En la naturaleza cumplen con la función de degradar comida y grasas, por otro lado, en la industria se han utilizado para la preparación de jabones, de drogas contra desórdenes digestivos y enfermedades del páncreas, así como para la manufactura de químicos específicos y en síntesis orgánica (Varma y col., 2005).

Las lipasas reportadas para la síntesis de poliésteres provienen de mamíferos (lipasa porcina pancreática), de hongos (lipasa de *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, etc.) y de bacterias (*Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, etc.) (Varma y col., 2005). En este trabajo utilizamos: Lipasa de *Candida antarctica* (CAL), Lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PCL) y Polvo acetónico de hígado de borrego (LAP).

Se estudiaron las reacciones del monómero 1 con las enzimas en reacciones separadas, las cuales fueron seguidas por cromatografía en capa fina (cloroformo:metanol, 95:5, v/v) cada 10 minutos durante 1 h, posteriormente a la segunda, a la tercera hora y finalmente a las 24 h.

La enzima que más rápidamente polimerizó fue la CAL. La reacción se llevó a cabo en los primeros 10 minutos, a éste tiempo ya no se observó la presencia de materia prima o de monómero mediante la cromatografía en capa fina, mientras que la segunda enzima más eficiente fue la PCL, polimerizando aproximadamente a la primera hora y finalmente la LAP aunque su efectividad no fue buena ya que no se polimerizó toda la muestra, a diferencia de las dos primeras.

Los productos fueron aislados y analizados por medio de resonancia magnética nuclear (ver anexos). Un multiplete a 4.05 ppm, nos indica la poliesterificación

entre los monómeros. Esta señal múltiple se debe a la presencia de varios oligómeros o cadenas formadas de diferente número de monómeros. El espectro de HMBC muestra una correlación de esta señal con el grupo carbonilo del éster a 168 ppm, confirmando la formación del éster.

La comparación de los espectros de ^1H NMR de los productos obtenidos de las tres reacciones nos muestra también la eficiencia de las enzimas para llevar a cabo la polimerización:

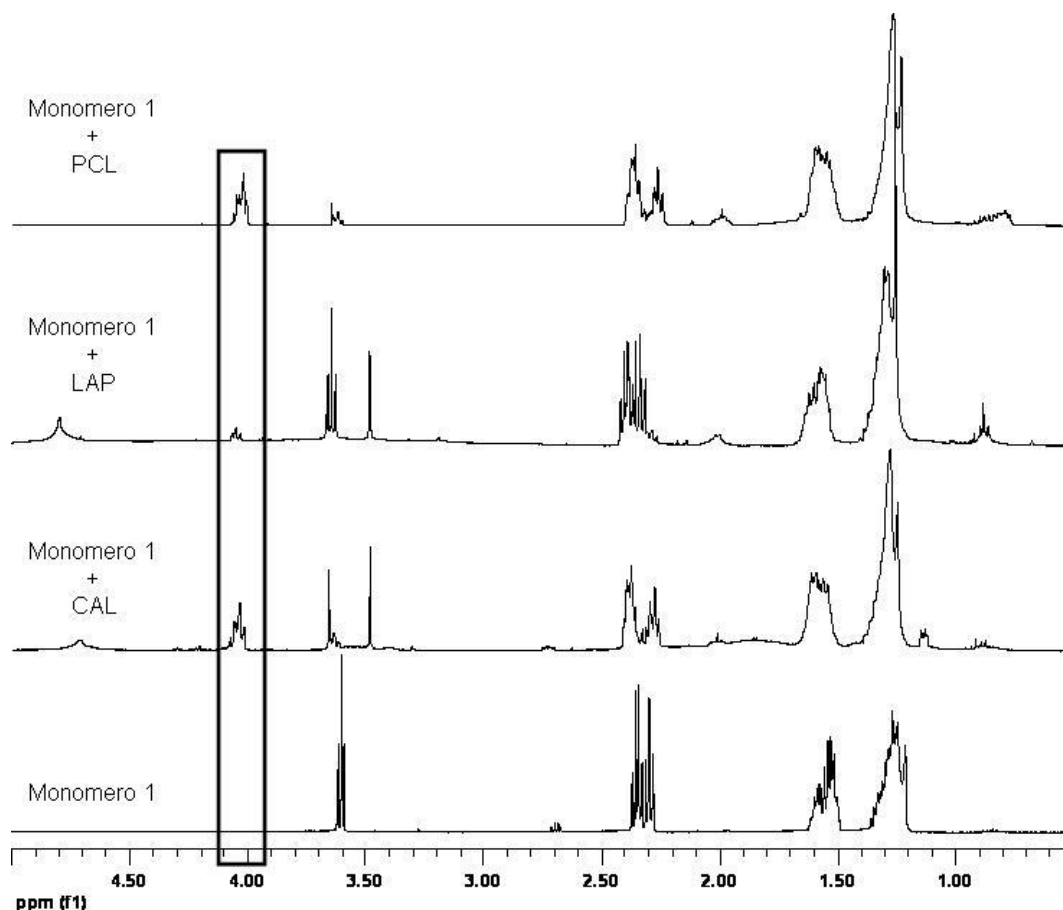


Figura 29 (sección de resultados). Comparación de los espectros de ^1H RMN obtenidos de los productos aislados de la reacción del monómero 1 con las lipasas, donde se indica la formación de ésteres con el rectángulo.

La señal a 3.6 ppm, correspondiente a los hidrógenos presentes en el carbono 16 del hidroxilo, nos indica qué tanto del monómero fue polimerizado por la enzima. Mientras que para la PCL y la CAL el monómero se consumió en mayor cantidad,

la enzima LAP apenas polimerizo parte de este. Estos resultados están de acuerdo con lo que observamos en la cromatografía en capa fina.

Los resultados obtenidos resultan por demás interesantes ya que otros monómeros similares, como por ejemplo el ácido 16-hidroxipalmítico y el 10,16-dihidroxipalmítico, tienen tiempos de reacciones arriba de las 18 hr, obteniéndose diferentes tamaños de polímeros. Mientras que para el mono hidroxilado los polímeros obtenidos son cadenas largas, para el dihidroxilado son de cadenas cortas.

Para los productos obtenidos en el presente trabajo, se están analizando los pesos moleculares de los productos obtenidos. Se ha reportado que los polímeros producidos *in vitro* vía enzimática, generalmente tienen bajo peso molecular, por lo que se han venido haciendo pruebas cambiando los parámetros de la reacción (temperatura, disolvente, concentración de la enzima y del monómero, etc.) (Varma y col., 2005).

Este tipo de polímeros (poliésteres) obtenidos, están teniendo gran importancia debido a que al tener un origen orgánico, tienen la cualidad de ser biodegradables, cuestión que actualmente ha sido el centro de atención en muchos ámbitos. Por otro lado, tienen múltiples aplicaciones, por ejemplo se han utilizado para ingeniería de tejidos, como barreras de adhesión, como controladores para la liberación de fármacos, como resinas y pegamentos, etc.

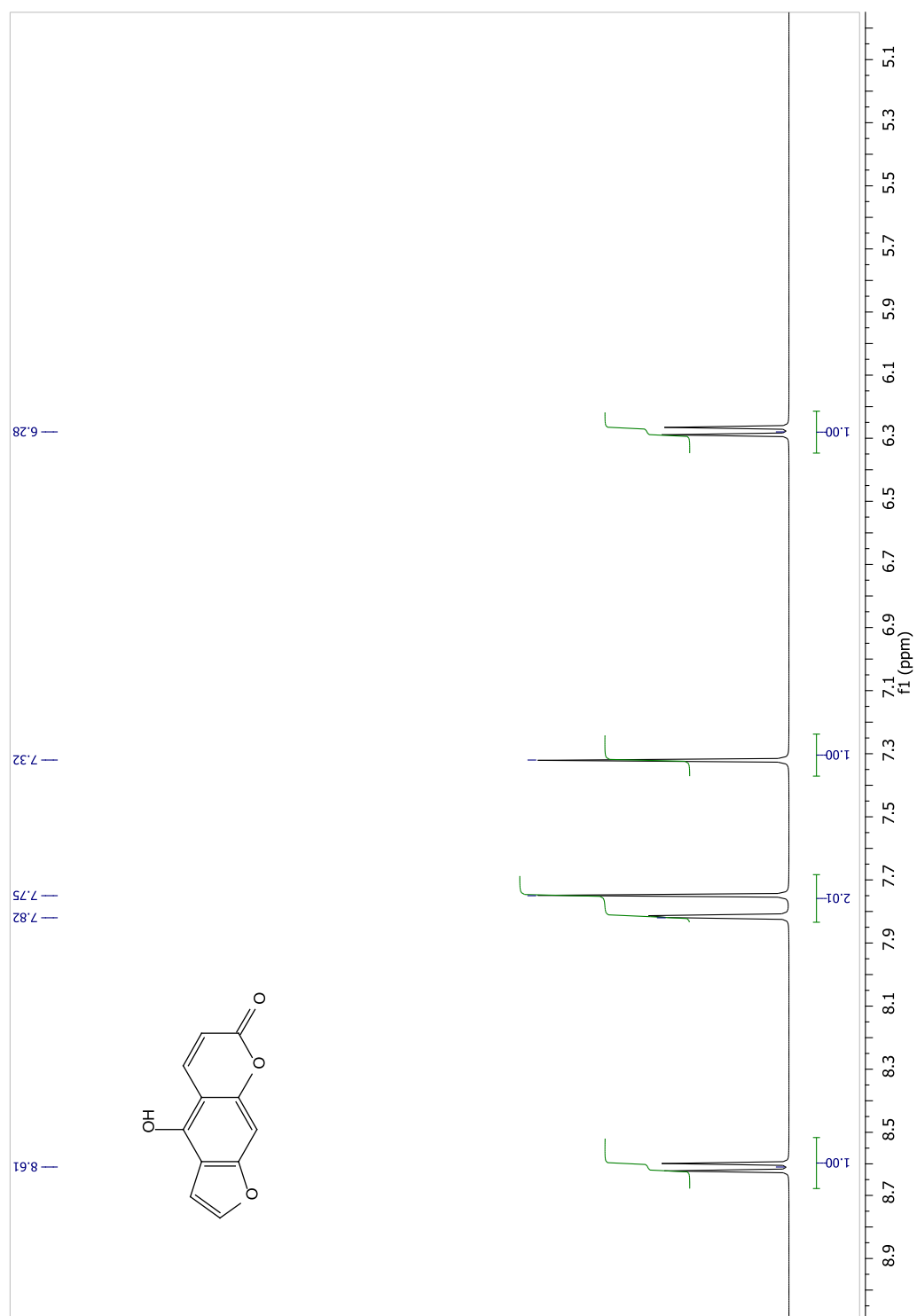
La catálisis enzimática en este momento es uno de los temas más investigados con el fin de obtener polímeros biodegradables de alto peso molecular y con cierta arquitectura deseada para fines específicos. Este tipo de catálisis tiene ventajas sobre la catálisis química, la principal es que para la segunda se usan generalmente catalíticos organometálicos que son difíciles de remover de los poliésteres, lo que se traduce en polímeros altamente tóxicos, y en la primera se utilizan enzimas no tóxicas y reciclables.

CONCLUSIONES

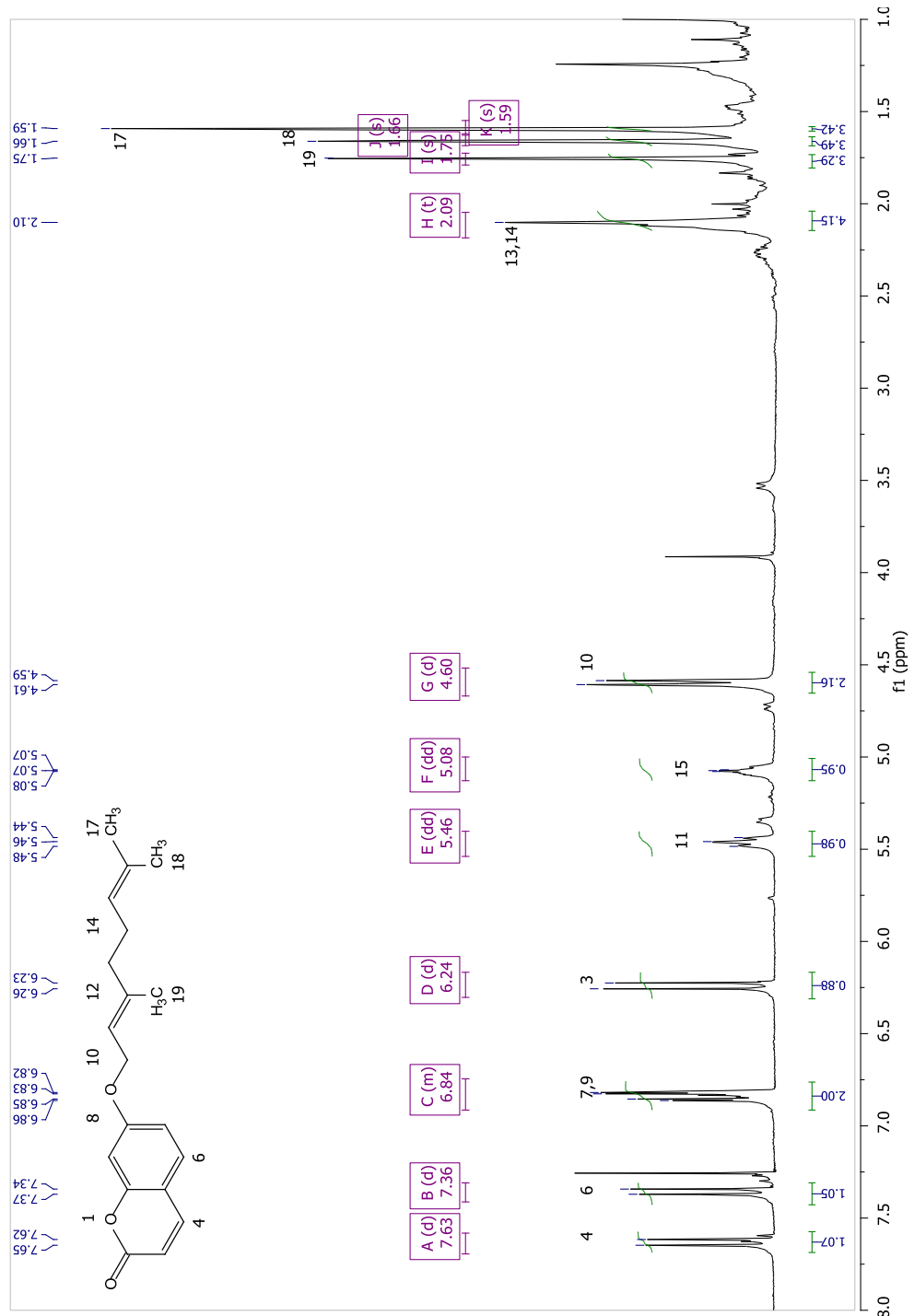
- En la extracción de la cutícula se detectaron 3 compuestos mayoritarios con actividad antioxidante, identificados como bergaptol, geranil cumarina y naringenina, los cuales cumplen actividades de protección del fruto en contra de los rayos solares.
- Los espectros obtenidos de la resonancia de sólidos muestran similitudes en ambas cutículas.
- El TFA actúa en la cutícula de toronja principalmente en la hidrólisis de polisacáridos, presumiblemente no celulósicos de acuerdo a su modo de acción reportado, y que difiere de la hidrólisis alifática reportada por Arrieta-Stark en el 2002.
- El principal monosacárido detectado en la hidrólisis con TFA fue fructosa.
- La cantidad de polisacáridos hidrolizados corresponde del 11 al 35%, aproximadamente del material cuticular inicial.
- Analizando y comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos para la cutícula del limón, donde los espectros de NMR de sólidos no muestran diferencias importantes, nos lleva a proponer modelos de dominios de polisacáridos y alifáticos bien definidos.
- Para la cutícula de toronja nuestro modelo propone la existencia de un dominio alifático rodeado de azúcares, lo cual explica el porqué la hidrólisis con TFA produce principalmente monosacáridos dejando intacto un material cuticular constituido principalmente de compuestos alifáticos.
- A diferencia de la cutícula de toronja, en el modelo de la cutícula del limón se proponen dominios en forma alterna. Lo cual explica el porqué la hidrólisis con TFA produce espectros de RMN de sólidos similares, aun cuando existe eliminación de material cuticular.

- La reacción de hidrólisis con KOH a reflujo es más eficiente que la que se lleva a cabo a temperatura ambiente, produciendo un mayor porcentaje de fracción soluble y una mayor cantidad de monómeros.
- La reacción de hidrólisis con KOH dio como resultado la obtención de dos monómeros principales: el monómero 1 en un 21.7 % y el monómero 2 en un 14 % del material cuticular obtenido de la hidrólisis con TFA. Estos monómeros también se encuentran en la cutícula del limón, aunque en proporciones inversas.
- El monómero 1 fue identificado como el ácido 16-hidroxi-10-oxohexadecanoico y el monómero 2 como el ácido 16,10-dihidroxihexadecanoico en base a sus datos espectroscópicos y comparados posteriormente con datos reportados para estos compuestos.
- La polimerización realizada con el monómero 1 fue eficiente con la lipasa de *Candida antarctica* y la de *Pseudomonas cepacia* y no con el Polvo acetónico de hígado de borrego.
- Esta reacción de polimerización del monómero 1 resulta más eficiente que aquella reportada para compuestos mono y dihidroxilados del mismo tamaño de cadena.
- Estos resultados aportan nuevos datos en la elucidación de estos importantes biopolímeros y a la vez contribuyen a la propuesta de nuevos biomateriales con potenciales aplicaciones en las áreas biomédicas e industriales.

