



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCIÓN DE FLAVONOIDES DE INTERÉS
MÉDICO Y ECONÓMICO A PARTIR DE
CÁSCARAS DE NARANJA, TORONJA Y DE LAS
HOJAS DE TEPOZÁN”.**

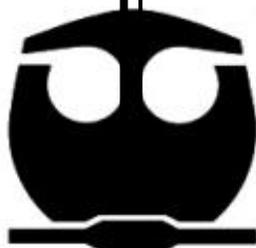
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

Daniel Carmona Fabian

México, D. F. 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
VOCAL:	Dr. Arturo Navarro Ocaña
SECRETARIO:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. Suplente:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2do. Suplente:	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E
Facultad de Química, UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Daniel Carmona Fabian

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE CUADROS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Compuestos polifenólicos	3
2.1.2 Flavonoides.....	3
2.2 Cítricos.....	4
2.2.1 Descripción botánica del árbol cítrico.....	4
2.2.2 Producción de cítricos en México.....	5
2.2.3 Generación de residuos.....	6
2.2.4 Aprovechamiento de los residuos.....	6
2.3 Naranja.....	7
2.3.1 Morfología.....	7
2.3.2 Aprovechamiento.....	7
2.3.3 Dos informes previos sobre la obtención e identificación de hesperidina en cáscaras de naranja.....	8
2.3.4 Hesperidina.....	8
2.3.5 Definición.....	8
2.3.6 Efecto de la hesperidina sobre la remineralización y desmineralización de la dentina en modelos animales.....	9
2.3.7 Determinación del contenido de hesperidina en cáscaras de frutos cítricos.....	9
2.3.8 Propiedades insecticidas de extractos de cáscaras de naranja.....	10
2.4 Toronja.....	10
2.4.1 Origen.....	10
2.4.2 Dos informes previos sobre la obtención e identificación de naringina en cáscaras y pulpa de toronja.....	11
2.4.3 Naringina.....	11
2.4.4 Definición.....	11
2.4.5 Actividad antiulcerogénica de la naringina en modelos animales.....	12
2.4.6 Determinación del contenido de naringina en cáscaras de frutos cítricos.....	12

2.4.7 Naringina como compuesto activo en una forma farmacéutica inhalable.....	13
2.5 <i>Buddleia cordata</i> o “tepozán”.....	13
2.5.1 Características botánicas.....	13
2.5.2 Distribución geográfica.....	14
2.5.3 Fitoquímica.....	14
2.5.4 Dos informes previos sobre la obtención e identificación de linarina en hojas de tepozán.....	14
2.5.5 Linarina.....	15
2.5.6 Definición.....	15
2.5.7 Propiedades fotoprotectoras de los extractos metanólicos de <i>Buddleia Cordata</i>	16
2.5.8 Actividad sedante de la linarina en modelos animales.....	16
2.5.9 Propiedades amebicidas de la linarina.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	19
5.1 Material vegetal.....	19
5.2 Procedimientos generales.....	19
5.2.1 Análisis por cromatografía en capa fina.....	19
5.2.2 Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).....	19
5.2.3 Extracción, separación y purificación de la hesperidina y naringina a partir de las cáscaras de naranja y toronja.....	20
5.2.4 Extracción, separación y purificación de la linarina a partir de hojas del tepozán.....	20
5.2.5 Desarrollo del perfil analítico.....	21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
6.1 Identificación de la hesperidina.....	22
6.2 Identificación de la naringina.....	23
6.3 Identificación de la linarina.....	23
7. CONCLUSIONES.....	25
8. PERSPECTIVAS.....	26
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estructura química de la naringina.....	9
2. Estructura química de la hesperidina.....	12
3. Estructura química de la linarina.....	16
4. Cromatograma utilizado en la identificación de la hesperidina.....	23
5. Cromatograma utilizado en la identificación de la naringina.....	24
6. Placa cromatográfica utilizada en la identificación de la linarina.....	25

ÍNDICE DE CUADROS

1. Avance de siembras y cosechas.....	5
2. Tiempos de retención y factor de retención de los flavonoides comerciales y de compuestos obtenidos experimentalmente.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS

H₂O	Agua
°C	Centígrados
CCF	Cromatografía en capa fina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
cv	Cultivariedades
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUA	Estados Unidos de América
R_f	Factor de retención
g	gramo
ha	hectárea
hr	hora
KHz	Kilohertz
MeOH	metanol
m	metro
μL	microlitro
μm	micrómetro
μM	micromolar
mg	miligramo
mL	mililitro
mm	milímetro
min	minuto
nm	nanómetro
rpm	Revoluciones por minuto
T_r	Tiempo de retención
Ton	Tonelada
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria
UV	Ultravioleta
v/v	volumen a volumen
W	Watt

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas contienen una variedad de compuestos polifenólicos los cuales desempeñan funciones importantes, como disuadir a los herbívoros o proteger contra el daño inducido por la radiación UV (Kampkötter *et al.*, 2007). Entre estos compuestos, están los flavonoides.

Los flavonoides son el grupo más importante de compuestos fenólicos. Se han descrito más de 8000 flavonoides naturales (Andersen & Jordheim, 2006) y continúan identificándose más compuestos pertenecientes a este grupo. Se encuentran ampliamente distribuidos en frutas, vegetales, semillas, nueces, tallos y flores, así como productos derivados de éstos, como té, vino, zumos o cerveza, los cuales son importantes constituyentes de la dieta humana (Wollenweber, 1993).

Es tan promisoría la obtención de compuestos con alto valor a partir de residuos de cítricos, que en el Estado de la Florida (EUA), una región productora de cítricos, ha surgido el Laboratorio de Investigación en Cítricos y Productos subtropicales (Citrus and Subtropical Products Research Laboratory, por su nombre en inglés) precisamente con el interés de recuperar a partir de residuos de cítricos, productos importantes para uso en salud humana y en alimentos (Grohmann, Manthey & Cameron, 2000).

La naringina es el flavonoide mayoritario en la toronja, mientras la hesperidina lo es en la naranja (Kawaii, Tomono, Katase, Ogawa, Yano, 1999).

Los estudios fitoquímicos de las hojas, corteza y raíces de *Buddleia cordata*, han evidenciado sus propiedades bactericidas y amebicidas (Clarenc, 2012).

Si se tiene en cuenta que los residuos originados por la agroindustria pueden convertirse en materias primas y además conociendo que se encuentran desaprovechados. Entonces es posible considerar como una alternativa, para solucionar esta problemática, la utilización de metodologías extractivas en el

aprovechamiento de materiales de desecho para obtener productos con valor agregado.