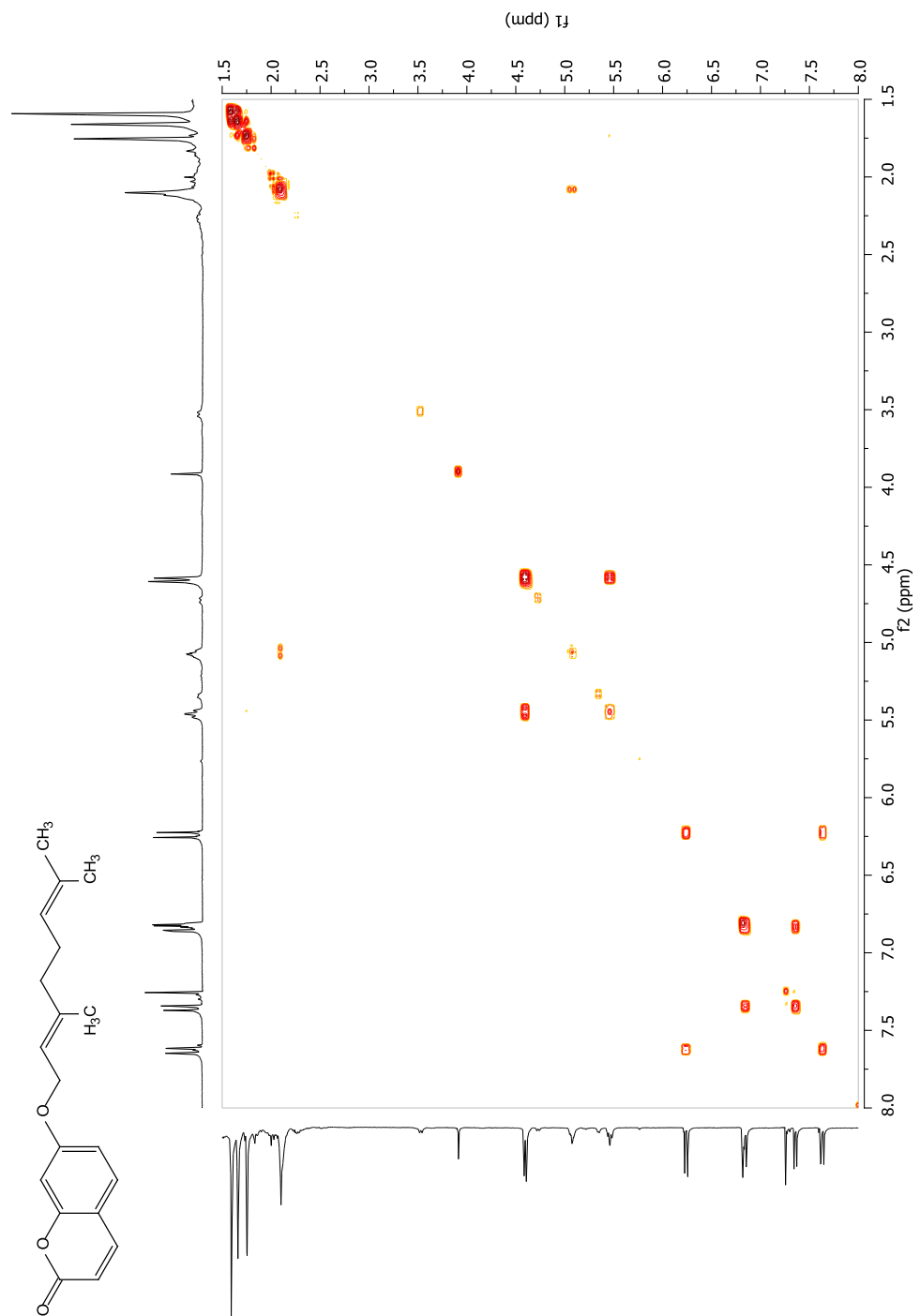
ANEXOS
ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR,
INFRARROJO Y EESPECTROMETRÍA DE MASAS



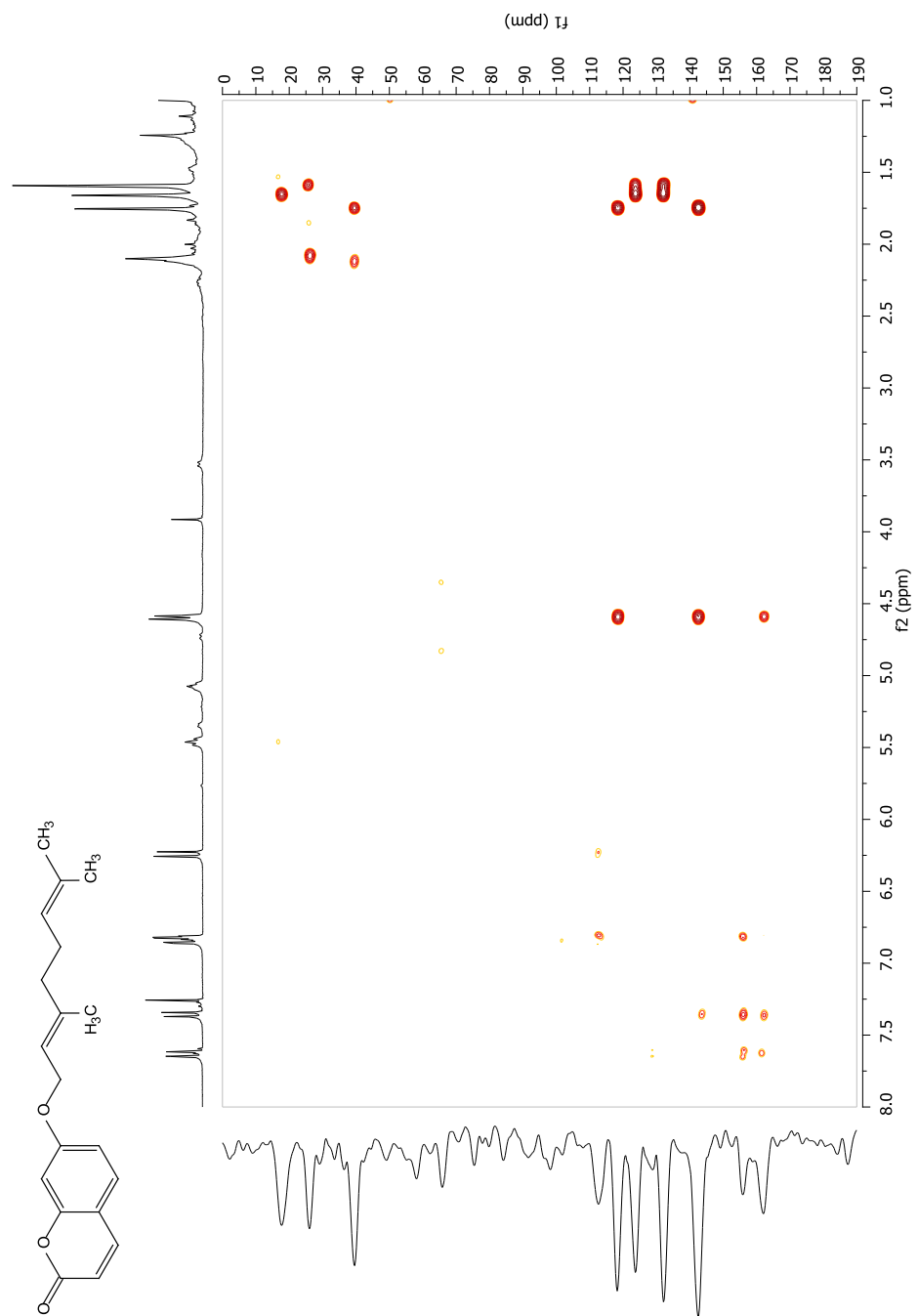
Espectro A. Espectro de ^1H NMR del Bergaptol.



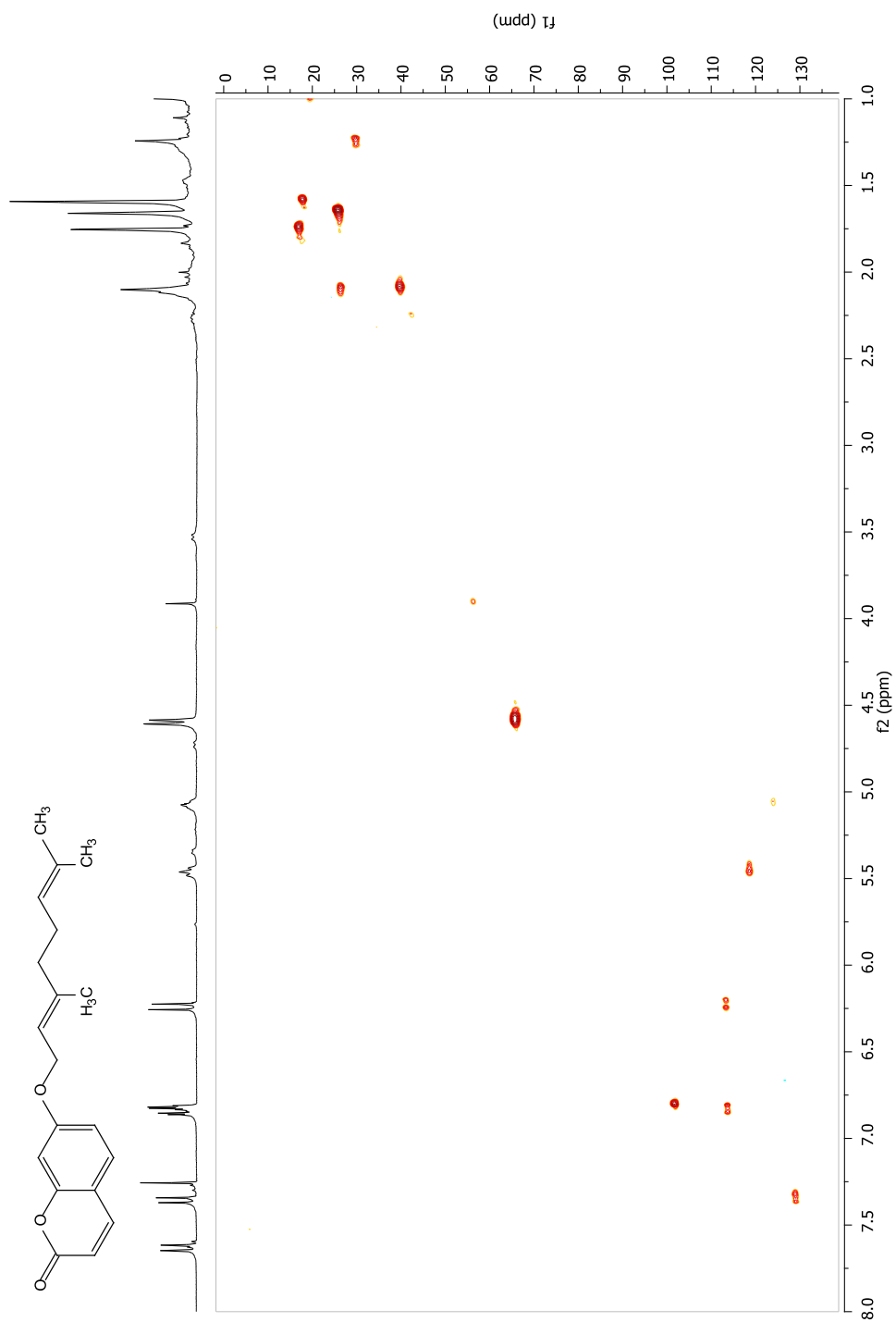
Espectro B. Espectro de ^1H NMR de la Geranil cumarina.



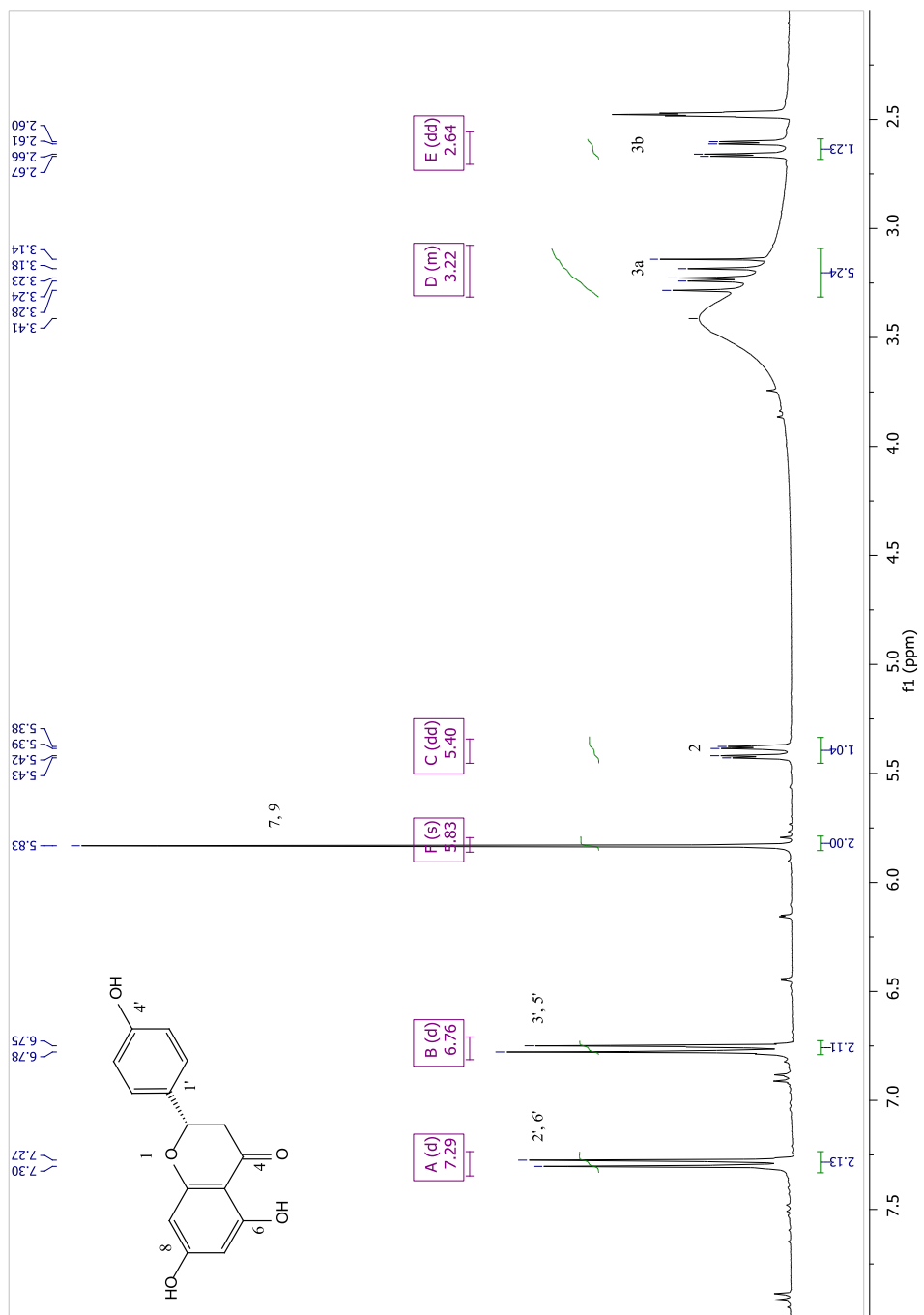
Espectro B.1 Espectro de COSY de la Geranil cumarina.



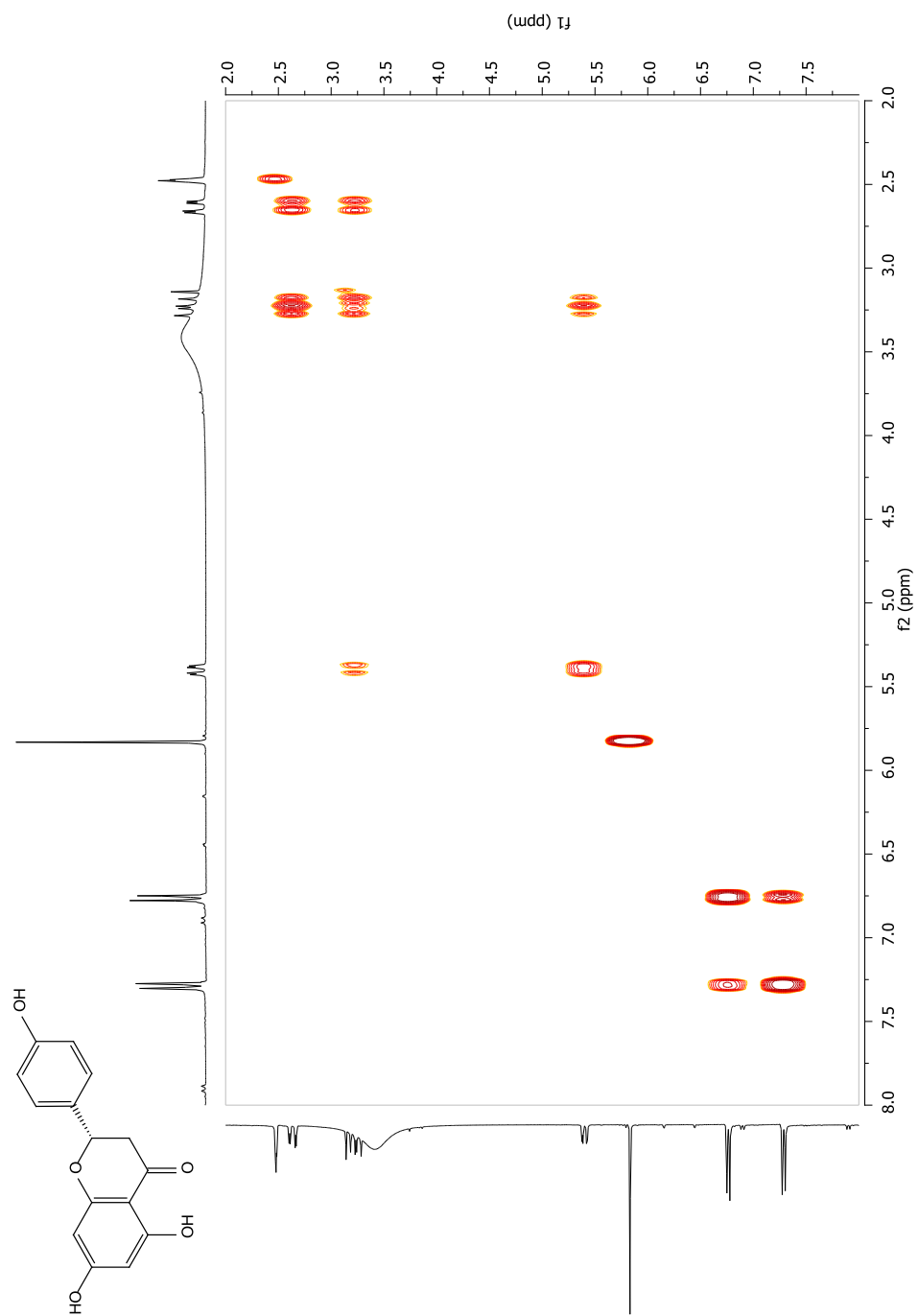
Espectro B.2 Espectro de HMBC de la Geranyl cumarina.



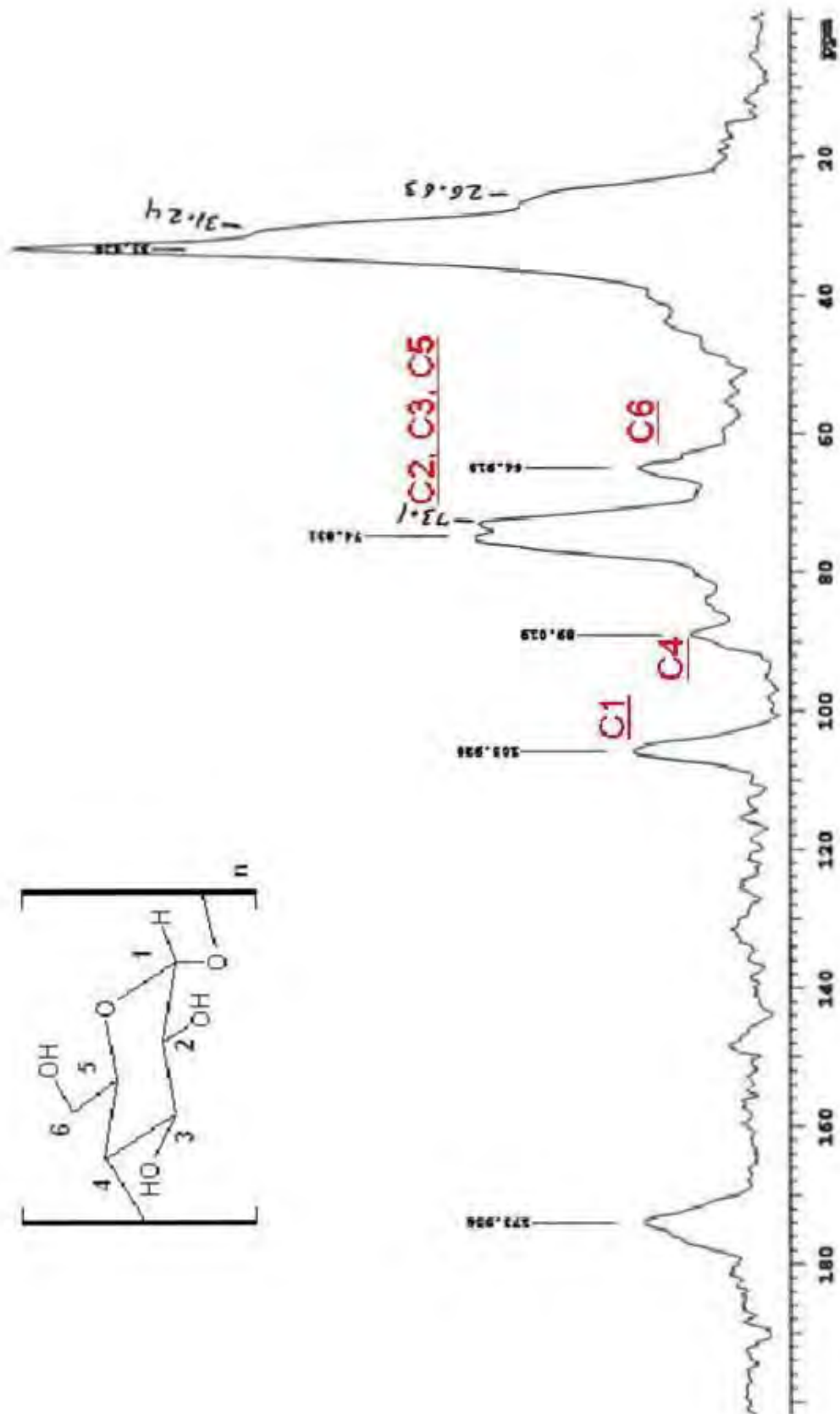
Espectro B.3 Espectro de HMQC de la Geranil cumarina.



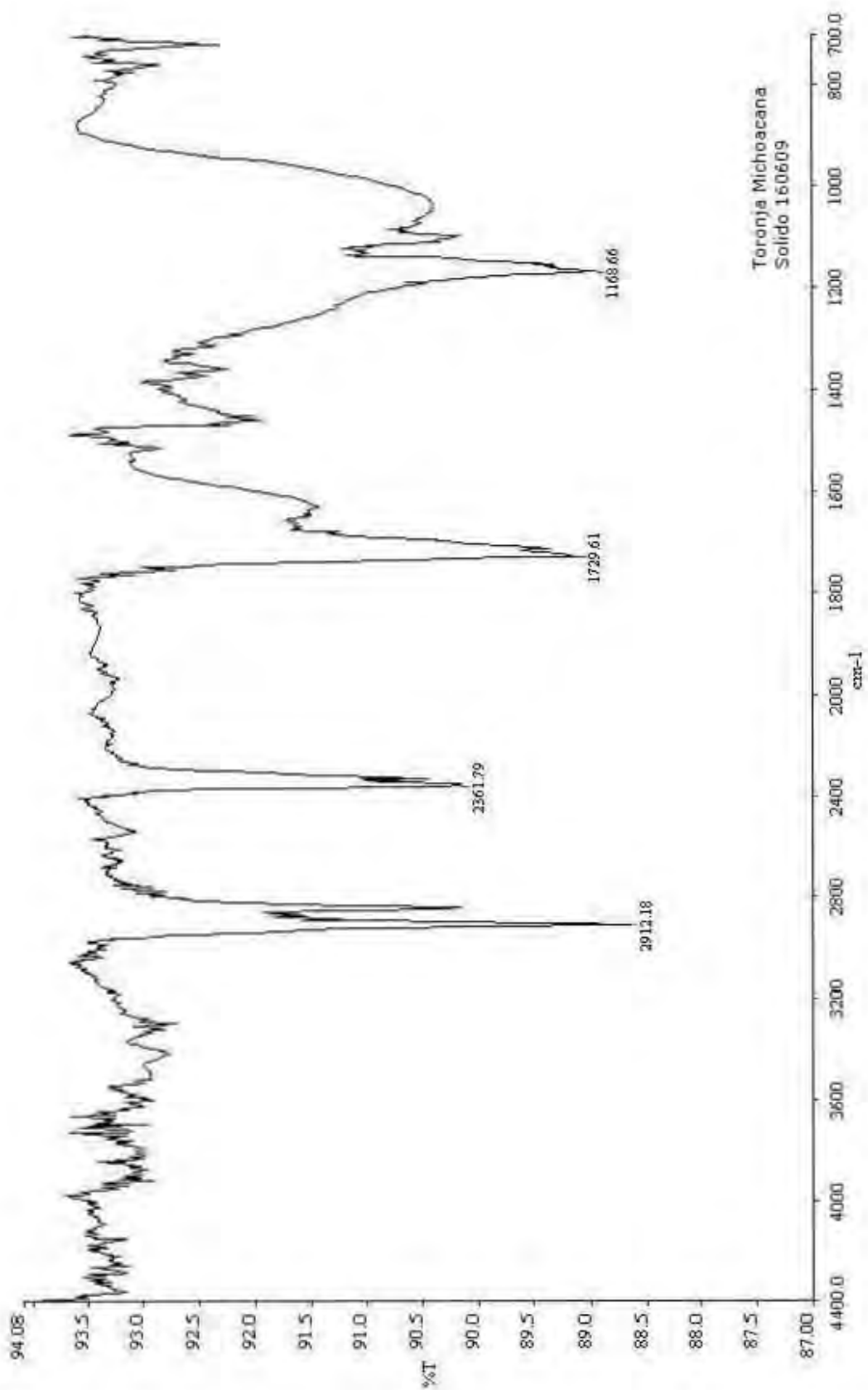
Espectro C. Espectro de ^1H NMR de la Naringenina.



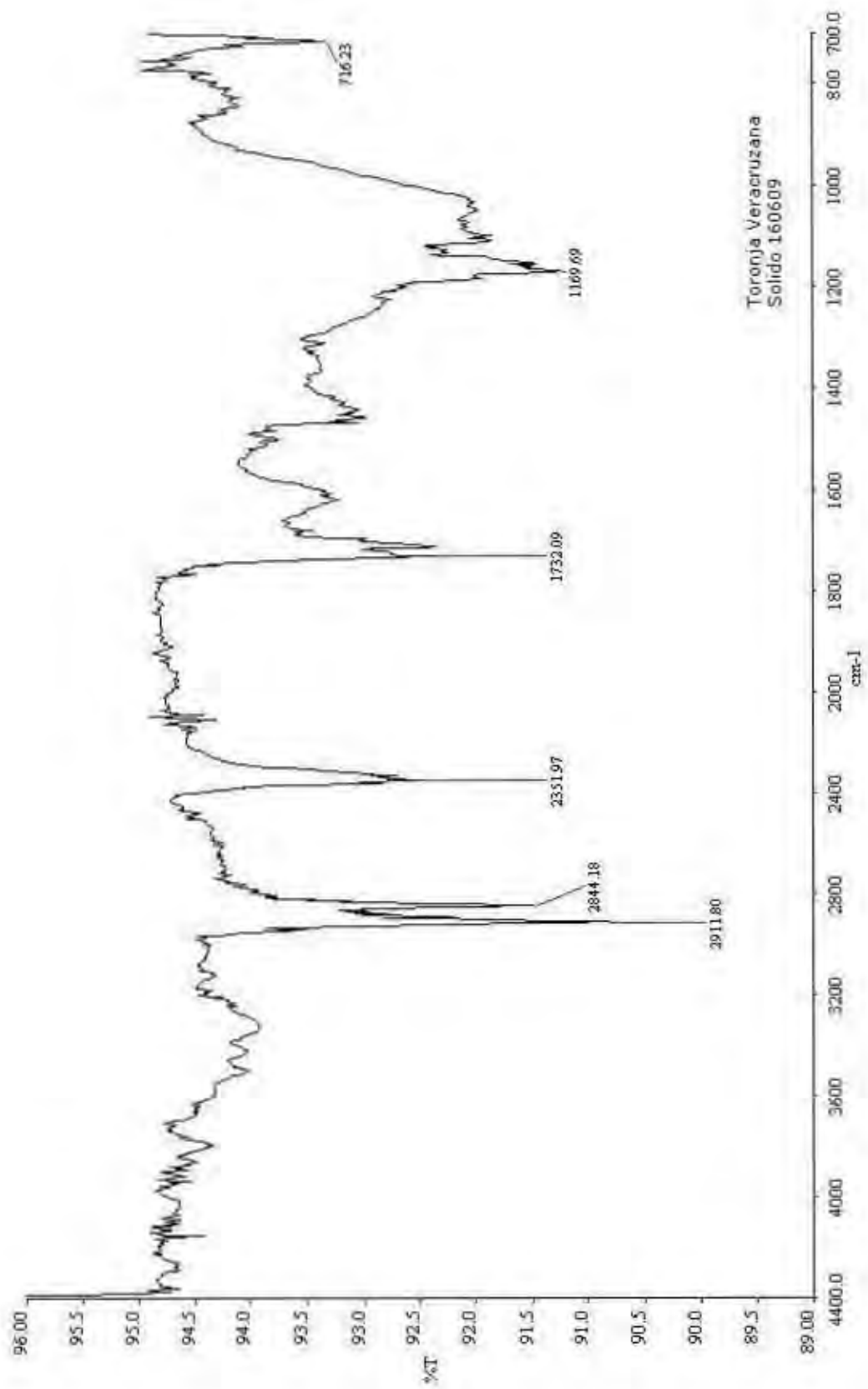
Espectro C.1 Espectro de COSY de la Naringenina.



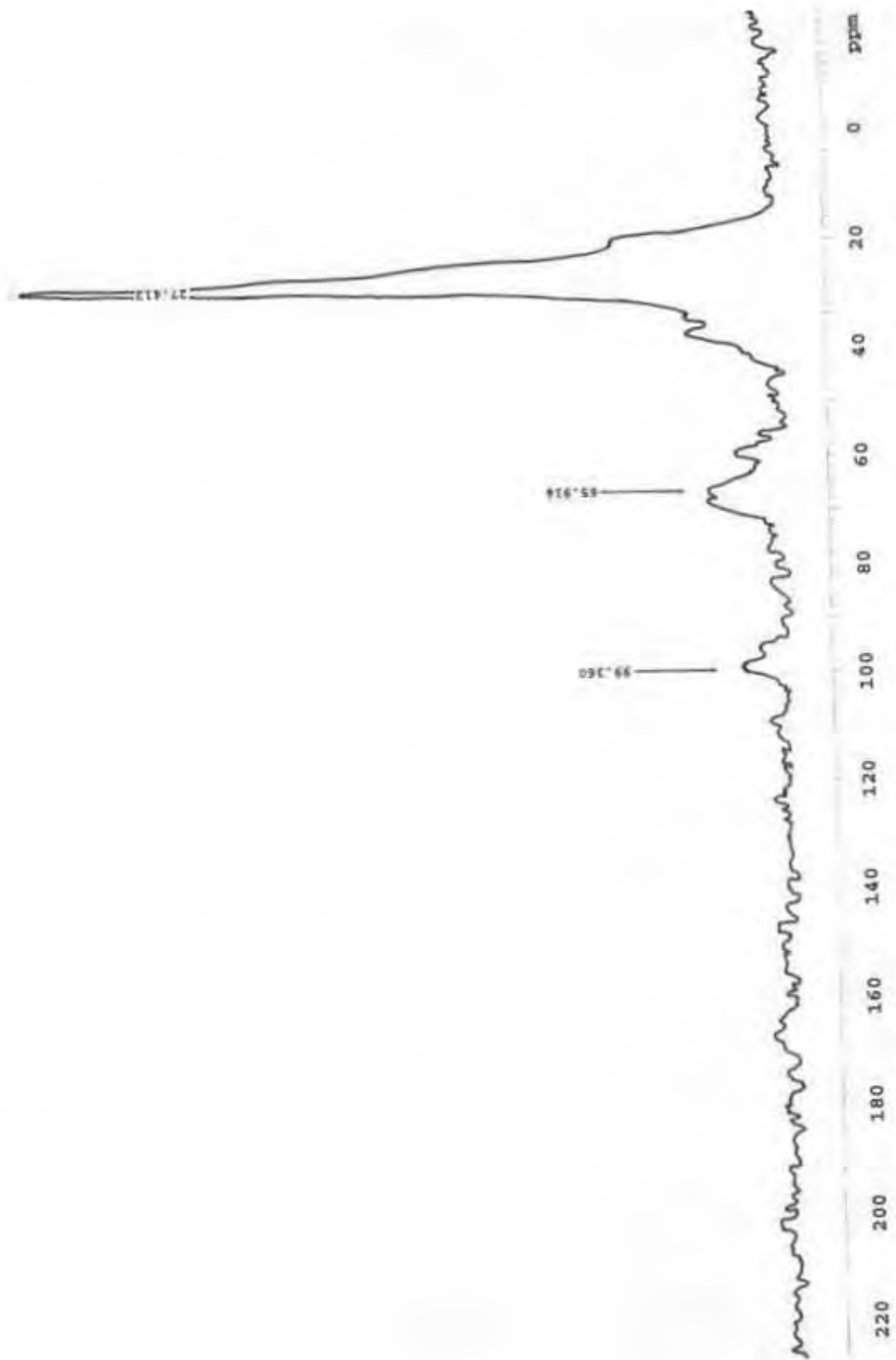
Espectro 1. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de la toronja.



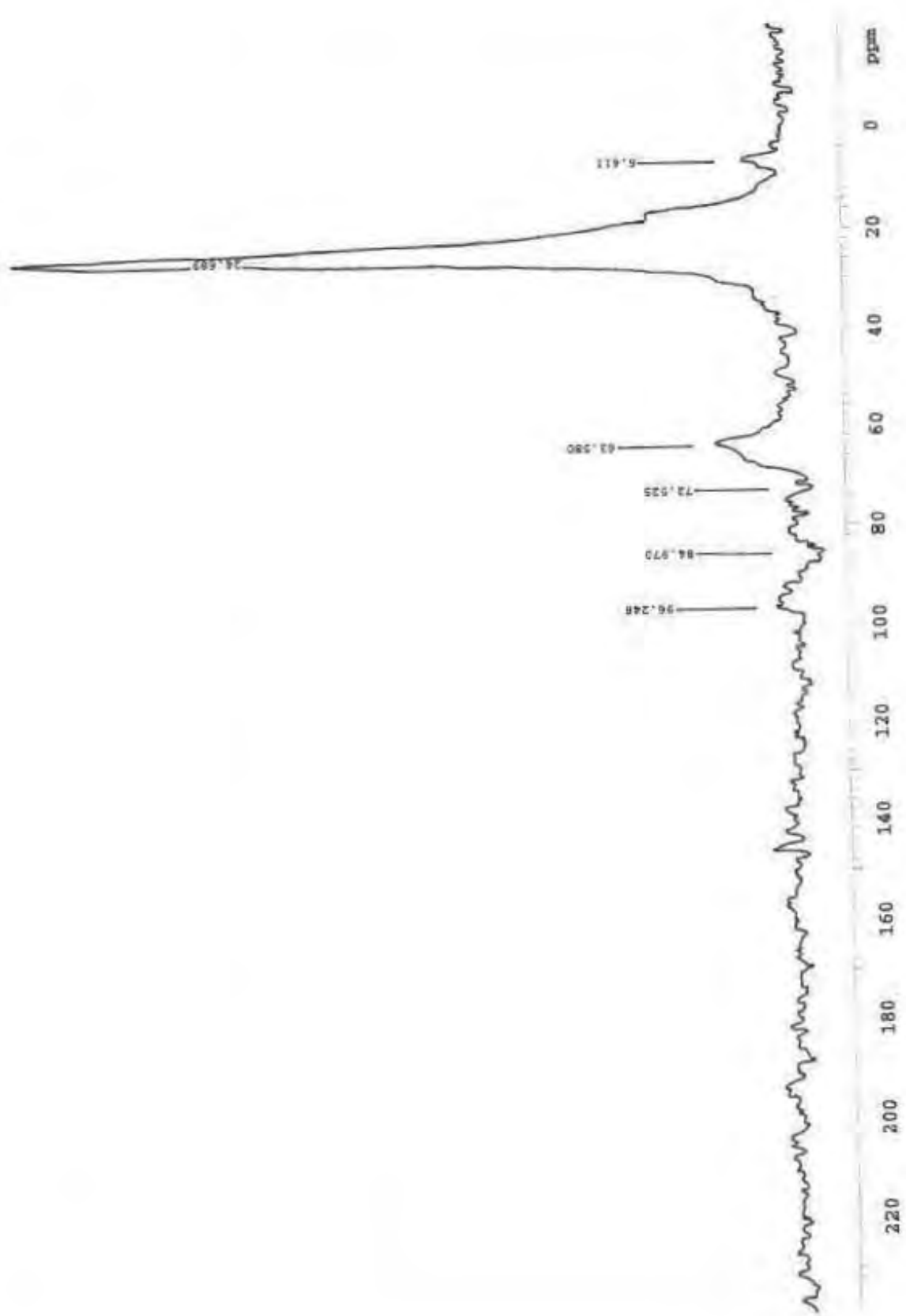
Espectro 2. Espectro de FT-IR de la cutícula de Toronja Michoacana.



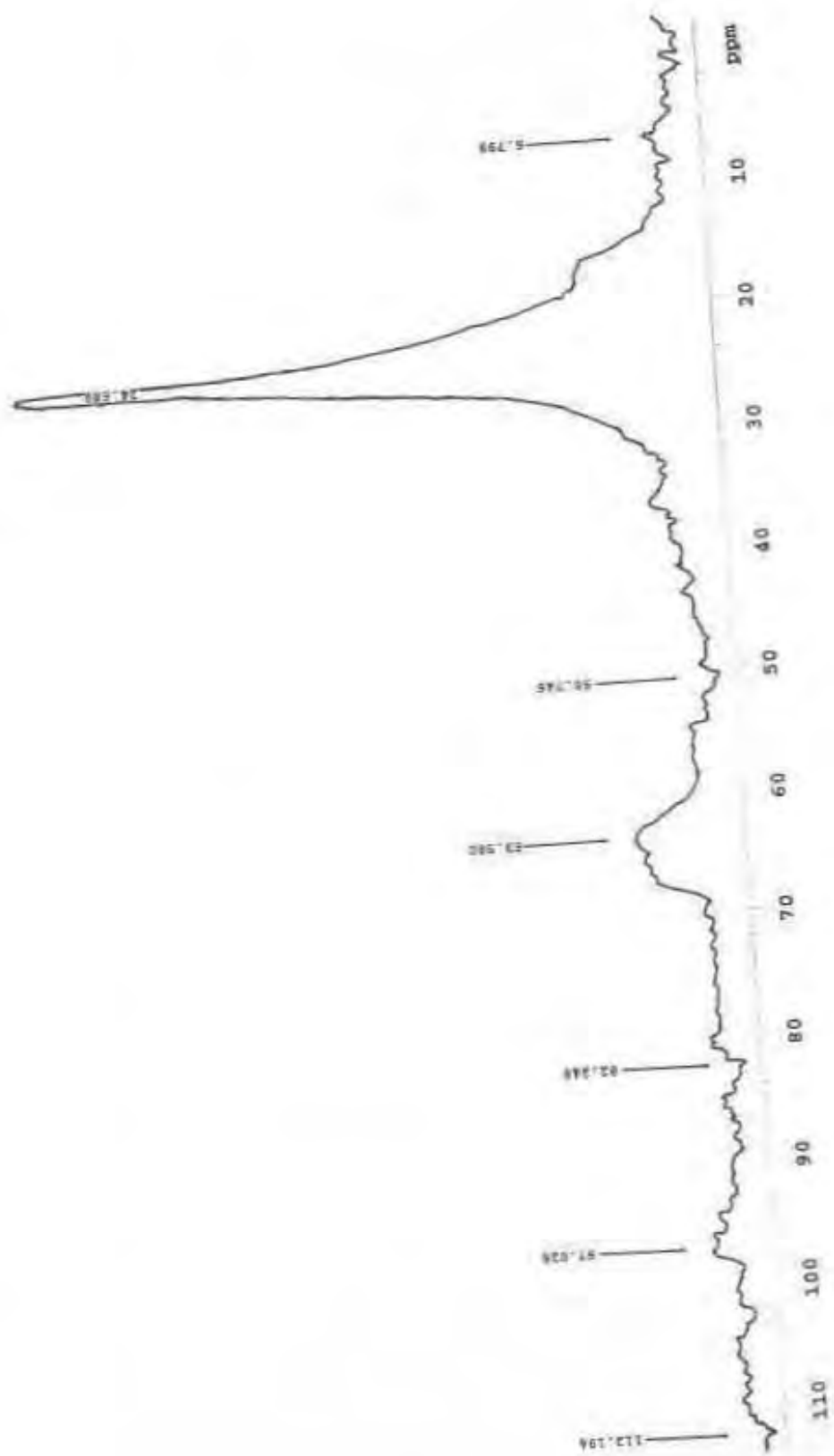
Espectro 3. Espectro de FT-IR de la cutícula de Toronja Veracruzana.