2. ANTECEDENTES

2.1 Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes en la dieta (Manach & Donovan, 2004). Los flavonoides (del latín *flavus*, "amarillo") constituyen el grupo más importante de polifenoles presentes en la dieta (Rice-Evans, 1998).

2.2 Flavonoides

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel de Fisiología y Medicina Albert Szent-Györgyi, quien en 1930 aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C₂ (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C) (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras y Tuñón, 2002). El interés en estos compuestos decayó en la década de 1940 después de que se demostrara que no son esenciales para la salud humana. Sin embargo, mucho más tarde, en la década de 1990, ha tenido lugar una gran expansión en este campo, con la publicación de diversos estudios epidemiológicos que asociaban una menor incidencia del cáncer y las enfermedades cardiovasculares a una mayor ingesta de flavonoides (Hertog *et al.*, 1993).

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en frutas, vegetales, frutos secos, semillas, flores y distintas bebidas, y son por tanto constituyentes importantes de la dieta (Conde, 2009). El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Son numerosos los trabajos que muestran una correlación positiva entre la actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales en distintos alimentos y bebidas como el zumo de pomelo (Igual, García-Martínez, Camacho y Martínez-

Navarrete, 2010; Gorinstein *et al.*, 2004; Proteggente *et al.*, 2002), uvas (Jayaprakasha, Tamil & Sacaria, 2003), granadas (Singh, Chidambara & Jayaprakasha, 2002; Chidambara, Jayaprakasha & Singh, 2002), cítricos (Jayaprakasha & Patil, 2007), kiwis (Imeh & Khokhar, 2002), grosellas (Connor, Luby, Hancock, Berkheimer & Hanson, 2002) y aceitunas (Obied, Bedgood, Prenzler & Robards, 2007). En vegetales se encuentra un gran potencial de compuestos que presentan actividad antioxidante, y en concreto hay trabajos realizados sobre papas (Teow *et al.*, 2007), tomate (Toor, Lister & Savage, 2005), espinacas (Gil, Ferreres & Tomas-Barberan, 1999), brócoli (Kurilich, Jeffery, Juvik, Walling & Klein, 2002), ajo y cebolla (Nuutila, Puupponen-Pimiä, Aarni & Oksman-Caldentey, 2003). Además, algunos autores sugieren que la capacidad antioxidante está relacionada con el tipo de compuestos fenólicos presente en dichos alimentos o bebidas. Frutas con una alta capacidad antioxidante generalmente muestran un alto contenido en sustancias antioxidantes, especialmente compuestos fenólicos y específicamente flavonoides (Tavirini, D'Innocenti, Remorini, Massai & Guidi, 2008). Los flavonoides de las frutas cítricas parecen estar asociados con un menor riesgo de contraer algunas enfermedades crónicas, con un aumento de la supervivencia. (Codoñer-Franch *et al.*, 2010; Vita, 2005).

2.2 Cítricos

2.2.1 Descripción botánica del árbol cítrico

El árbol cítrico desarrolla un tronco erecto y definido. Su madera es fuerte, sus ramas son gruesas y la cáscara es suave. La mayoría de los cítricos tiene espinas. Las mandarinas son las menos espinosas; los limones, por el contrario, presentan una gran cantidad de espinas. En sentido general, las mandarinas, los grapefruits y las naranjas son menos espinosos, cuando provienen de injertos.

Los cítricos son plantas siempre verdes, puesto que no cambian todas sus hojas al mismo tiempo. Las hojas permanecen en el árbol hasta dos años antes de ser cambiadas. Son de color verde oscuro en el haz y verde claro en el envés.

Las raíces proporcionan al árbol de cítrico anclaje y soporte de la planta, a la vez que sirven como medio para obtener nutrientes y humedad del suelo. Los cítricos tienen una gran cantidad de raíces absorbentes, la mayoría de las cuales está bajo 70 cm de suelo (Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, 1992).

2.2.2 Producción de cítricos en México.

Para México, la citricultura es una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional (ASERCA, 2010). Del total de la superficie plantada de frutales en el país, los cítricos representan el 44 por ciento, generando una producción de 5.5 millones de toneladas anuales (SAGARPA, 2009). Los cinco estados de mayor importancia en producción de naranja y toronja se muestran en la siguiente relación entre estado superficie cosechada y producción.

Cuadro 1. Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por estado.

Naranja		
Estado	Producción obtenida (ton)	Superficie cosechada (ha)
Veracruz	1 790 500	151 118
Tamaulipas	480 840	25 257
San Luís Potosí	268 232	32 947
Nuevo León	180 781	16 141
Sonora	98 145	3 792
Toronja		
Veracruz	83 542	3 291
Tamaulipas	36 911	1 431
Nuevo León	20 017	1 596
Campeche	16 200	540
Michoacán	15 109	3 398

SIAP, 2014.

2.2.3. Generación de residuos

Cualquiera de los grupos integrantes del reino vegetal posee porciones que no son bien aprovechadas actualmente para los consumos humano o animal y, que pueden representar rendimientos entre el 25 y el 30 % de parte no comestible, por ejemplo las hortalizas (Cerezal, Larrauri y Piñera, 1995). Algunas de las frutas llegan a alcanzar rendimientos de tan solo el 50% o menos en pulpas o jugos; estos son los casos de los mangos (Larrauri y Cerezal, 1993), cítricos y piña (Saura y Larrauri, 1995).

El aprovechamiento integral de las frutas es un requerimiento y a la vez una demanda que deben cumplir los países de tal modo que todas aquellas fracciones del fruto, tales como: pieles, cáscaras, semillas, corazones y los extremos o coronas, no resulten agravantes para el medio ambiente y se puedan derivar a productos principales o secundarios (Cerezal y Duarte, 2005).

El aprovechamiento industrial de los cítricos se ha convertido en una actividad intensiva en donde participan empresas de toda la cadena productiva (cultivadores, procesadoras, centros de distribución y exportadores), produciendo jugos, pulpas, concentrados y frutas en fresco; pero a medida que la producción crece se aumenta también la generación de desechos sólidos y líquidos (Braddock, 1995).

2.2.4. Aprovechamiento de los residuos

Las dos porciones no comestibles de frutas en estado fresco son las semillas y las pieles o cáscaras y han sido bastante estudiadas con el propósito de extraer de ellas sustancias valiosas, de interés farmacéutico o alimentario, (Figuerola, Hurtado, Estévez, Chiffelle y Asenjo, 2005) principalmente azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, flavonoides, aceites esenciales, proteínas y minerales, que se encuentran en diferentes cantidades dependiendo del tejido u órgano de la fruta (albedo, flavedo, pulpa, semilla y jugo) (Winkel-Shirley, 2002).