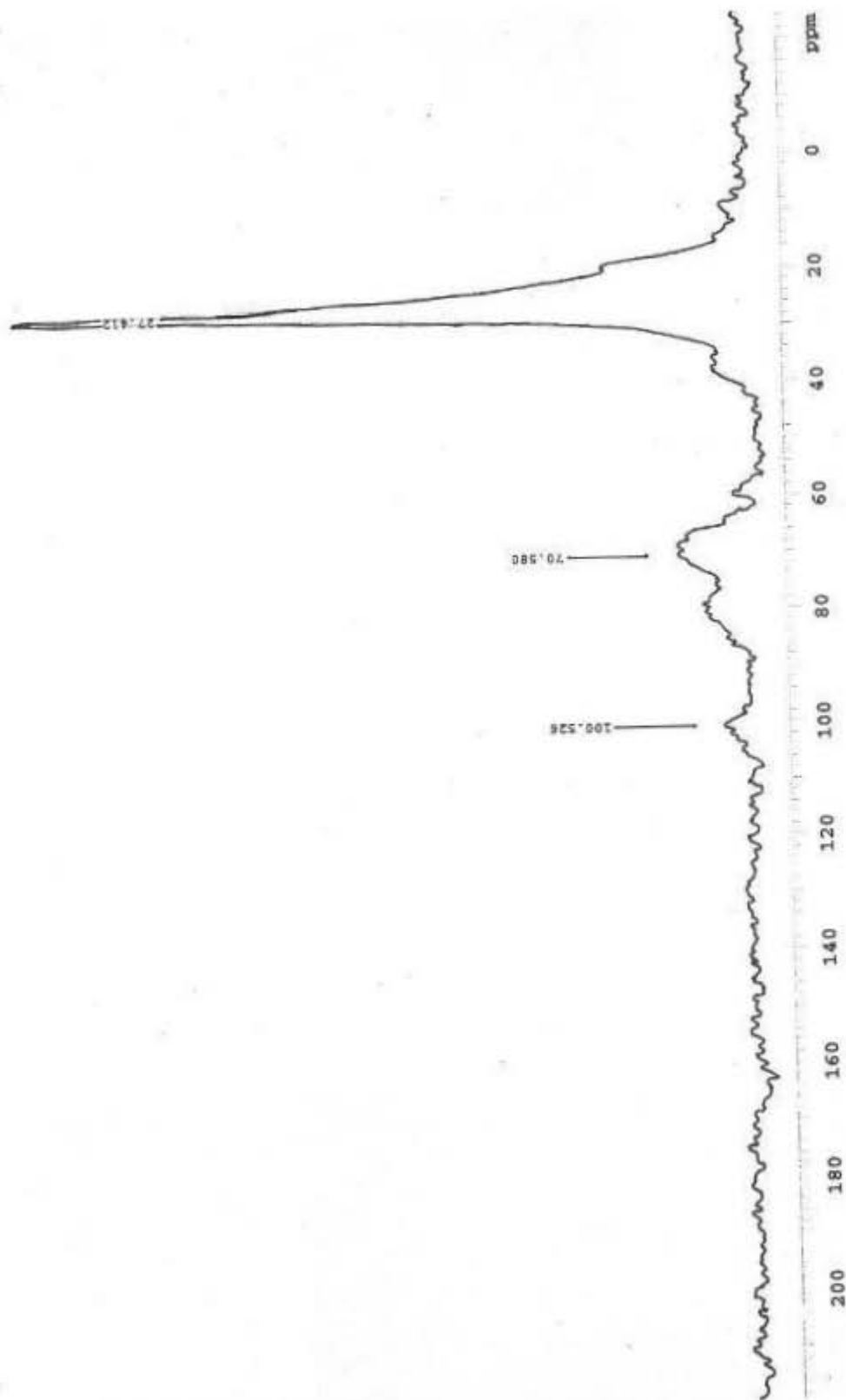
Espectro 4. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de Toronja Michoacana TFA 10 mM.



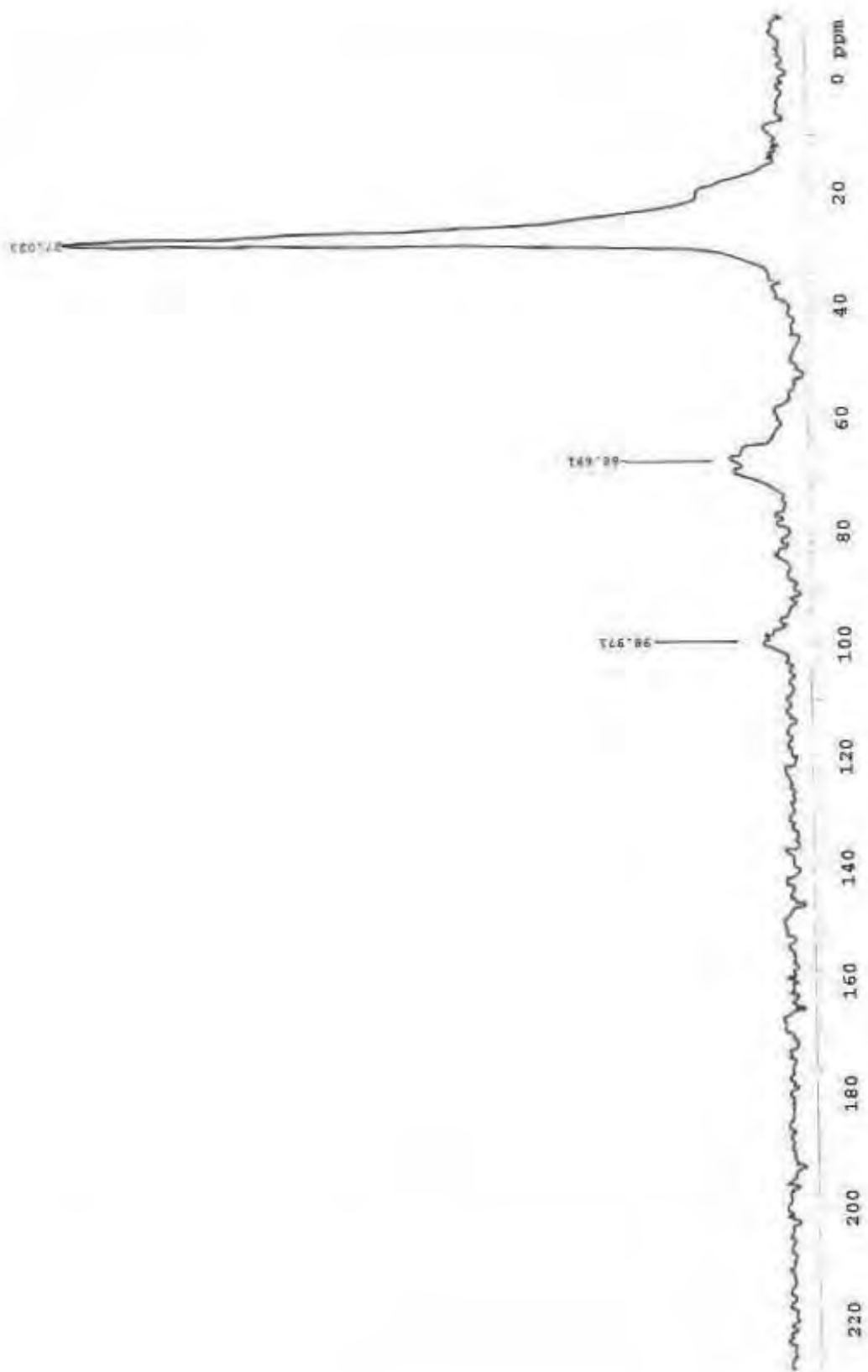
Espectro 5. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de Toronja Michoacana 1 M.



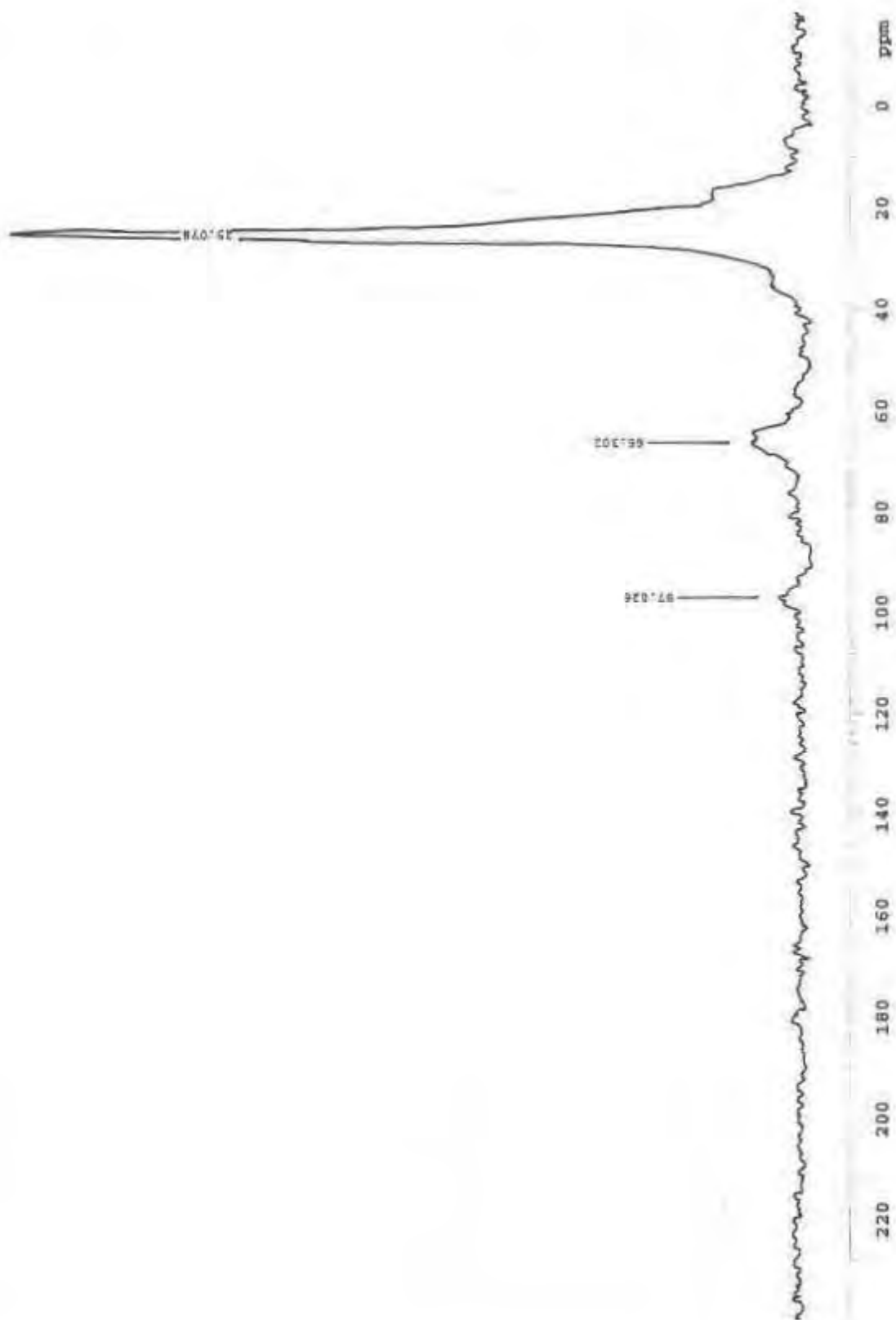
Espectro 6. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de Toronja Michoacana 2 M.



Espectro 7. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de Toronja Veracruzana 10 mM.

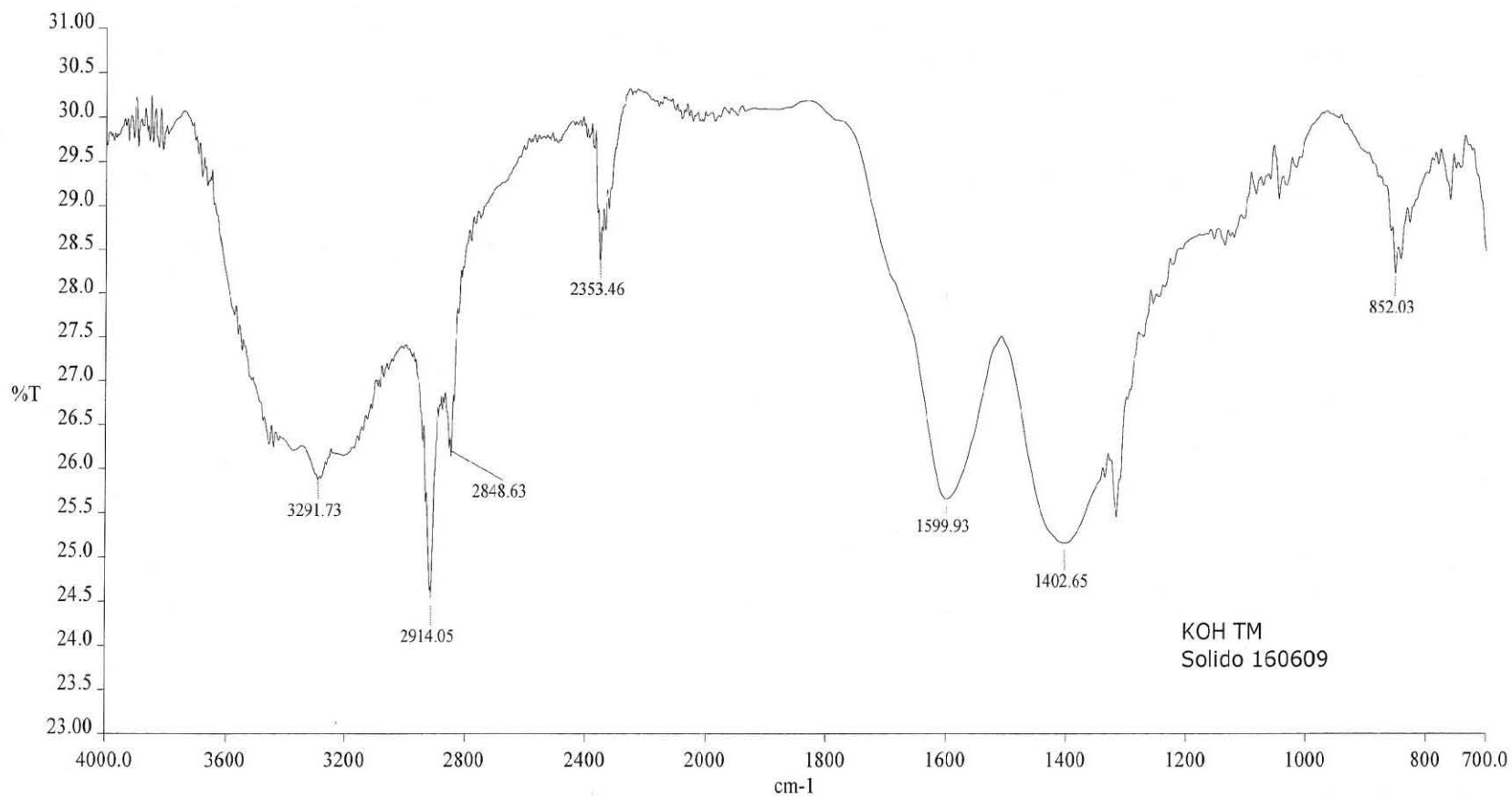


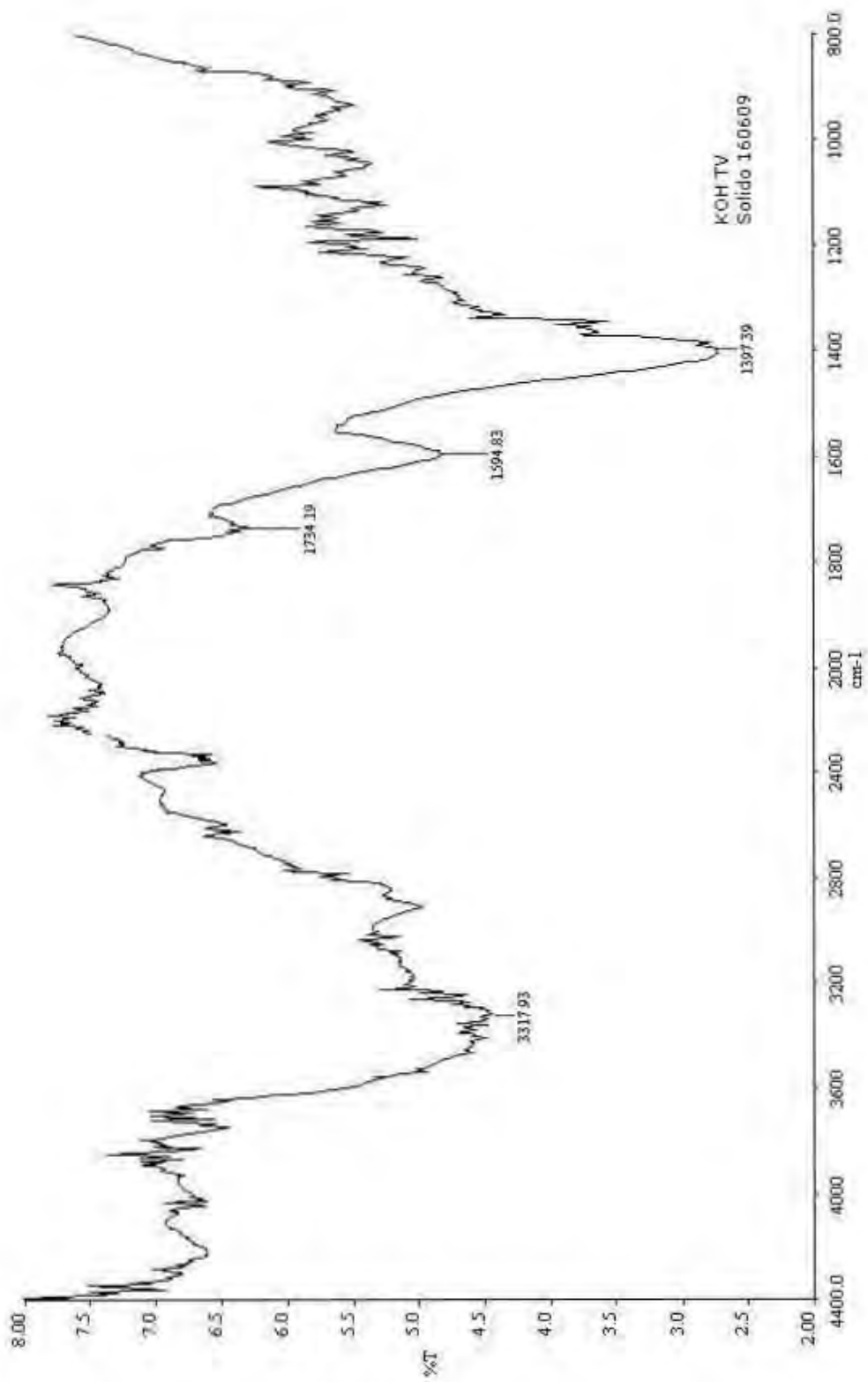
Espectro 8. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de Toronja Veracruzana 1 M.



Espectro 9. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula de Toronja Veracruzana 2 M.

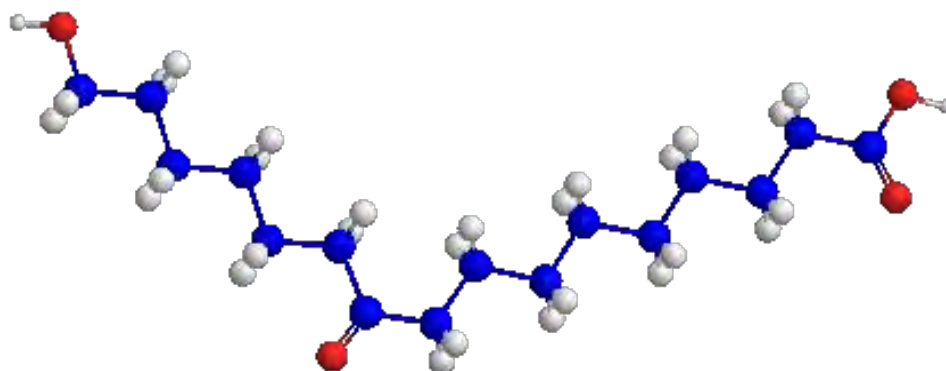
Espectro 10. Espectro de FT-IR de la fracción insoluble KOH Toronja Michoacana.

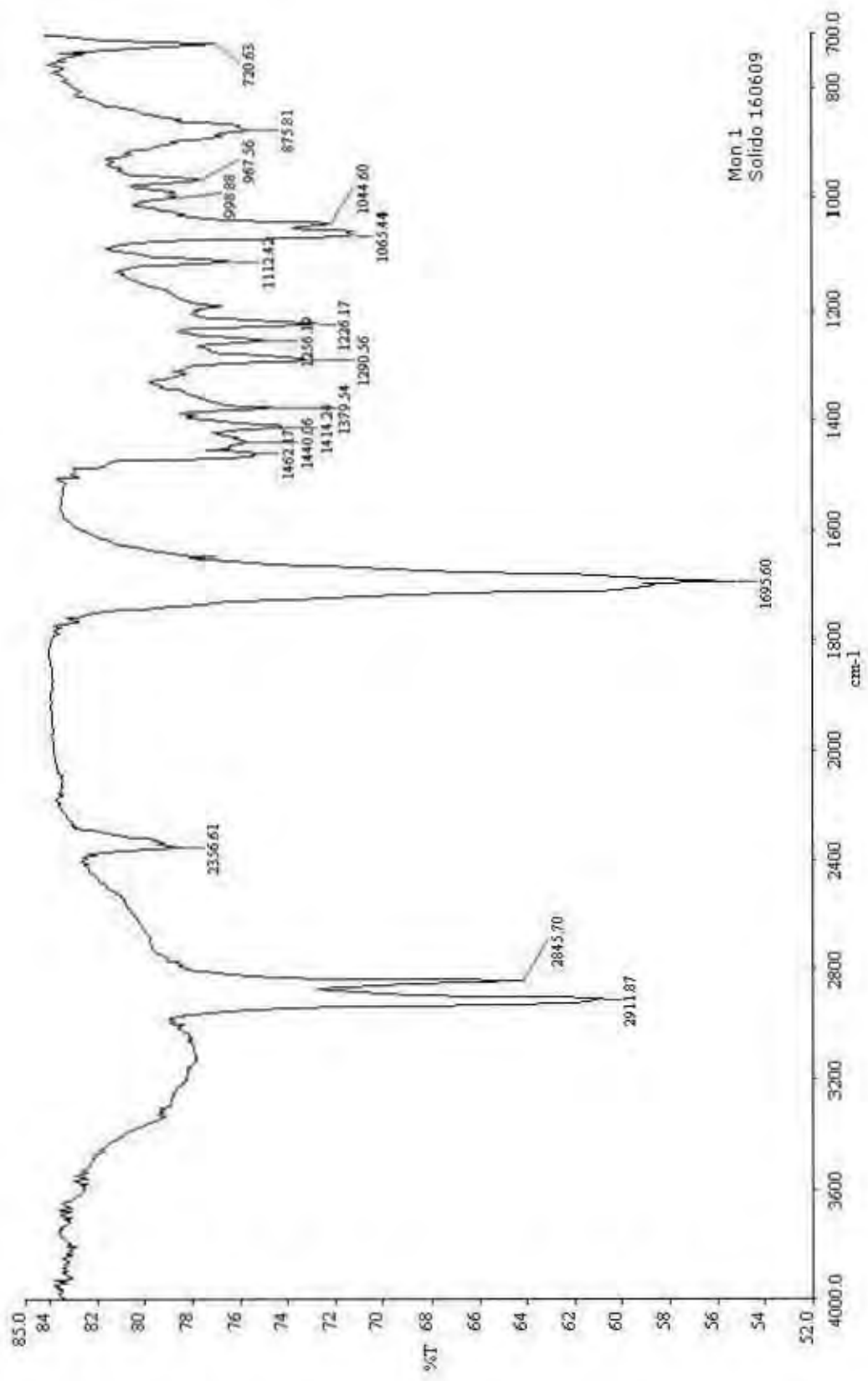




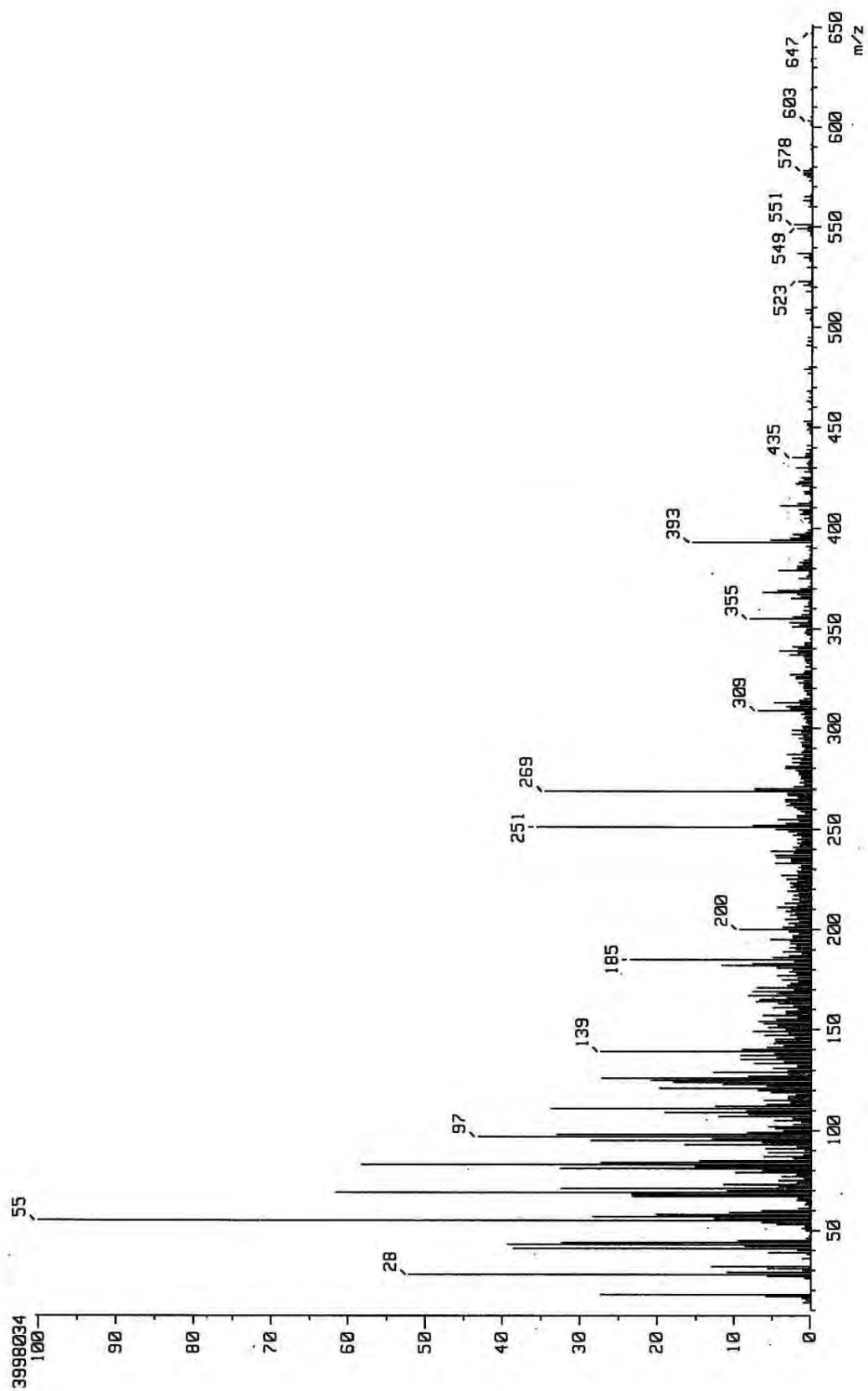
Espectro 11. Espectro de FT-IR de la fracción insoluble KOH Toronja Veracruzana.

MONOMERO 1
ACIDO 16-HIDROXI-10-OXO-HEXADECANOICO





Espectro 12. Espectro de FT-IR del monómero 1.



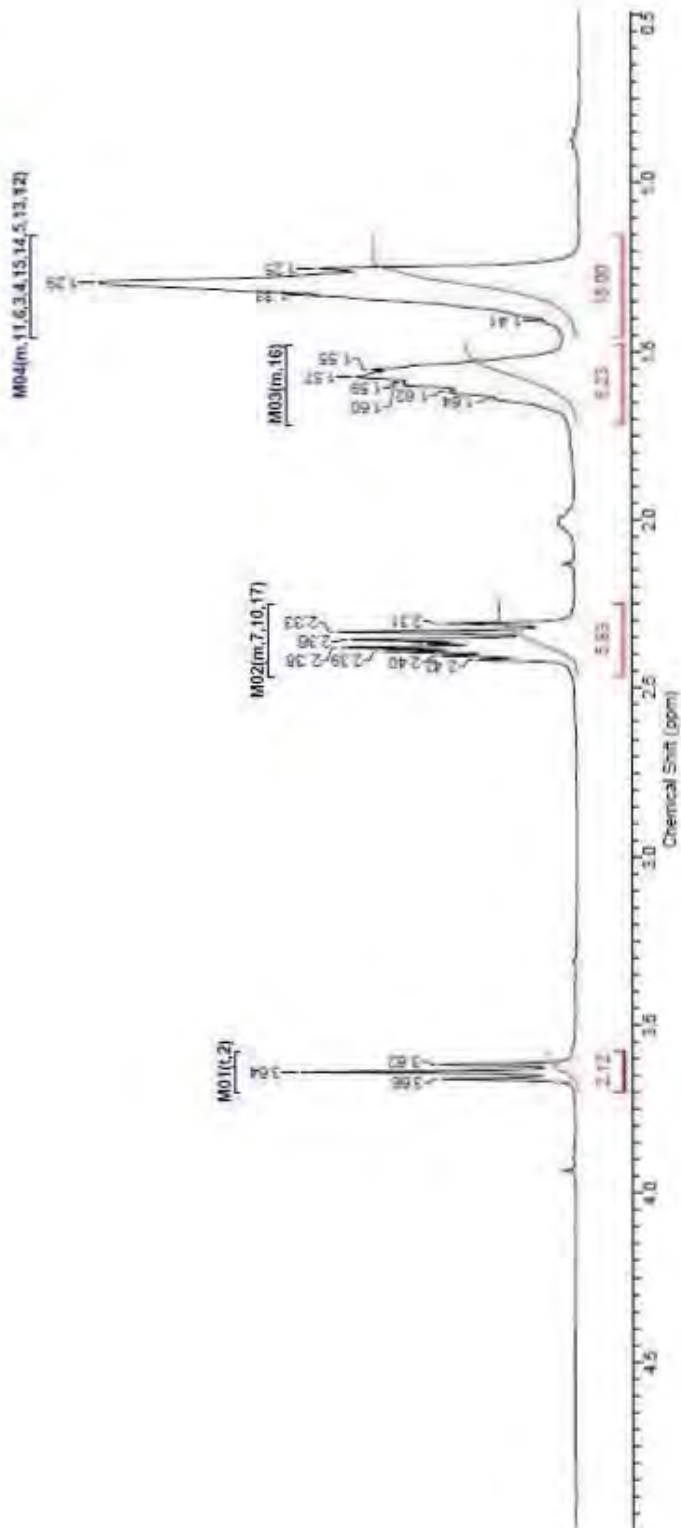
Espectro 13. Espectrometría de masas (IE) del monómero 1.

1D ¹H NMR Verification Status: Automatic 1D ¹H NMR Verification Result: Consistent

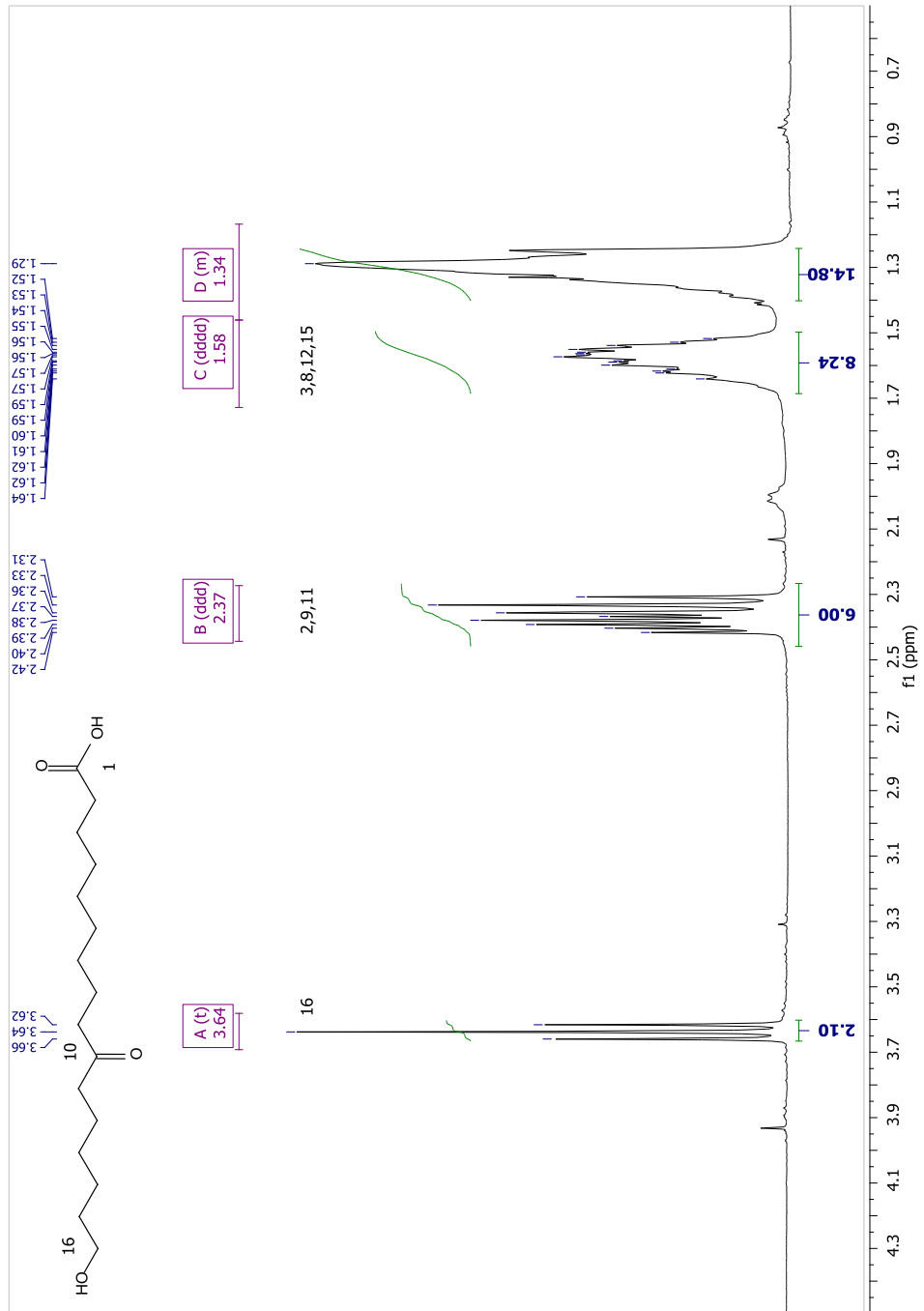
Formula: C₁₀H₈O₄ FW: 200.1470

Acquisition Time (sec)	1.0000	Std Proton parameters	Date	Sep 26 2008
Date Stamp	Sep 26 2008	C:\Documents and Settings\ARRCAN\My Documents\PMN-2008\PMN\1m1\092608_DAB_Tor_Mon01_1H_CDCl3.fid.tif	File Name	
Frequency (MHz)	300.15	Nucleus	¹ H	Original Points Count
Points Count	15384	Pulse Sequence	s2ou1	9592
Spectrum Offset (Hz)	1500.6250	Spectrum Type	STANDARD	Solvent
				CHLOROFORM-d
				Temperature (degree C)
				AMBIENT TEMPERATURE

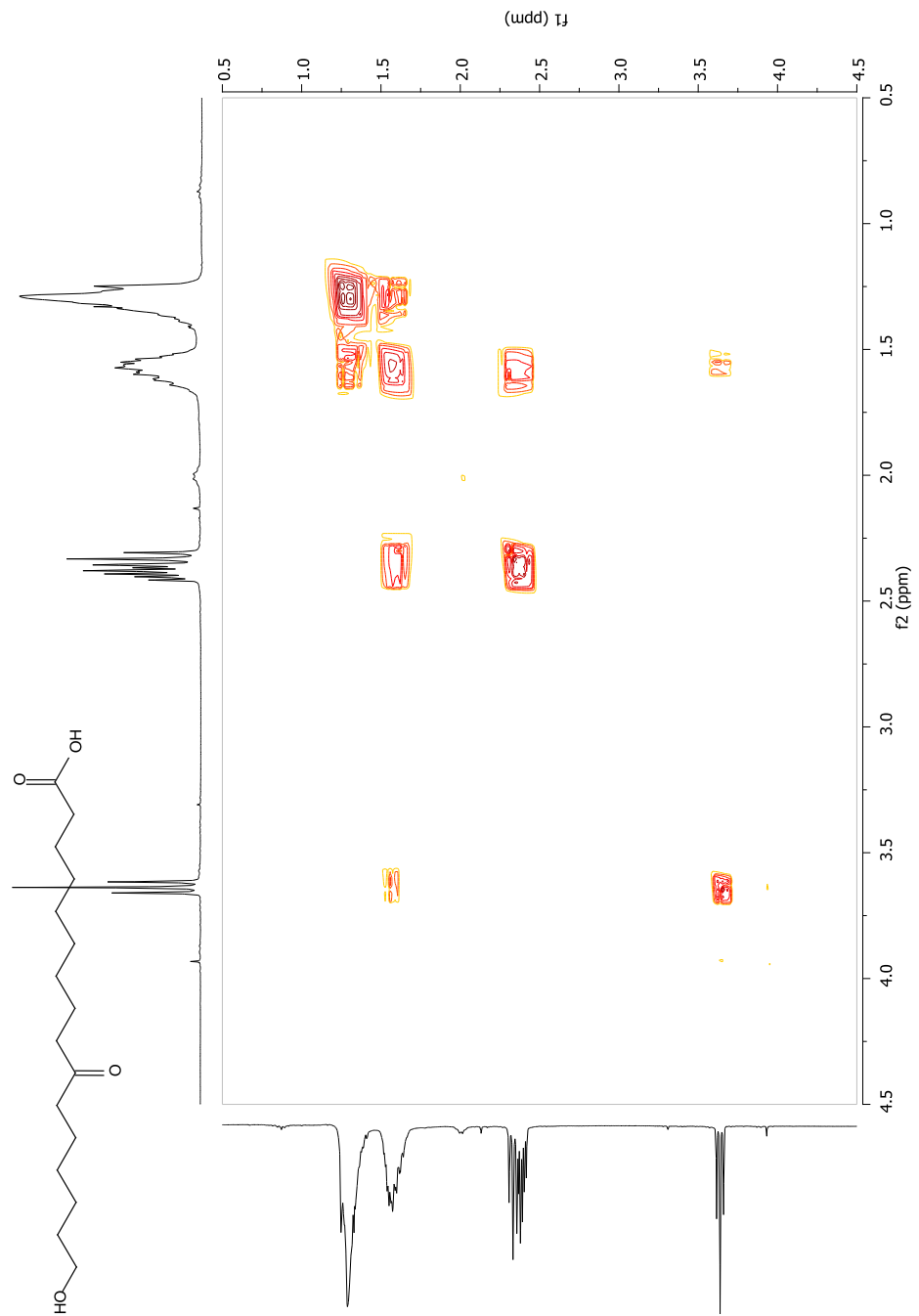
¹H NMR (300 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.15 - 1.45 (m, 15 H) 1.48 - 1.71 (m, 8 H) 2.25 - 2.46 (m, 6 H) 3.64 (t, J=6.45 Hz, 2 H)