2.3. Naranja

2.3.1 Morfología

Frutos de forma variada: redondo, achatada, esférico o alargado, de corteza delgada a semigruesa con 10–13 segmentos; número de semillas variable, en algunas variedades no existen (Villa, 1996).

2.3.2 Aprovechamiento

Se cultiva por sus frutos, de agradable sabor y sin semillas, que se consumen preferentemente en fresco, aunque también se comercializan en forma de zumo, mermeladas o jaleas. La corteza tiene aplicaciones industriales y puede destinarse a la fabricación de piensos (Monografía de la toronja).

2.3.3 Dos informes previos sobre la obtención e identificación de hesperidina en cáscaras de naranja

2.3.4.1 Un gramo de polvo de material vegetal seco (cáscaras de naranja) fue transferido a un recipiente. El recipiente con muestra se introdujo en baño ultrasónico. El material vegetal se extrajo utilizando metanol, etanol e isopropanol; frecuencias de 20 kHz, 60 kHz y 100 kHz; temperaturas de 30°C, 40°C y 50°C durante 20 minutos. Finalmente, los extractos filtrados a través de membrana de 0,45 µm fueron recolectados para su análisis utilizando una técnica por HPLC.

La identificación de la hesperidina quedó verificada, en este estudio, mediante la comparación del tiempo de retención y espectro UV con el tiempo de retención y espectro UV obtenido de muestra comercial (Ma *et al.*, 2007).

2.3.4.2 La cáscara de naranja dulce se secó en horno a 50 °C y fue molida hasta obtener un polvo fino. Una vez llevada a cabo la extracción del polvo de cáscara (100 g) con agua en ebullición (1000 mL); la agitación durante 40 min precedió a la filtración del extracto. Como paso siguiente el sólido se extrajo, nuevamente, en

las mismas condiciones, secándolo por congelación. El procedimiento terminó cuando el polvo deshidratado fue suspendido en agua para su análisis posterior.

La identificación de la hesperidina concluyó con la comparación de sus tiempos de retención, en HPLC, con los tiempos de retención, en HPLC, de patrones auténticos (Shih-Ying *et al.*, 2013).

2.3.4 Hesperidina

2.3.5 Definición

La hesperidina (Figura 1) es un bioflavonoide cítrico (Li *et al.*, 2014) el cual se encuentra en los limones y las naranjas dulces (Zanwar, Badole, Shende, Hegde & Bodhankar, 2014).

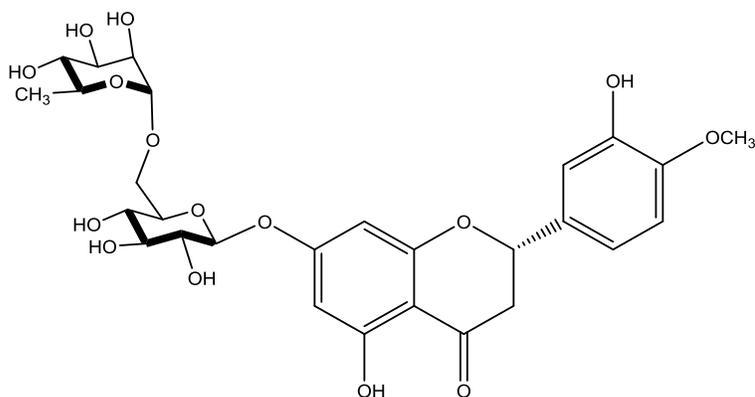


Figura 1. Estructura química de la hesperidina.

La hesperidina es altamente consumida en los países occidentales. Por ejemplo, en Finlandia, el consumo de hesperidina se estimó en 28,3 mg/día y contribuyó al 50% de la ingesta total de flavonoides. Estudios de biodisponibilidad de flavanonas en humanos demostraron que estas alcanzaron un pico entre 5 y 7 hr postingestión. En el estudio de Mañach y Donovan, se encontró que el consumo de 1 litro de jugo de naranja proporcionó ~ 450 mg de hesperidina (Horcajada *et al.*, 2008).

2.3.6 Efecto de la hesperidina sobre la remineralización y desmineralización de la dentina en modelos animales.

La caries dental es una enfermedad tan antigua que se han encontrado rastros de este padecimiento en cráneos pertenecientes a humano primitivo; aún cuando la dieta carecía de alimentos refinados y era baja en carbohidratos (Hardwick, 1999). Una de las terapias preventivas contra la caries dentinaria consiste en resistir la desmineralización y promover la remineralización de la dentina (Lynch & Baysan, 2001). Hiraishi *et al.*, en el año 2011 estudiaron el efecto de la hesperidina sobre la desmineralización de la dentina de bovino. A partir de los resultados del estudio, los investigadores concluyeron que la hesperidina impide la desmineralización además de potenciar la remineralización de la dentina de bovino.

2.3.7 Determinación del contenido de hesperidina en cáscaras de frutos cítricos

En la producción de jugo de naranja, la cáscara es la fracción principal de residuos. Dicho residuo se ha utilizado como una fuente de hesperidina debido a su alta concentración en este compuesto natural (Kanaze *et al.*, 2009). Por otro lado, existen investigaciones en las cuales se ha concluido que la hesperidina es un potente antioxidante (Bharathi & Jagadeesan, 2014). Wang, Chuang y Hsu, en el año 2008, determinaron el contenido total de hesperidina, reportado en peso seco, en cáscaras de ocho variedades de frutos cítricos [*Citrus reticulata* Blanco, *Citrus tankan* Hayata, *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*, *Citrus grandis* Osbeck, *Citrus grandis* Osbeck CV, *Citrus microcarpa*, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck y *Citrus limon* (L.)].

Los resultados les permitieron observar que la variedad Blanco posee el mayor contenido de hesperidina, y el menor contenido de hesperidina corresponde a la variedad Microcarpa.

2.3.8 Propiedades insecticidas de extractos de cáscaras naranja

Las plagas de insectos han sido controladas con insecticidas sintéticos durante más de 50 años. El manejo de este tipo de insecticidas resulta peligroso (Remia & Logaswamy, 2010). Debido a estos factores existe la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para control de insectos (Forouzan, Rezaei, Eivazi, & Hassanzadeh, 2013). La mosca doméstica, *Musca domestica* L., es uno de los insectos más comunes, íntimamente asociada con asentamientos humanos, alimentos y utensilios de cocina (Palacios, Bertoni, Rossi, Santander y Urzúa, 2009). Ezeonu, Chidume y Udedi, en el año 2001, demostraron que los extractos volátiles de las cáscara de naranja de las especies *Citrus sinensis* y *Citrus aurantifolia* ejercen actividad insecticida contra la mosca doméstica.