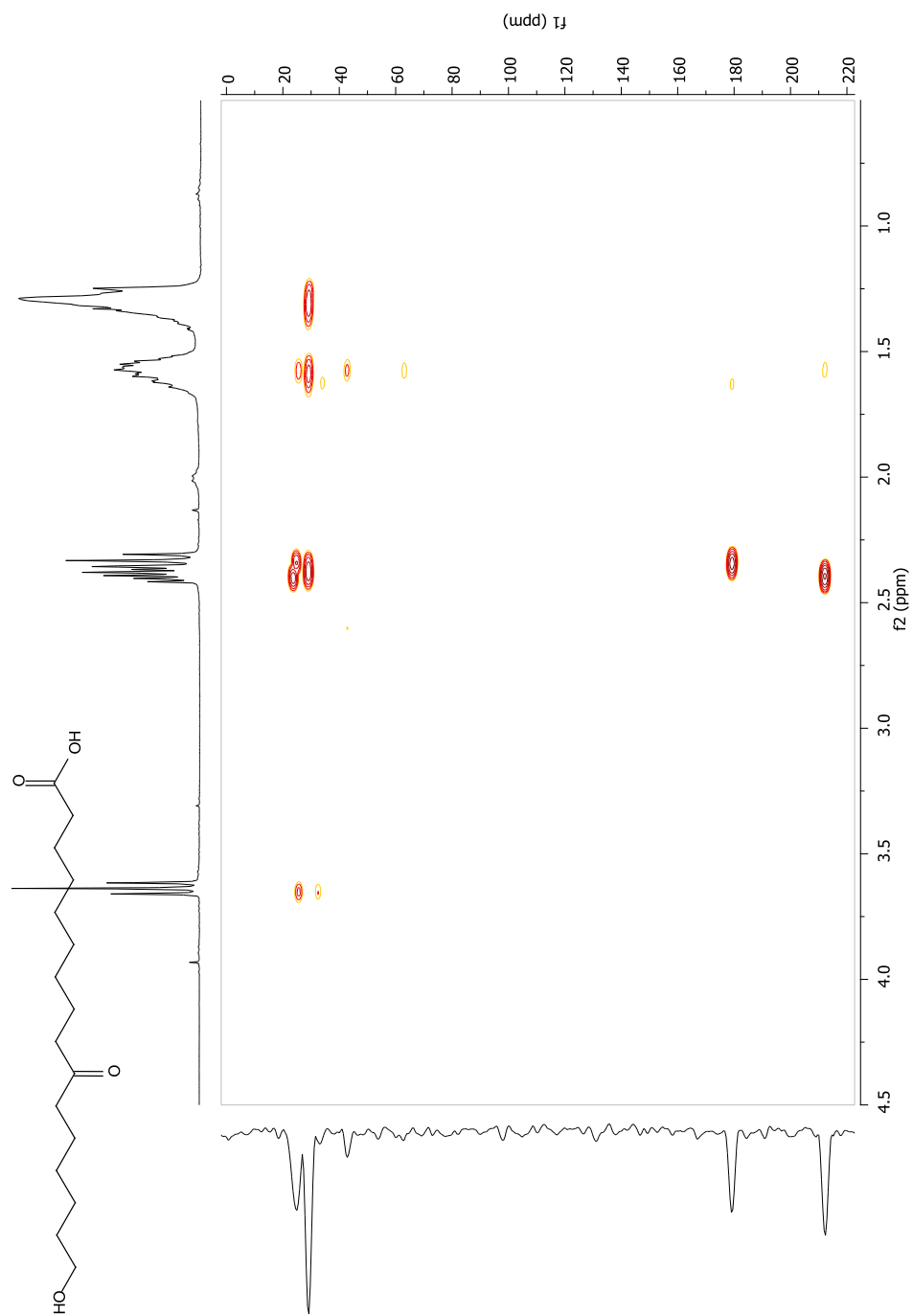
Espectro 14. Espectro de ¹H NMR del monómero 1. Análisis del FID con el programa ACD-Predictor para confirmar la estructura.



Espectro 15. Espectro de ¹H NMR del monómero 1.

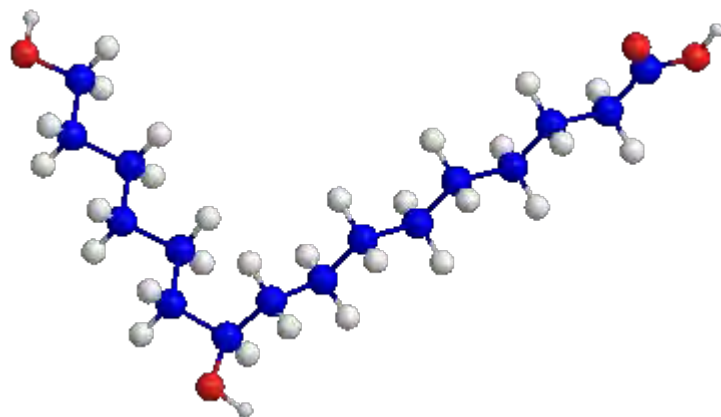


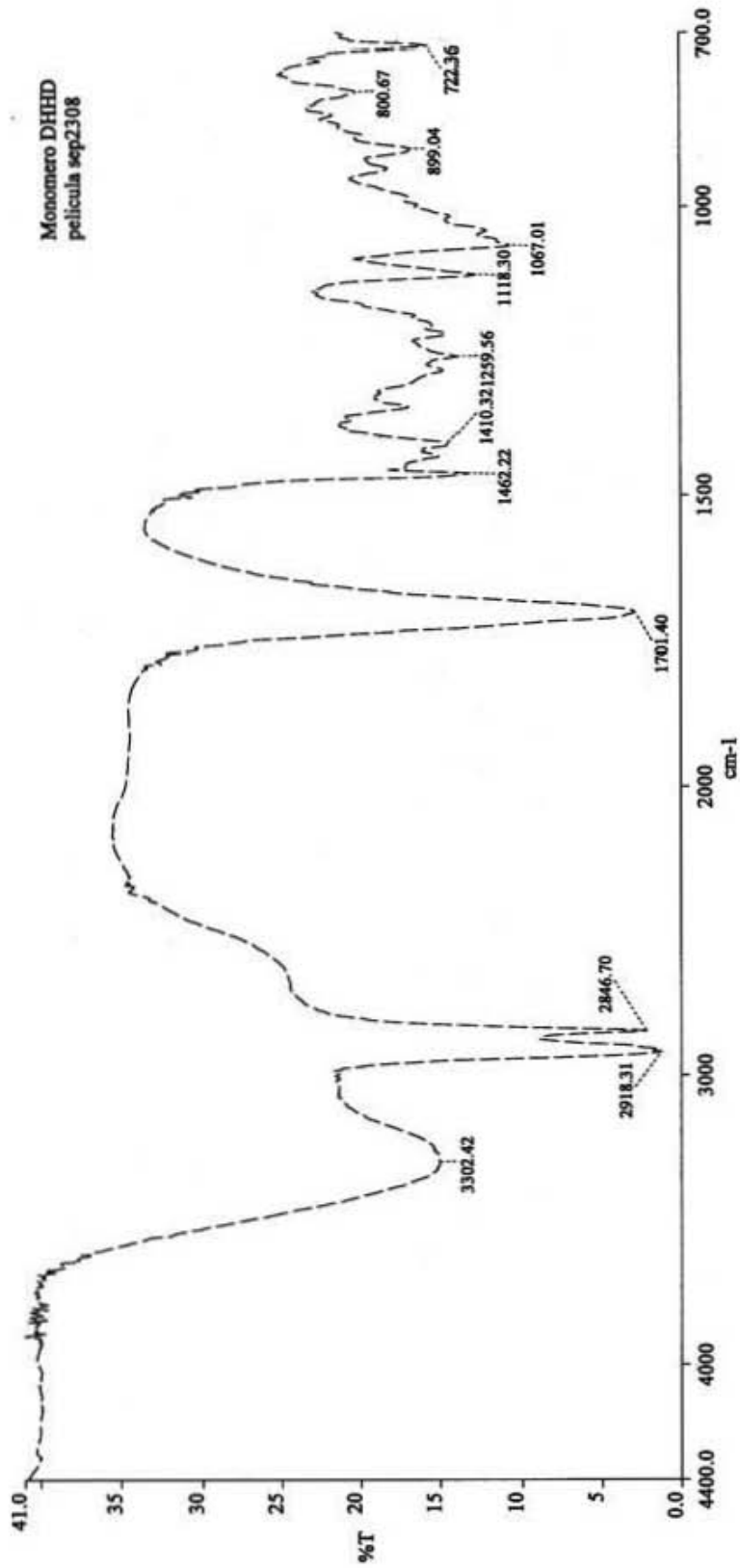
Espectro 16. Espectro de COSY del monómero 1.



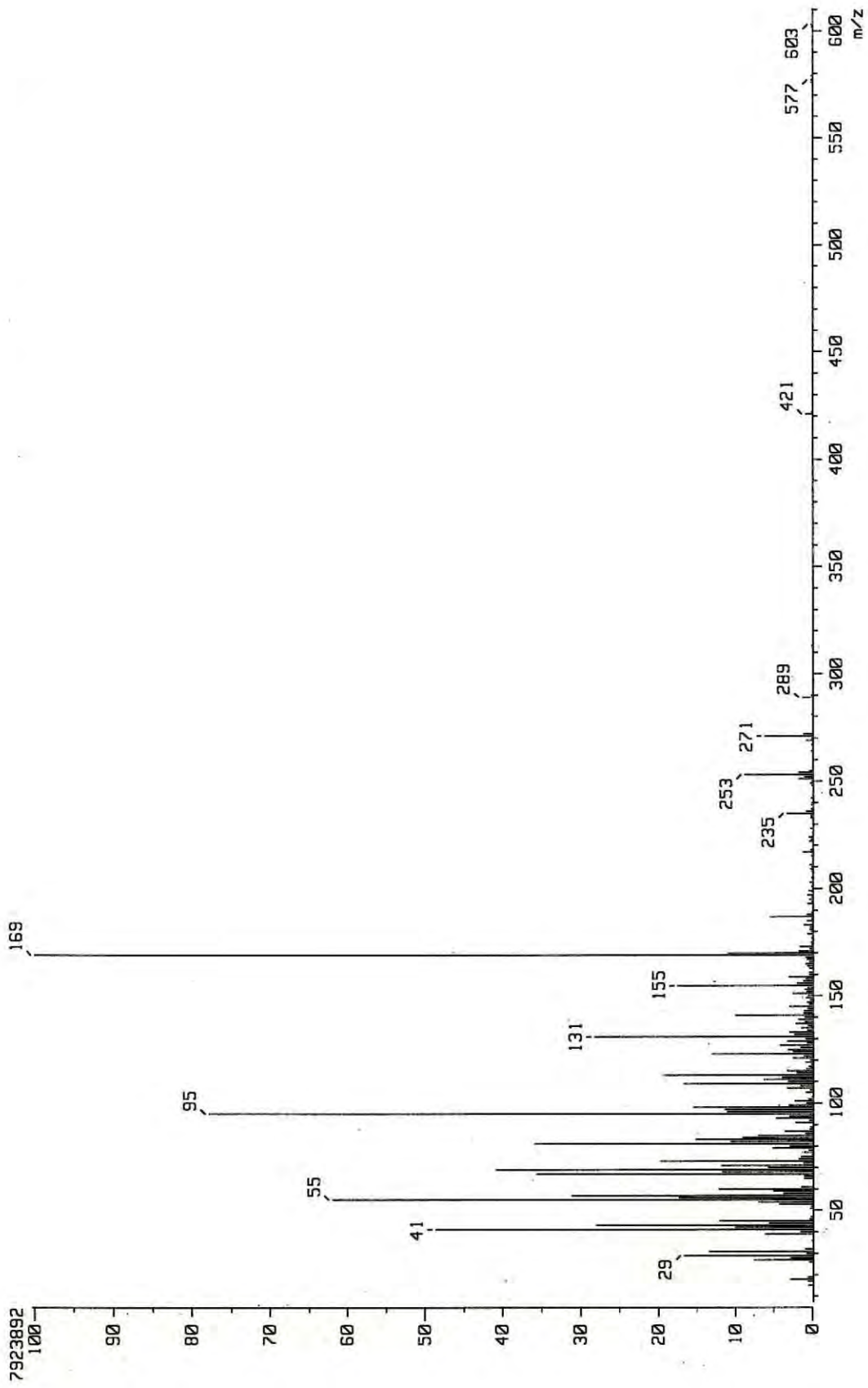
Espectro 17. Espectro de HMBC del monómero 1.

MONOMERO 2
ACIDO 10,16-DIHIDROXIHEXADECANOICO

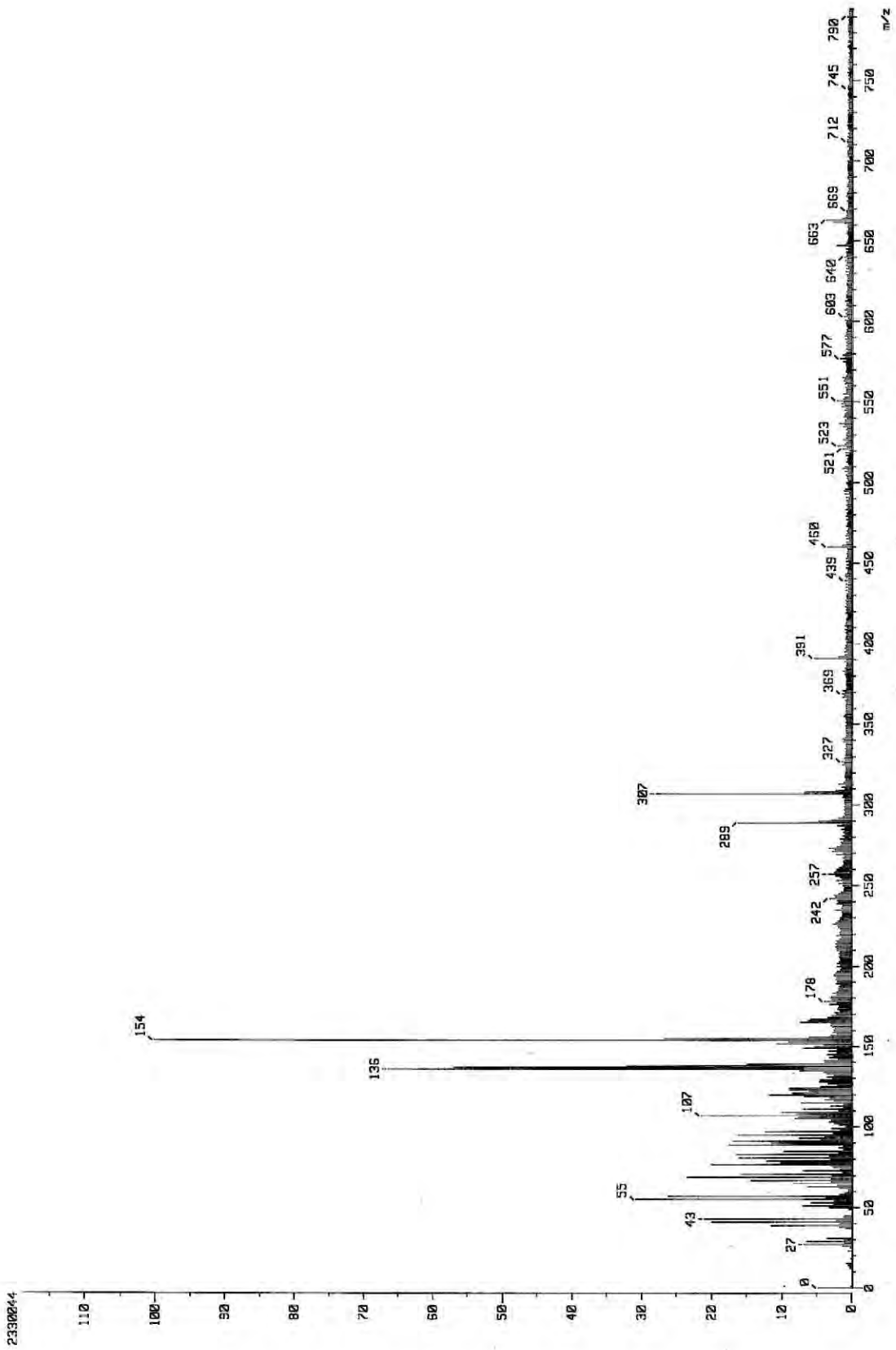




Espectro 18. Espectro de FT-IR del monómero 2.



Espectro 19. Espectro de masas (IE) del monómero 2.

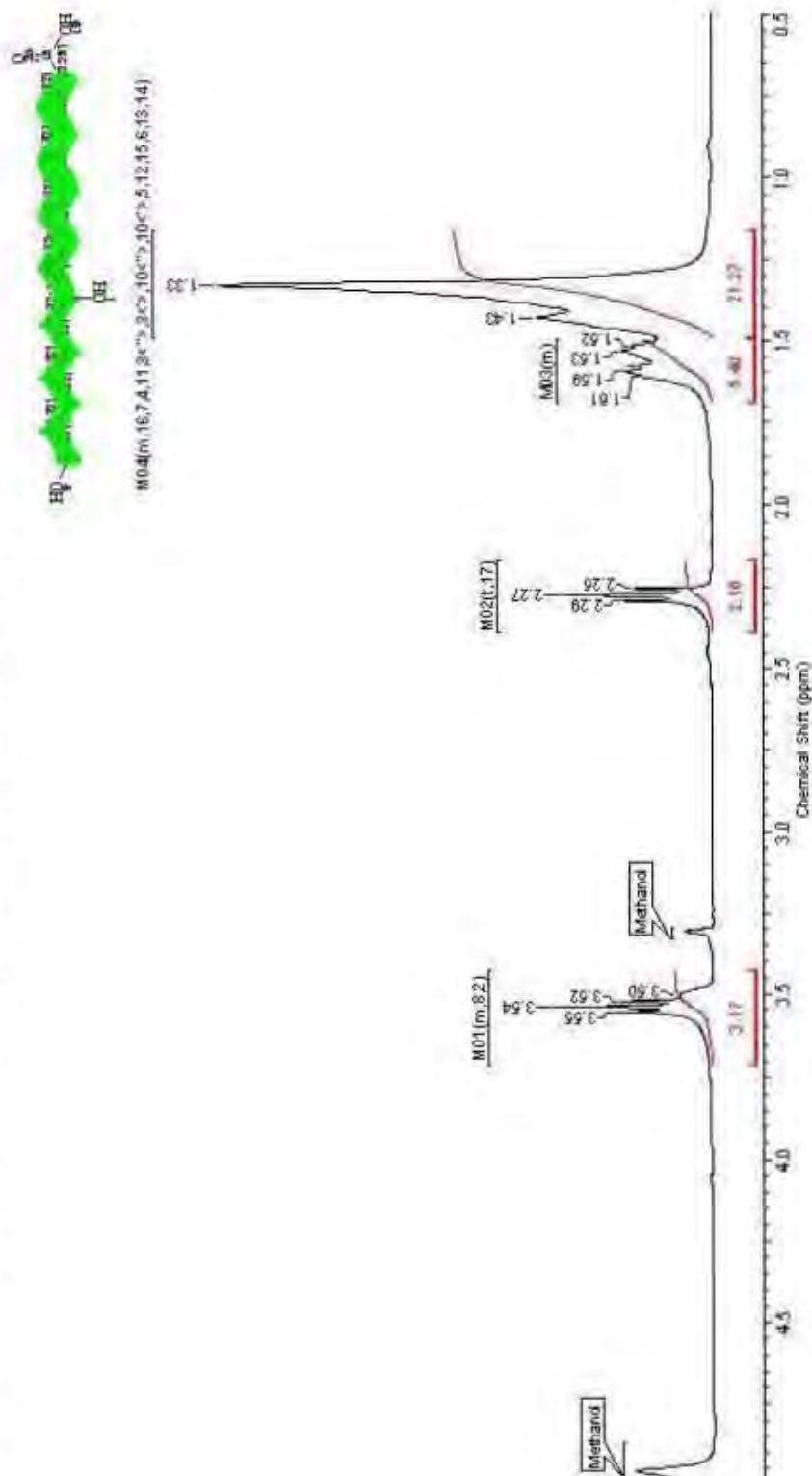


Espectro 20. Espectro de masas (FAB) del monómero 2.