2.4 Toronja

2.4.1 Origen

No se conoce con exactitud el origen del fruto, aunque numerosas investigaciones señalan que se trata de un cruce natural entre el naranjo dulce y el pummelo (una especie diferente) producido en Barbados, en las Indias Occidentales. Desde allí, su cultivo se extendió por todo el Caribe, y posteriormente a los Estados Unidos, donde comienza su producción a gran escala (Monografía de la toronja).

La denominación de grapefruit es citada por varios investigadores debido, según algunos al parecido que tienen en su sabor a la uva (grape). Y según otros, por las formas de fructificación en racimos muy similares a los de la vid (grape) (Villa, 1996).

2.4.2 Dos informes previos sobre la obtención e identificación de naringina en cáscaras y pulpa de toronja

2.4.2.1 Después de agitar una mezcla, formada por 0,1 g de cáscara y 1 mL de metanol-DMSO (v/v; 50:50), durante 10 min a temperatura ambiente fue

centrifugada a 9000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sedimento se extrajo dos veces con 1 mL del mismo disolvente de extracción. Los sobrenadantes vertidos en el mismo matraz, se llevaron hasta 5 ml con metanol. Una vez filtrada la solución de muestra a través de membrana de 0.45 µm, su análisis por HPLC determinó la presencia de naringina en las cáscaras de toronja en estudio.

El análisis por HPLC finalizó con la comparación entre los tiempos de retención y los espectros de absorción de naringina obtenida experimentalmente con los tiempos de retención y los espectros de absorción de estándares comerciales auténticos (Wang *et al.*, 2008).

2.4.2.2 Una vez descascarada la fruta, se retiró la pulpa, de la cual se preparó una suspensión fina. Después de centrifugarla a 3000 rpm, el sedimento fue vertido en un matraz aforado de 25 mL. Las fracciones obtenidas a partir del precipitado, primeramente extraído con agua desionizada (3 x ~ 5 mL), y posteriormente con dimetil sulfóxido (DMSO), por triplicado, fueron analizadas utilizando una técnica por HPLC para la identificación de naringina contenida en la pulpa de toronjas.

La identificación se realizó con base en la comparación entre los tiempos de retención y espectros de absorción de naringina experimentalmente obtenida, contra los tiempos de retención y los espectros de absorción de informes anteriormente reportados (Gorinstein *et al.*, 2006).

2.4.3 Naringina

2.4.4 Definición

La naringina (Figura 2) es un flavonoide (Li *et al.*, 2014), el cual es el principio dominante amargo en el jugo de toronja (Ribeiro, Afonso, Vila-Real, Alfaia & Ferreira, 2010) lo que ha dado lugar a estudios sobre la posible neutralización de su sabor en dichos productos alimenticios.

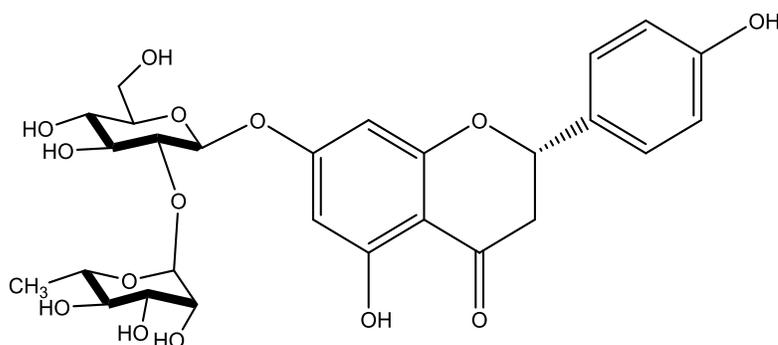


Figura 2. Estructura química de la naringina.

El amargo centro fibrovascular, de los cítricos, a pesar de representar una pequeña parte de la fruta entera, contiene la más alta concentración de naringina (Yusof, Ghazali & King, 1990).

2.4.5 Actividad antiulcerogénica de la naringina en modelos animales

Galati *et al.*, (1998) estudiaron los efectos de la administración intragástrica de naringina contra úlceras inducidas con ácido acetil salicílico en ratas. Con los resultados de la investigación comprobaron el efecto antiulcerogénico de la naringina, dado que la severidad de la lesión se redujo significativamente luego de la administración de éste compuesto de origen natural.

2.4.6 Determinación del contenido de naringina en cáscaras de frutos cítricos

Las frutas y las verduras han sido siempre ampliamente utilizadas en la nutrición. Después de la producción de jugos, mermeladas, etc, se generan importantes cantidades de residuos como cáscaras, semillas, pulpa (Karsheva, Kirova, Alexandrova & Georgieva, 2013). La toronja se cultiva principalmente para obtener el jugo. La naringina está contenida abundantemente en este fruto (Wu, Guan, & Ye, 2007). Por otro lado Wei, Yang, Li, Zhang y Sse (2007) sugirieron que la naringina ofrece ser un tratamiento eficaz contra la osteoporosis.

Wang *et al.*, (2008) determinaron el contenido total de naringina, reportado en peso seco, en ocho variedades de frutos cítricos [*Citrus reticulata* Blanco, *Citrus tankan* Hayata, *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*, *Citrus grandis* Osbeck, *Citrus grandis* Osbeck CV, *Citrus microcarpa*, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck y *Citrus limon* (L.)].

Los resultados les permitieron observar que la variedad Osbeck CV posee el mayor contenido de naringina, y el menor contenido de naringina, corresponde a la variedad Microcarpa.

2.4.7 Naringina como compuesto activo en una forma farmacéutica inhalable

En terapia de inhalación la administración del compuesto activo directamente en las vías respiratorias representa ventaja en términos de biodisponibilidad (Russo, Santoro, Prota, Stigliani & Aquino, 2012). El efecto antitusivo de la naringina fue informado por Luo *et al.*, en 2012. Sansone, Aquino, Del Gaudio, Colombo y Russo (2009) diseñaron un aerosol en el cual la naringina es el principio activo. Este aerosol puede ser utilizado por personas enfermas en vías respiratorias (Sansone *et al.*, 2009).

2.5 *Buddleia cordata* o “tepozán”

2.5.1. Características botánicas

Árbol o arbusto dioico de 2 a 15 m de alto, tronco de 10 a 45 cm de diámetro en la base, corteza rugosa de color café a negruzca; ramas cuadrangulares, sus hojas son de 10 a 15 cm de largo, pecioladas, de base ancha generalmente redondeada o subcordada, borde entero o aserrado, angostamente lanceoladas o aovadas en la punta, haz color verde claro y envés pubescente; flores pequeñas en grupos de 5 a 10 amarillas y aromáticas agrupadas en amplias panículas terminales, corola amarillenta, generalmente con un toque anaranjado en la garganta; su raíz profunda resulta un excelente anclaje al suelo (Vargas, 2005).

2.5.2 Distribución geográfica

Se distribuye ampliamente en México desde los estados del norte de Sinaloa, Chihuahua y Durango hasta los estados del sur de Oaxaca y Chiapas. Crece en un amplio rango de hábitats como bosques nubosos de abeto y pino-roble, valles de alta elevación, matorrales desérticos con cactus y mezquite o con juníperos. *Buddleia cordata* coloniza con facilidad lugares altamente perturbados y abiertos gracias a que sus semillas son fácilmente dispersadas por el viento, arribando a lugares tan heterogéneos como grietas, huecos entre las rocas, superficies planas, áreas de cultivo, entre otros muchos puntos (Mendoza, 2003).

2.5.3 Fitoquímica

Entre los componentes aislados de *Buddleia cordata*, parte de la defensa química de la planta contra los patógenos o su interacción con el medio ambiente se hallan los metabolitos secundarios del tipo fenilpropanoide aislados de partes aéreas principalmente como los ácidos hidroxicinámicos: p-cumárico, caféico, ferúlico y sináptico, un fenilpropanoide conjugado, conocido como verbascósido, o acteósido y el flavonoide linarina (Estrada, 2010).

2.5.4 Dos informes previos sobre la obtención e identificación de linarina en hojas de tepozán

2.5.4.1 El material vegetal (hojas de *Buddleia cordata*) se dejó secar durante dos semanas a temperatura ambiente. Después de molerlo, hasta obtener polvo fino, el paso siguiente consistió en la extracción, sucesiva, con hexano y metanol durante 24 hr a temperatura ambiente. Una vez filtrados, utilizando papel, cada extracto se concentró, por separado, a presión reducida. A partir del extracto metanólico concentrado precipitó un sólido el cual fue identificado como linarina; conclusión fundamentada en la comparación del punto de fusión y datos espectroscópicos con los de una muestra comercial auténtica. El extracto hexánico fue desechado (Rodríguez-Zaragoza *et al*, 1999).

2.5.4.2 Hojas de la planta *Buddleia cordata* fueron liofilizadas y extraídas (100 mg en peso seco) con MeOH (50 mL) en ebullición durante 1 hr. Posteriormente los extractos obtenidos fueron filtrados y concentrados (volumen final de 10 mL) a presión reducida. El extracto metanólico concentrado y el estándar fueron colocados en cromatoplasas con el propósito de realizar el análisis utilizando la técnica CCF. El valor del factor de retención estimado para el estándar fue empleado para identificar al compuesto linarina en las muestras analizadas (Estrada, 2010).

2.5.5 Linarina

2.5.6 Definición

La linarina (Figura 3) es un flavonoide natural que se encuentra comúnmente en algunas plantas herbáceas como *Flos chrysanthemi indicis*, *Buddleja officinalis*, *Cirsium setosum*, *Mentha arvensis* y *Buddleja davidii* (Feng, Liu, Wang & Di, 2014).

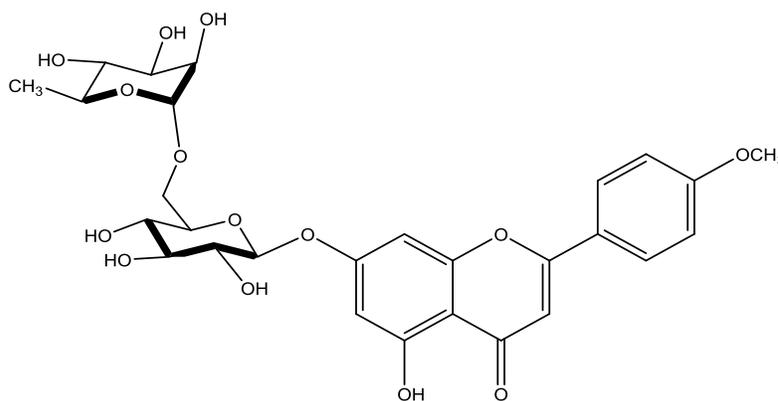


Figura 3. Estructura química de la linarina

2.5.7 Propiedades fotoprotectoras de los extractos metanólicos de *Buddleia cordata*

La piel está expuesta directamente al medio ambiente y es por lo tanto, muy vulnerables a los rayos ultravioleta (UV) del sol (Bae, Ko, Kim, Pyo & Lee, 2012) y la exposición crónica conlleva un riesgo de contraer cáncer en la piel. En 2014, Avila., *et al* describieron que la administración tópica de Extractos Metanólicos de *Buddleia Cordata* (EMBC), protege contra daños inducidos por radiación UV en la piel, *in vivo*, de ratones lampiños. Los presentes hallazgos demuestran que los EMBC poseen propiedades fotoprotectoras y que ésta característica se debe probablemente al contenido de verbascósido y linarina.

2.5.8 Actividad sedante de la linarina en modelos animales

Valeriana officinalis crece como hierba silvestre en muy diversos hábitats en todo el mundo (Yeo *et al.*, 2013). El uso de extractos de raíces de valeriana para producir sedación y aliviar los problemas de sueño se remonta al Siglo XVIII (Fernández, Wasowski, Paladini, & Marder). Kim *et al*, en el año 2013, obtuvieron linarina a partir de *Chrysanthemum indicum* L. En 2004, Fernández *et al.*, presentaron su trabajo, el cual es el primero en informar la identificación de linarina en *Valeriana officinalis*, así como del hallazgo, en la linarina, de propiedades sedantes e inductoras del sueño en ratones.

2.5.9 Propiedades amebicidas de la linarina

Las enfermedades infecciosas producidas por amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* han sido reconocidas recientemente. Se llevó a cabo un análisis utilizando el extracto acuoso y metanólico de una planta (*Buddleia cordata*), utilizada en medicina popular mexicana, sobre 29 cepas de amibas de vida libre y con el resultado obtenido fue posible concluir que la linarina presenta actividad amebicida contra la totalidad de las cepas analizadas (Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 1999).

3. JUSTIFICACIÓN

En el mundo, la preocupación acerca del aprovechamiento de residuos ha tomado gran fuerza entre la comunidad científica y sobre todo en la industria, en donde los procesos de transformación generan desechos y subproductos que pueden ser útiles en otras actividades; sin embargo, los residuos generados en las transformaciones agroindustriales no han sido aprovechados eficientemente; de tal manera que estudios recientes han centrado su atención en la necesidad de identificar y recuperar sustancias de interés farmacéutico o alimentario presentes en residuos de manzana, cítricos, caña de azúcar entre otros (Winkel-Shirley, 2002).