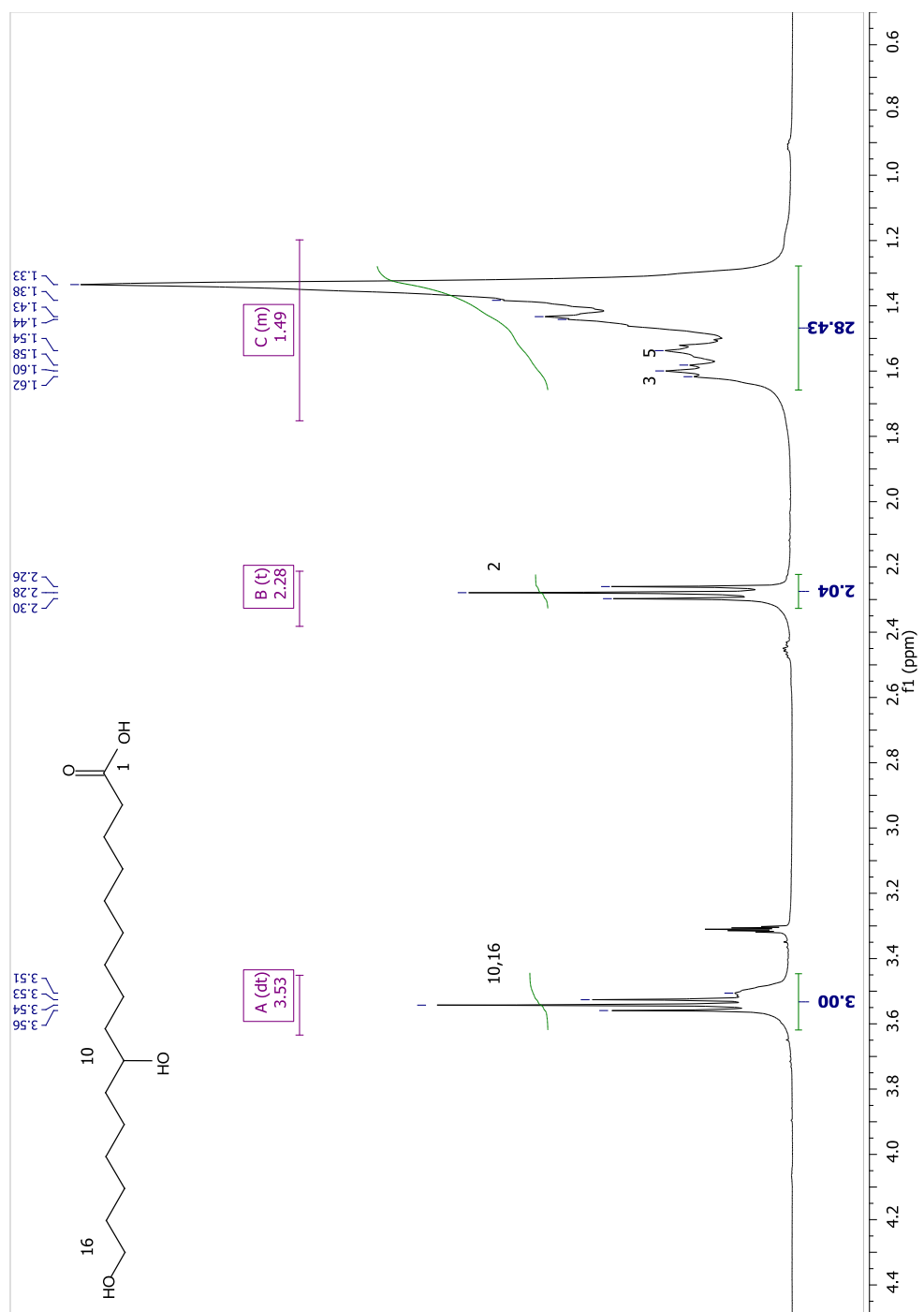
1D NMR Verification Status: Automatic 1D NMR Verification Result: Consistent

Formula	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	FW	208.4219
Acquisition Title (desc)	1.9950	Comment	UHM-X
File Name	C:\Documents and Settings\ARRICA\My Documents\RMN0009\Tolu, NMR\Mon2_Branda 1H_C010D\64	Date Stamp	Mar 27 2009
Nucleus	1H	Original Points Count	11982
Pulse Sequence	zgpg	Solvent	METHANOL-d4
Spectrum Type	STANDARD	Temperature (degree C)	AMBIENT TEMPERATURE
		Number of Transients	64
		Receiver Gain	16.00
		Sweep Width (Hz)	6006.01
		Frequency (MHz)	400.10
		Points Count	16384
		Spectrum Offset (Hz)	2001.0193

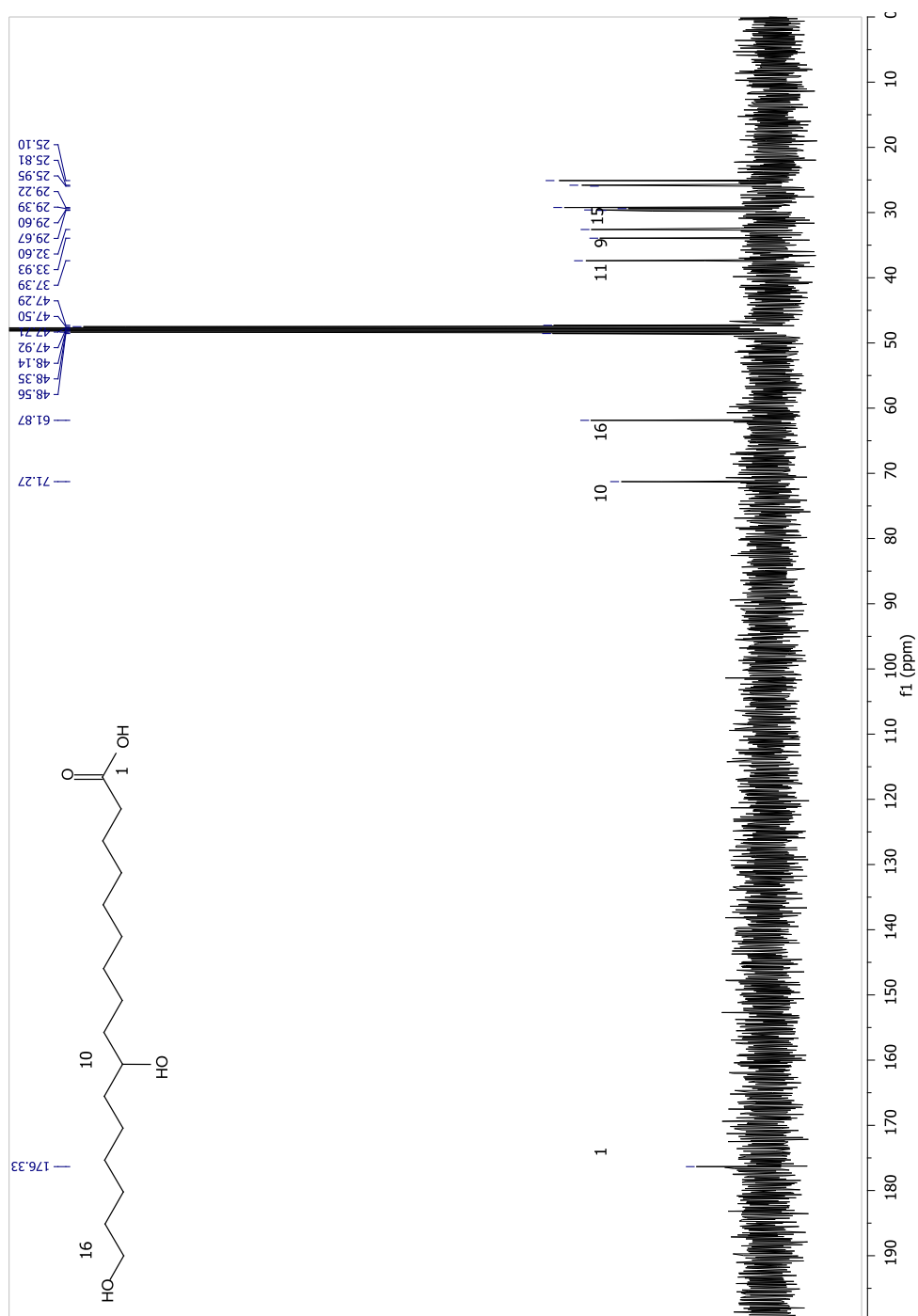
¹H NMR (400 MHz, METHANOL-d₄) δ ppm 1.16 - 1.49 (m, 21 H) 1.50 - 1.69 (m, 6 H) 2.27 (t, J=7.52 Hz, 2 H) 3.42 - 3.71 (m, 3 H)



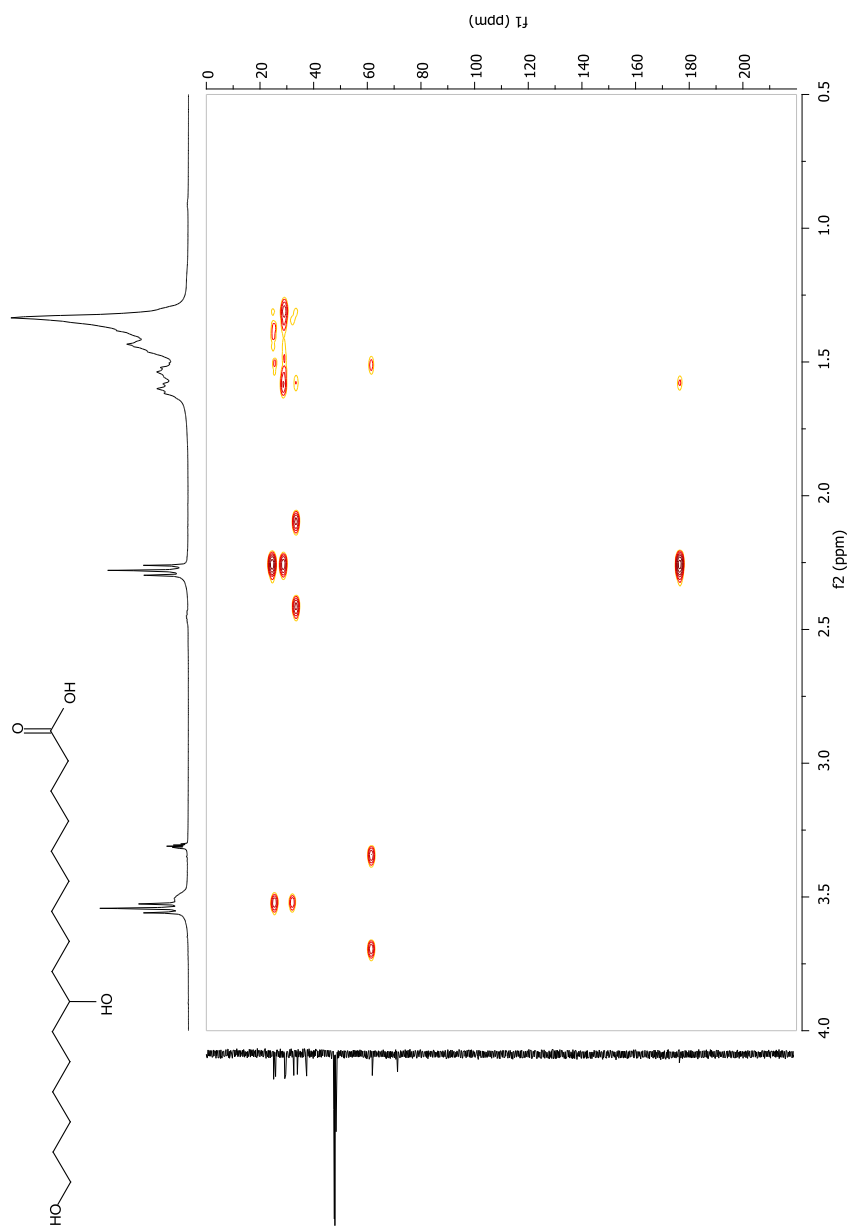
Espectro 21. Espectro de ¹H NMR del monómero 2. Análisis del FID con el programa ACD-Predictor para confirmar la estructura.



Espectro 22. Espectro de ^1H NMR del monómero 2.

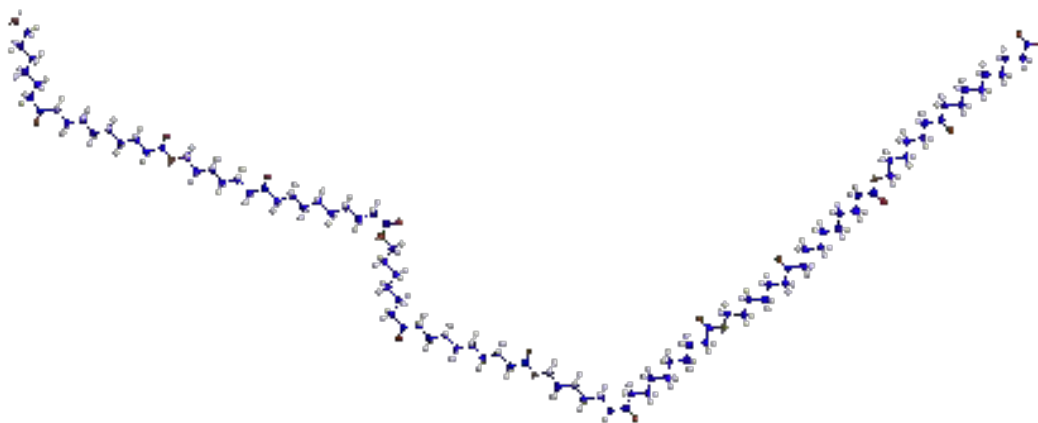


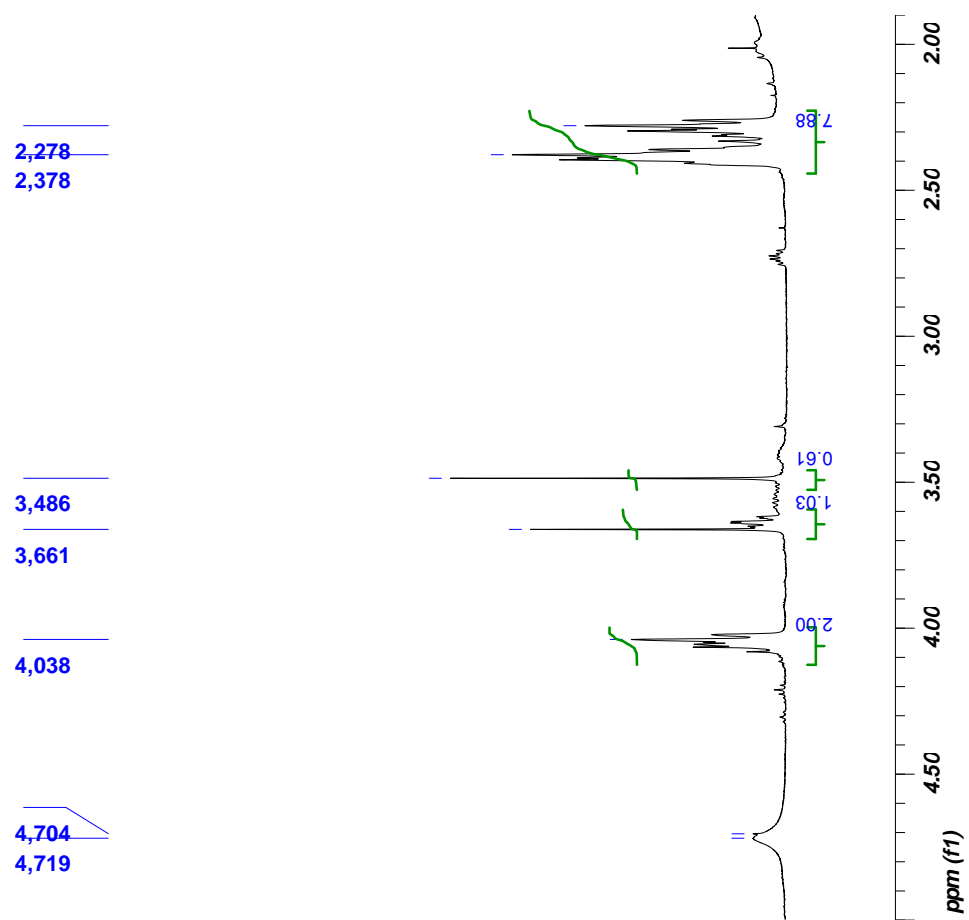
Espectro 23. Espectro de ^{13}C NMR-CPMAS del monómero 2.



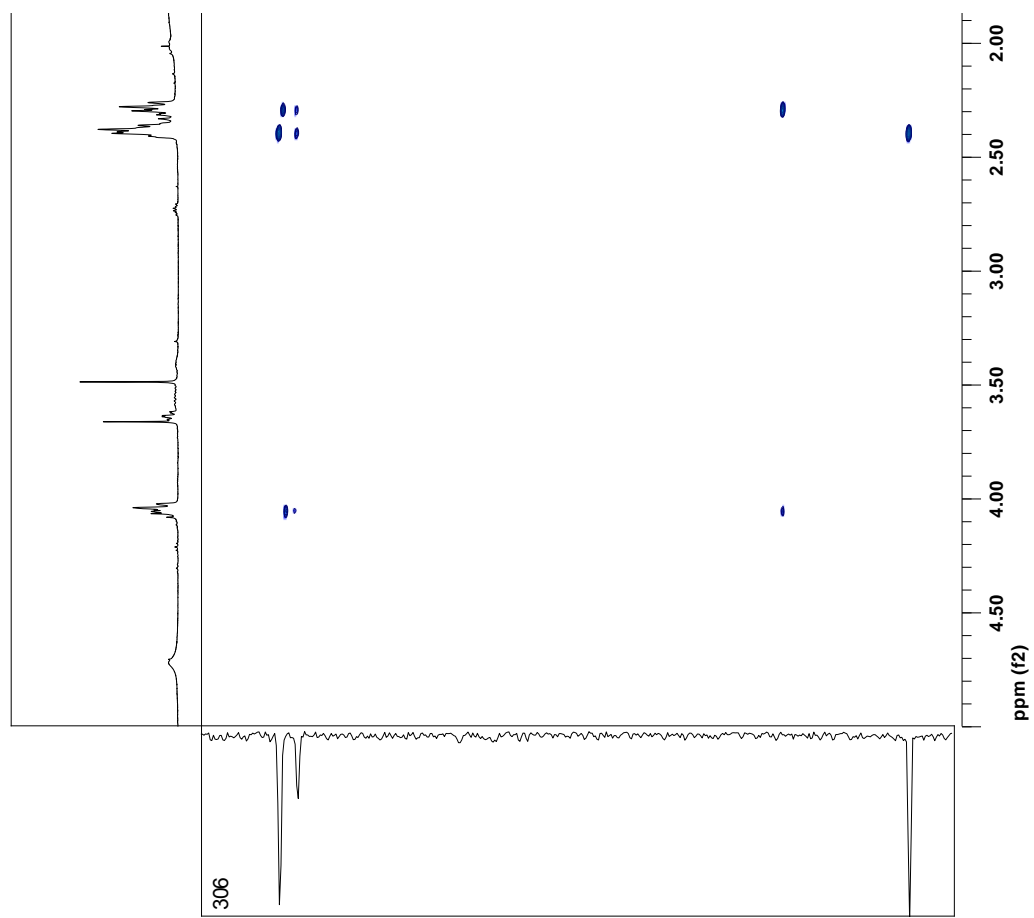
Espectro 24. Espectro de HMBC del monómero 2.