De la producción nacional, de frutales, se destina un 15% a la industria, generando aproximadamente 189,750 toneladas de cáscara como subproductos en la industria (SAGARPA, 2009).

Debido a su alto contenido en flavonoides, las cáscaras de cítricos pueden ser explotados por las industrias farmacéutica y alimentaria (Ma *et al.*, 2008). Por otro lado, las diversas actividades farmacológicas de la linarina sugieren que puede ser un fármaco con amplias posibilidades de ser utilizada en el tratamiento de diversas enfermedades (Feng *et al.*, 2014). Respecto de lo descrito anteriormente, en este trabajo experimental se considera importante la utilización de cáscaras de frutos cítricos y forraje de “tepozán” como fuente para la obtención e identificación de compuestos de naturaleza flavonoide, los cuales pueden ser utilizados en diversas ramas de la actividad humana.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

Preparar los extractos metanólicos de las cáscaras de la naranja y la toronja y de las hojas del árbol tepozán.

Purificar por métodos cromatográficos la hesperidina a partir de las cáscaras de la naranja, la naringina a partir de las cáscaras de la toronja y la linarina a partir de las hojas del tepozán.

Identificar los compuestos obtenidos utilizando una técnica por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Material vegetal

Los frutos enteros (naranja y toronja), adquiridos en un mercado local del Estado de México, fueron lavados con agua corriente, se retiraron las cáscaras y se fragmentaron en trozos pequeños.

En Aculco, Estado de México, se realizó la recolección manual del material vegetal del tepozán. Manojos de ramas con hojas se cortaron utilizando un machete pequeño y filoso, y posteriormente las hojas fueron separadas de las ramas.

5.2 Procedimientos generales

5.2.1 Análisis por cromatografía en capa fina

Los análisis de cromatografía en capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas de gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5-7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con vainillina sulfúrica al 1% seguido de calentamiento (aproximadamente 110 °C) hasta la visualización completa de los compuestos.

5.2.2 Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/LCsolution.

Para obtener el tiempo de retención de los estándares se utilizó una columna Purospher STAR RP-18 de 150 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 μm .

5.2.3 Extracción, separación y purificación de la hesperidina y naringina a partir de las cáscaras de naranja y toronja

Los materiales vegetales fueron cortados en trozos pequeños y desecados en una estufa durante 48 horas. El material vegetal seco se maceró independientemente con metanol durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se montaron equipos de extracción continua y los materiales vegetales se extrajeron por 5 horas a reflujo. Las cáscaras se separaron por filtración e inmediatamente los extractos metanólicos se concentraron al vacío utilizando un rotavapor. Los residuos obtenidos con una consistencia viscosa se enfriaron y se mantuvieron en refrigeración por 14 días. Como resultado del proceso se obtuvieron precipitados, los cuales se separaron por filtración en embudos Büchner. Los productos obtenidos se dejaron secar por una hora y se guardaron en recipientes limpios y secos.

5.2.4 Extracción, separación y purificación de la linarina a partir de hojas del tepozán

El material vegetal se secó a temperatura ambiente y se cortó en trozos pequeños, seguido de la maceración de las hojas con hexano durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se montó un reflujo con metanol por 5 hr, se filtró y se concentró el extracto obtenido en un rotavapor hasta obtener un extracto parcialmente seco con consistencia de jarabe. Como paso siguiente se filtró con ayuda de un embudo Büchner y el producto resultante se dejó secar por una hora y se guardó en recipiente limpio y seco.

5.2.5 Desarrollo del perfil analítico

Para el desarrollo del método analítico se probaron diferentes sistemas de elución y flujo hasta encontrar las mejores condiciones cromatográficas para cada glicósido flavonoide siguiendo una metodología descrita por Liu *et al.*, en 2009.

La elución se realizó con sistema isocrático que consistió en una mezcla binaria constituida por MeOH:H₂O con ácido trifluoroacético al 1% en una proporción 20:80. El volumen de inyección fue de 20 μ L; flujo 1mL/min; temperatura 25 °C y la longitud de onda empleada para la detección de los glicósidos de flavonoide fue a 340 nm.

Se preparó para cada glicósido flavonoide una dilución cuya concentración final fue 50 μ M, partiendo de una solución stock con concentración 10 mg/10mL de metanol. Cada muestra se inyectó en un equipo HPLC.

Cuadro 2. Tiempos de retención de los glicósidos flavonoides comerciales y de muestras obtenidas experimentalmente.

Glicósido comercial	T _r (min)	T _r (min) Compuesto obtenido
Hesperidina	7.19	7.24
Naringina	5.36	7.42
Linarina	R _f	R _f Compuesto obtenido
	0.5	0.5

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la selección de los materiales vegetales se realizó una investigación bibliográfica y se determinó que eran las mejores fuentes para el aislamiento de la hesperidina (Inoue, 2010), naringina (Giannuzzo, 2000) y linarina (Estrada, 2010).

Los flavonoides hesperidina y naringina se obtuvieron a partir de los extractos metanólicos preparados a partir de las cáscaras de naranja y toronja respectivamente. La linarina se obtuvo a partir del extracto metanólico de las hojas del árbol tepozán. La caracterización de sus estructuras químicas se realizó por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas reportadas en la literatura para la naringina y la hesperidina (Ikan, 1991) y para la linarina (Zhang *et al.*, 2006). Por otra parte, se compararon los t_R y R_f de los compuestos con estándares comerciales que se poseen en el laboratorio.

Por otra parte, se compararon los t_R y R_f de los compuestos con estándares comerciales que se poseen en el laboratorio.

6.1 Identificación de la hesperidina

La identificación de la hesperidina se realizó utilizando las condiciones previamente descritas en la sección experimental 5.2.5, y se obtuvieron los cromatogramas que se ilustran en la Figura 4a (hesperidina, referencia comercial) y 4b (muestra obtenida).



Figura 4. Cromatogramas demostrativos en el análisis realizado para la identificación de la hesperidina.

Al comparar los cromatogramas obtenidos para la hesperidina comercial y la hesperidina obtenida, se observó que no existen diferencias, lo cual indica que se trata del mismo compuesto.

6.2 Identificación de la naringina

La identificación de la naringina se realizó siguiendo una estrategia similar a la descrita para la hesperidina. Se obtuvieron los cromatogramas mostrados en la Figura 5a (naringina, referencia comercial) y 5b (muestra obtenida).



Figura 5. Cromatogramas demostrativos en el análisis realizado para la identificación de la naringina.

Al comparar los cromatogramas ilustrados en las Figuras 5a y 5b, se observó que no hay diferencias y que no existe variación en el tiempo de retención, lo cual indica que se trata de un mismo compuesto.

Identificación de la linarina

En el caso específico de la linarina, se consideró el resultado obtenido en los experimentos con hesperidina y naringina y con el propósito de no invertir más tiempo y recursos en esta etapa del análisis se decidió utilizar como alternativa la cromatografía en capa fina.

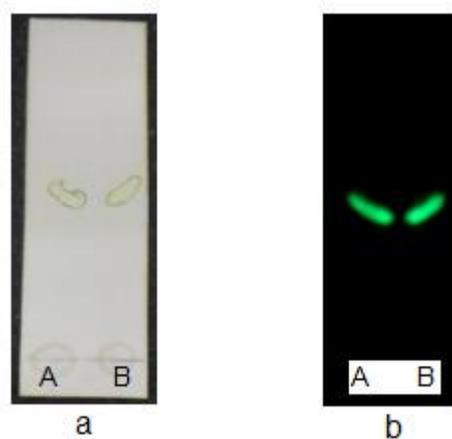


Figura 6. Placa cromatográfica sin revelar, a y b placa cromatográfica visualizada a una longitud de onda de 365 nm.

En la Figura 6 se observa que los factores de retención (R_f) de la muestra patrón A y la muestra obtenida B fueron iguales, hecho que confirma tratarse de un mismo compuesto.

7. CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos preparados a partir de las cáscaras de naranja y toronja permitieron el aislamiento de la naringina y hesperidina, respectivamente. Por otra parte, a partir del extracto metanólico de las hojas del tepozán se aisló la linarina.

Se logró la identificación de hesperidina y naringina utilizando una metodología basada en la técnica de espectroscopía líquida de alta resolución (HPLC).

La identificación de la linarina quedó establecida por la técnica de cromatografía en capa fina.

8. PERSPECTIVAS

Completar los estudios toxicológicos del extracto metanólico de las hojas de *Buddleia cordata* con la finalidad de su posible uso como medicamento de origen natural.

Continuar con el estudio sobre la obtención e identificación de flavonoides en otras especies de frutas cítricas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen, Ø.M. & Jordheim, M. (2006). The anthocyanins. En: Andersen, Ø.M., Markham, K.R. (Eds.), *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications* (1a. ed., pp.471). Florida, EE.UU. CRC Press/Taylor and Francis.

ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria) (2010). Naranja dulce, limón partido. *Claridades Agropecuarias*, 197, 32-33.

Ávila, A.J.G., Espinosa, A.M.G., Matamoros De Maria, C.D., Benitez, F.J. del C., Hernández, D.T., Maya, F.S., Contreras, C.J., López, M.J.L. & Garcia, B.A.M. (2014). Photoprotection of *Buddleja cordata* extract against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(281), 1-9.

Bae, J.T., Ko, H.J., Kim, G.B., Pyo, H.B. & Lee, G.S. (2012). Protective effects of fermented citrus unshiu peel extract against ultraviolet-A-induced photoageing in human dermal fibroblasts. *Phytotherapy Research*, 26(13), 1851-1856.

Bharathi, E. & Jagadeesan, G. (2014). Antioxidant potential of hesperidin and ellagic acid on renal toxicity induced by mercuric chloride in rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(2), 131-136.

Braddock, R.J. (1995). By-products of citrus fruit. *Food Technology*. 49(9), 74-77.

Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal (1992). *Cultivo de Citricos*. Santo Domingo, República Dominicana. Fundación de Desarrollo Económico.

Cerezal, P. y Duarte, G. (2005). Algunas características de tunas (*Opuntia ficus-índica* (L.) Miller) cosechadas en el altiplano andino de la 2da Región de Chile.

Journal of the Professional Association for Cactus Development, 7, 34-60.

Cerezal, P., Larrauri, J.A. y Piñera, R.M. (1995). Influencia de factores en el aprovechamiento de subproductos de la industria de frutas y vegetales en Cuba. *Alimentaria*, 33(268), 101–106.

Chidambara, M.K.N., Jayaprakasha, G.K. & Singh, R.P. (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vivo models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4791-4795.

Clarenc, R.A. (2012). Evaluación del contenido del verbascósido, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en plantas de *Buddleia cordata* propagadas *in vitro*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, Distrito Federal, México.

Codoñer-Franch, P., López-Jaén, A.B., De La Mano-Hernández, A., Sentandreu, E., Simó-Jordá, R. & Valls-Bellés, V. (2010). Oxidative markers in children with severe obesity following low-calorie diets supplemented with mandarin juice. *Acta Paediatrica*, 99(12), 1841-1846.

Conde, P.E. (2009). Revalorización de residuos agroindustriales y forestales para la obtención de antioxidantes naturales con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. Disertación Doctoral. Universidade de Vigo, Ourense, España.

Connor, A.M., Luby, J.J., Hancock, J.F., Berkheimer, S. & Hanson, E.J. (2002). Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 893-898.

Estrada, M.A. (2010). *Producción de fenilpropanoides en cultivos celulares y rizogénicos de Buddleia cordata, planta empleada en la medicina tradicional mexicana*. Disertación Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana, Distrito Federal, México.

Ezeonu, F.C., Chidume, G.I. & Udedi, S.C. (2001). Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. *Bioresource Technology*, 76(3), 272-274.

Feng, X., Liu, Y., Wang, X. & Di, X. (2014). Effects of piperine on the intestinal permeability and pharmacokinetics of linarin in rats. *Molecules*, 19, 5624-5633.

Fernández, S., Wasowski, C., Paladini, A.C. & Marder, M. (2004). Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 77(2), 399-404.

Figuerola, F., Hurtado, M.L., Estévez, A.M., Chiffelle, I. & Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, 91(3), 395-401.

Forouzan, M., Rezaei, M., Eivazi, A. & Hassanzadeh, M. (2013). Fumigant toxicity of essential oils from *citrus reticulata* blanco fruit peels against *Rhyzopertha dominica* F. (Col. Bostrichidae). *Scientia Agriculturae*, 1(3), 67-69.

Galati, E.M., Monforte, M.T., d' Aquino, A., Miceli, N., Di Mauro, D. & Sanogo, R. (1998). Effects of naringin on experimental ulcer in rats. *Phytomedicine*, 5(5), 361-366.

Giannuzzo, A. (2000). Extracción de naringina de *citrus paradisi*. Estudio comparativo y optimización de técnicas extractivas. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 20(2), 257-261.