**POLÍMEROS AISLADOS DE LAS REACCIONES DEL MONOMERO 1 (ACIDO
16-HIDROXI-10-OXO-HEXADECANOICO) CON LAS LIPASAS**

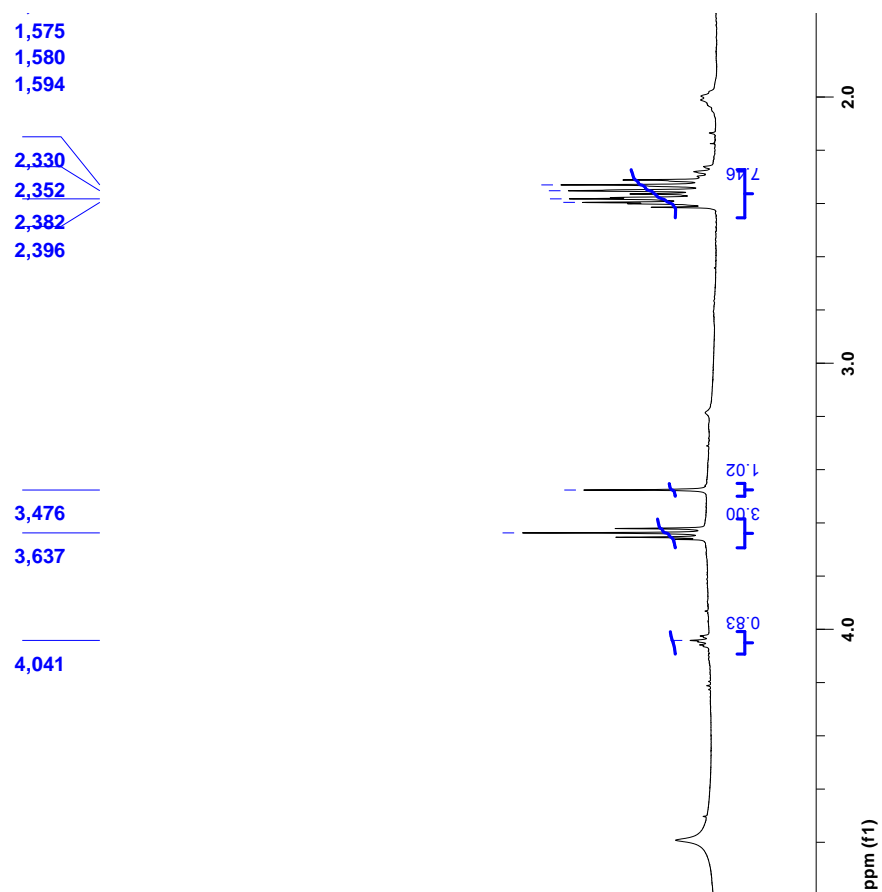




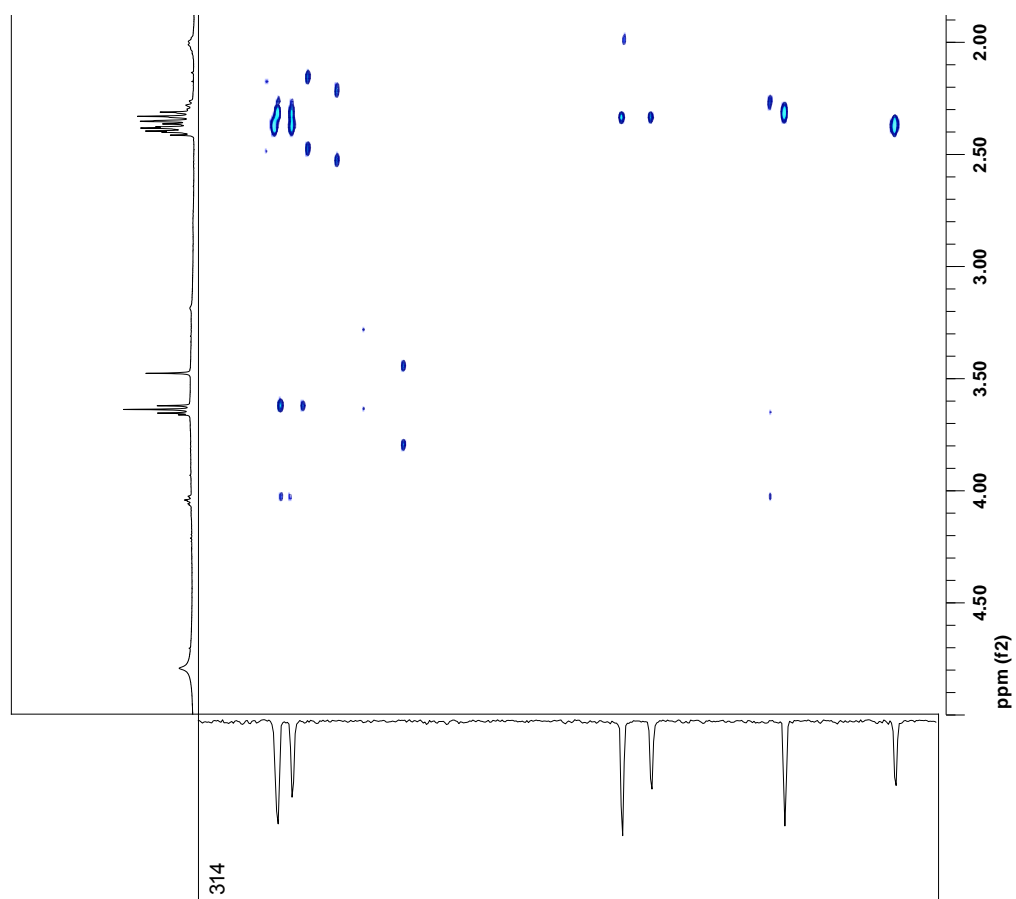
Espectro 25. Espectro de ^1H NMR del producto de la reacción de polimerización del monómero 1 con CAL.



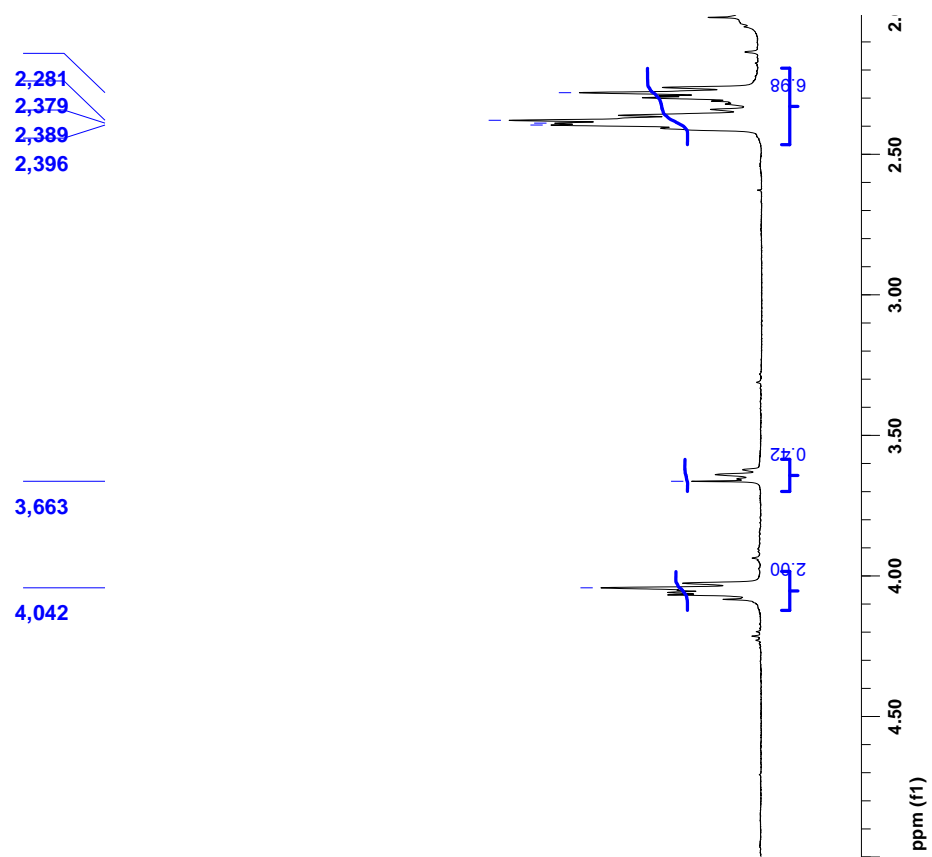
Espectro 26. Espectro de HMBC del producto de la reacción de polimerización del monómero 1 con CAL.



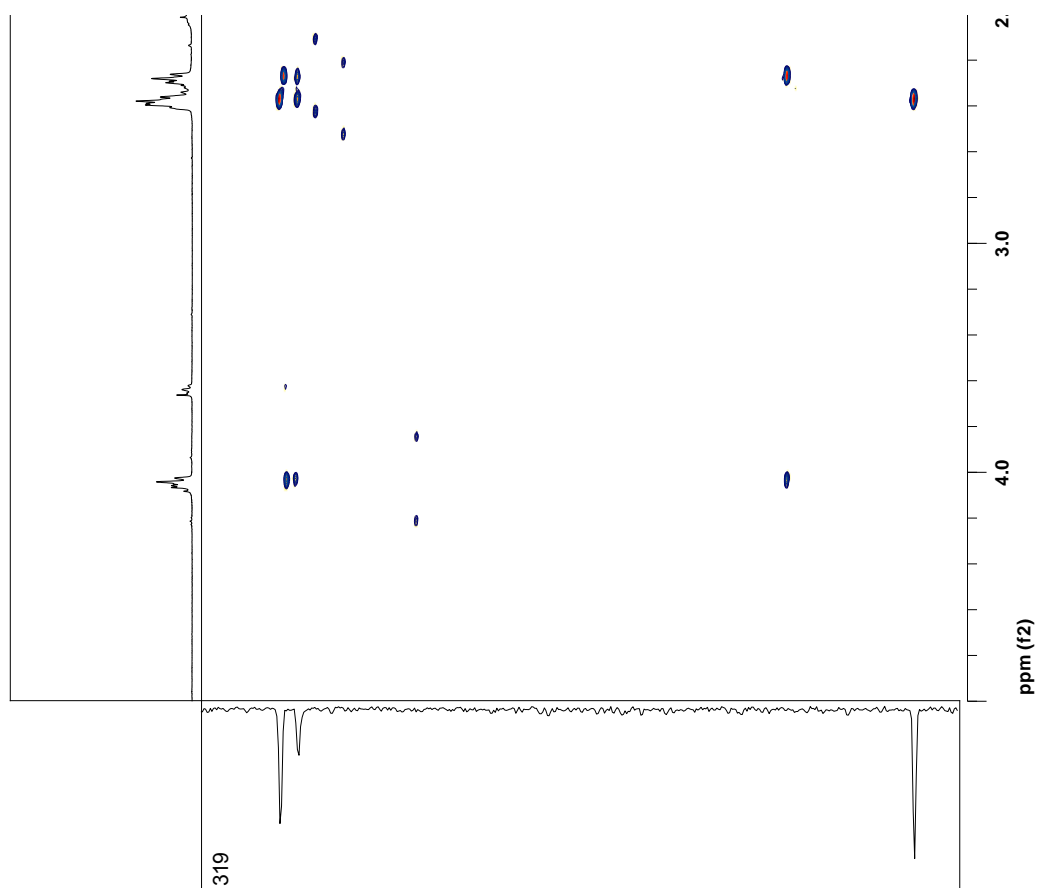
Espectro 27. Espectro de ^1H RMN del producto de la reacción de polimerización del monómero 1 con LAP.



Espectro 28. Espectro de HMBC del producto de la reacción de polimerización del monómero 1 con LAP.



Espectro 29. Espectro de ^1H RMN del producto de la reacción de polimerización del monómero 1 con PCL.



Espectro 30. Espectro de HMBC del producto de la reacción de polimerización del monómero 1 con PCL.

REFERENCIAS

Agócs, A.; Nagy, V.; Szabó, Z.; Márk, L.; Ohmacht, R.; Deli, J. Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **2007**, *8*, 390-394.

Amelung, W.; Cheshire, M.V.; Guggenberger, G. Determination of neutral and acidic sugars in soil by capillary gas-liquid chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis. *Soil Biol. Biochem.* **1996**, *28*, 1631-1639.

Arrieta-Baez, D. y Stark, R.E. Using trifluoroacetic acid to augment studies of potato suberin molecular structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, *54*, 9636-9641.

Benavente-García, O.; Castillo, J.; Marin, F.R.; Ortuño, A.; Del Río, J.A. Uses and properties of Citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1997**, *45*, 4505-4515.

Benítez, J.J.; Matas, A.J.; Heredia, A. Molecular characterization of the plant biopolyester cutin by AFM and spectroscopic techniques. *Journal of Structural Biology*. **2004**, *147*, 179-184.

Bernards, M. A. Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany*. **2002**, *80*, 227-240.

Deshmukh, A.P.; Simpson A.J.; Hatcher, P.G. Evidence for cross-linking in tomato cutin using HR-MAS NMR spectroscopy. *Phytochemistry*. **2003**, *64*, 1163-1170.

Deshmukh, A.P.; Simpson A.J.; Hadad, C.M.; Hatcher, P.G. Insights into de structure of cutin and cutan from *Agave Americana* leaf cuticle using HRMAS NMR spectroscopy. *Organic Geochemistry*. **2005**, *36*, 1172-1085.

Fang X., Qiu F., Yan B., Wang H., Mort A.J., Stark R.E. NMR studies of molecular structure in fruit cuticle polyesters. *Phytochemistry*. **2001**, 57, 1035-1042.

Fischer, J.F. y Trama L.A. High performances chromatographic determinations of some coumarins and psoralens found in Citrus peel iols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1979**, 27, 1334-1337.

Franke, R.; Briesen, I.; Wojciechowski, T.; Faust, A.; Yephremov, A.; Nawrath, C.; Schreiber, L. Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues – A typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry*. **2005**, 66, 2643-2658.

Gandini, A.; Pascoal, N.C.; Silvestre, A.J.D. Suberin: a promising renewable resource for novel macromolecular materials. *Progress in polymer science*. **2006**, 31, 878-892.

Giamperi, L.; Fraternali, D.; Bucchini, A.; Ricci, D. Antioxidant activity of *Citrus paradisi* seeds glyceric extract. *Fitoterapia*. **2004**, 75, 221–224.

Girenavar, B.; Jayaprakasha, G. K.; Jadegoud, Y.; Nagana Gowdab, G.A.; Patila, B.S. Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranylcoumarin from grapefruit. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2007**, 15, 3684–3691.

Graça, J. y Santos, S. Suberin: a biopolyester of plant's skin. *Macromolecular Bioscience*. **2007**, 7, 128-135.

Heredia A. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2003**, 1620, 1-7.

Ibrahim, A.R.S. Sulfation of naringenin by *Cunninghamella elegans*. *Phytochemistry*. **2000**, 53, 209-212.

Kolattukudy, P.E. Polyesters in higher plants. *Advances in Biochemical Engineering*. **2001**, 71, 1-44.

Lai, S.; Lai, A.; Stange Jr., R.R.; McCollum, T.G.; Schirra, M. Characterization of the wound-induced material in *Citrus paradisi* fruit peel by carbon-13 CP-MAS solid state NMR spectroscopy. *Phytochemistry*. **2003**, 63, 177-183.

Manthey, J.A. y Buslig, B.S. Distribution of furanocoumarins in grapefruit juice fractions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2005**, 53, 5158-5163.

Morrison I.M. y Stewart D. Plant wall fragments released on solubilisation in trifluoroacetic acid. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 1555-1563.

Nagy, S. y Norby, H.E. Long-chain hydrocarbon profiles of grapefruit juice sacs. *Phytochemistry*. **1972**, 11, 2789-2794.

Osman, S.F.; Gerard, H.C.; Fett, W.F.; Moreau R.A.; Dudley, R.L. Method for the production and characterization of tomato cutin oligomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1995**, 43, 2134-2137.

Osman, S.F.; Irwin, P.; Fett, W.F.; O'Connor, J.V.; Parris, N. Preparation, isolation and characterization of cutin monomers and oligomers from tomato peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **1999**, 47, 799-802.

Pacchiano, R.A.; Sohn W.; Chlanda, V.L.; Garbow, J.R.; Stark R.E. Isolation and spectral characterization of plant-cuticle polyesters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1993**, 41, 78-83.

Pacheco, A.; Luna, H.; Solís, A.; Pérez, H.I.; Manjarrez, N. Screening of liver acetone powders in the enantioselective hydrolysis of naproxen esters. *Journal of Mexican Chemical Society*. **2006**, 50, 137-142.

Perez, J.L.; Jayaprakasha, G.K.; Yoo, K.S.; Patil, B.S. Development of a method for the quantification of D-glucaric acid in different varieties of grapefruits by high-performance liquid chromatography and mass spectra. *Journal of Chromatography A*. **2008**, 1190, 394-397.

Peterson, J.J.; Beecher, G.R.; Bhagwat, S.A.; Dwyer, J.T.; Gebhardt, S.E.; Haytowitz, D.B.; Holden, J.M. Flavonones in grapefruit, lemons, and limes: a compilation and review of the data from analytical literature. *Journal of food composition and analysis*. **2006**, 19, S74-S80.

Ray, A.K; Lin, Y.Y.; Gerard, H.C., Chen, Z.; Osman, S.F.; Fett, W.F.; Moreau, R.A.; Stark, R.E. Separation and identification of lime cutin monomers by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Phytochemistry*. **1995**, 38, 1361-1369.

Varma, I.K.; Albertsson, A.C.; Rajkhowa, R.; Srivastava, R.K. Enzyme catalyzed synthesis of polyesters. *Progress in polymer science*. **2005**. 949-981.

Wilkins, M.R.; Widmer, W.W.; Grohmann, K.; Cameron R.G. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource Technology*. **2007**, 98, 1596–1601.

LITERATURA CONSULTADA.

Esau, K. The fruit. En *Anatomy of seed plants*. John Wiley & Sons. 2^a ed. Canadá, **1977**, pp. 429-453.

Fahn, A. The fruit. En *Plant Anatomy*. Pergamon Press. 3^a ed. Gran Bretaña, **1982**, pp. 457-477.

Gmitter, F.; Chen, C.; Rao, N.; Soneji, J. Citrus Fruits. En *Fruits and Nuts, Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Chittaranjan Kole (ed.). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2006**, pp. 265-279.

Knee, M. *Fruit quality and its biological basis*. Sheffield Academic Press. USA, **2002**, 279 pp.

Matínez-Villa, B. B. Propiedades bioplásticas de los monómeros de la cutícula del limón. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. S/P.

Peña, L.; Cervera, M.; Fagoaga, C.; Romero, J.; Juárez, J.; Pina, J.A.; Navarro, L. Citrus. En *Transgenic Crops V, Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Eng-Chong Pua y Michael R. Davey (eds.). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2007**, pp. 35-50.

Riederer, M. y Müller, C. (eds). *Biology of the plant cuticle*. Annual Plant Reviews. Blackwell. Reino Unido, **2006**, pp. 1-11.

Schery, R. Essential oils for perfumes, flavors, and industrial uses y Fruits. En *Plants for man*. Prentice-Hall. 2^a ed. USA, **1972**, pp. 261-291, 519-582.

Yurkanis, P. Espectrometría de masas, espectroscopia infrarroja y espectroscopia ultravioleta/visible y Espectroscopia de RMN. En *Química Orgánica*. Ed. Pearson. 5ª ed. México, **2008**, pp. 513-638.

PÁGINAS WEB CONSULTADAS.

Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria (COVECA). Monografía de la toronja. Consulta realizada en junio, 2009.

<http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/PAGE/COVECAINICIO/IMAGENES/ARCHIVOSPDF/ARCHIVOSDIFUSION/MONOGRAF%CDA%20DE%20TORONJA.PDF>

Dirección General de Sanidad Vegetal del SENASICA/SAGARPA. Exportación a Japón de toronja y naranja fresca de México. 2008. Consulta realizada en junio, 2009. www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2008/agosto/B158.htm

Figura 1. Cutícula en un corte transversal de hoja de muérdago (*Viscum album*) (400x). www.inea.uva.es/servicios/histologia/images/Imagenes2001. Consulta realizada en junio, 2009.

Figura 23. Diagrama de un espectrómetro de masas. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica de Telecomunicación (EUIT). Universidad Politécnica de Madrid.

<http://acer.forestales.upm.es/basicas/udfisica/asignaturas/fisica/default.htm>

Consulta realizada en enero, 2010.

Marca oficial "México calidad suprema". Pliego de condiciones para la toronja. CONCITVER. Consulta realizada en junio, 2009.

<http://www.concitver.com/Pliego%20de%20Toronja%20final.pdf>

USDA. National Nutrients Database for Standar Reference. Consulta realizada en agosto, 2009. http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl

Grupo de Síntesis Orgánica. Universidad Jaume I. Fundamentos de Química Orgánica. Tema 10. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear 1. Consulta realizada en septiembre, 2009.

<http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA10FQO.pdf>

<http://www.tropicos.org/Name/50119435>. Consulta realizada en enero, 2009.