Gil, M.I., Ferreres, F. & Tomas-Barberan, F.A. (1999). Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (Flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2213-2217.

Gorinstein, S., Huang, D., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Yamamoto, K., Soliva-Fortuny, R., Belloso, O.M., Martinez, A.L. & Trakhtenberg, S. (2006). Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography. The antioxidant potential of citrus fruit. *Acta Chromatographica*, 17, 108-124.

Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Krzeminski, R., Gralak, M., Martin-Belloso, O., Delgado-Licon, E., Haruenkit, R., Katrich, E., Park, Y.S. & Jung, S.T. (2004). Fresh israeli jaffa blond (Shamouti) orange and israeli jaffa red star ruby (Sunrise) grapefruit juices affect plasma lipid metabolism and antioxidant capacity in rats fed added cholesterol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4853-4859.

Grohmann, K., Manthey, J.A. & Cameron, R.G. (2000). Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures. *Carbohydrate Research*, 328(2), 141-146.

Hardwick, J.L. (1999). The incidence and distribution of caries throughout the ages in relation to the Englishmen's diet. *British Dental Journal*, 108(1), 9-17.

Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B. & Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342(8878), 1007-1011.

Hiraishi, N., Sono, R., Islam, M.S., Otsuki, M., Tagami, J. & Takatsuka, T. (2011). Effect of hesperidin in vitro on root dentine collagen and demineralization. *Journal of Dentistry*, 39(5), 391-396.

Horcajada, M.N., Habauzit, V., Trzeciakiewicz, A., Morand, C., Gil-Izquierdo, A., Mardon, J., Lebecque, P., Davicco, M.J., Chee, W.S.S., Coxam, V. & Offord, E. (2008). Hesperidin inhibits ovariectomized-induced osteopenia and shows differential effects on bone mass and strength in young and adult intact rats. *Journal of Applied Physiology*, 104(3), 648-654.

Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M.M. y Martínez-Navarrete, N. (2010). Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 118(2), 291-299.

Ikan, R. (1991). *Natural products: a laboratory guide*. (2a. ed.). California, EE.UU. Academic Press Inc.

Imeh, U. & Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6301-6306.

Inoue, T., Tsubaki, S., Ogawa, K., Onishi, K. & Azuma, J. (2010). Isolation of hesperidin from peels of thinned *Citrus unshiu* fruits by microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, 123(2), 542-547.

Jayaprakasha, G.K. & Patil, B.S. (2007). In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry*, 101(1), 410-418.

Jayaprakasha, G.K., Tamil, S.A. & Sacaria, K.K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36(2), 117-122.

Kampkötter, A., Nkwonkam, C.G., Zurawski, R.F., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W. & Kahl, R. (2007). Investigations of protective effects of the flavonoids

quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology*, 234(1), 113-123.

Kanaze, F.I., Termentzi, A., Gabrieli, C., Niopas, I., Georgarakis, M. & Kokkalou, E. (2009). The phytochemical analysis and antioxidant activity assessment of orange peel (*Citrus sinensis*) cultivated in Greece–Crete indicates a new commercial source of hesperidin. *Biomedical Chromatography*, 23(3), 239-249.

Karsheva, M., Kirova, E., Alexandrova, S. & Georgieva, S. (2013). Comparison of citrus peels as a source of valuable components-polyphenols and antioxidants. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 48(5), 475-478.

Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K. & Yano, M. (1999). HL-60 Differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from citrus juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 128-135.

Kim, S.J., Cho, H.I., Kim, S.J., Park, J.H., Kim, J.S., Kim, Y.H., Lee, S.K., Kwak, J.H. & Lee, S.M. (2014). Protective effect of linarin against D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure. *European Journal of Pharmacology*, 738, 66–73.

Kurilich, A.C., Jeffery, E.H., Juvik, J.A., Walling, M.A. & Klein, B.P. (2002). Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5053-5057.

Larrauri, J.A. y Cerezal, P. (1993). Caracterización de los residuos de diferentes variedades de Mango. *Alimentaria*, 30(242), 89–92.

Li, G., Chen, M.J., Wang, C., Nie, H., Huang, W.J., Yuan, T.D., Sun, T., Shu, K.G., Wang, C.F., Gong, Q. & Tang, S.Q. (2014). Protective effects of hesperidin on concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *International Immunopharmacology*, 21(2), 406-411.

Li, P., Wang, S., Guan, X., Cen, X., Hu, C., Peng, W., Wang, Y. & Su, W. (2014). Six months chronic toxicological evaluation of naringin in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 66, 65-75.

Liu, L., Sun, Y., Laura, T., Liang, X., Ye, H. & Zeng, X. (2009). Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng. *Food Chemistry*, 112(1), 35-41.

Luo, Y.L., Zhang, C.C., Li, P.B., Nie, Y.C., Wu, H., Shen, J.G., Su, W.W. (2012). Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a guinea pig model of chronic bronchitis induced by cigarette smoke. *International Immunopharmacology*, 13(3), 301-307.

Lynch, E. & Baysan, A. (2001). Reversal of primary root caries using a dentifrice with a high fluoride content. *Caries Research*, 35(1), 60-64.

Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Xu, G. & Liu, D. (2007). Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(3), 227-232.

Mañach, C. & Donovan, J. L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*, 38(8), 771-785.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M. y Tuñón, M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271-278.

Mendoza, H.P.E. (2003). El tepozán. *Ciencias*, 70, 32-33.

Monografía de la toronja. (s.f.). Recuperado el 12 de Julio de 2014 de <http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/page/covecainicio/imagenes/archivospdf/archivosdifusion/monografia%20toronja2010pdf>

Nuutila, A.M., Puupponen-Pimiä, R., Aarni, M. & Oksman-Caldentey, K.M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81(4), 485-493.

Obied, H.K., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D. & Robards, K. (2007). Bioscreening of australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1238-1248.

Palacios, S.M., Bertoni, A., Rossi, Y., Santander, R. y Urzúa, A. (2009). Efficacy of essential oils from edible plants as insecticides against the housefly, *Musca domestica* L. *Molecules*, 14(5), 1938-1947.

Proteggente, A.R., Pannala, A.S., Paganga, G., Van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., Van De Put, F., Dacombe, C. & Rice-Evans, C.A. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, 36(2), 217-233.

Remia, K.M. & Logaswamy, S. (2010). Larvicidal efficacy of leaf extract of two botanicals against the mosquito vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(2), 208-212.

Ribeiro, M.H.L., Afonso, C., Vila-Real, H.J., Alfaia, A.J. & Ferreira, L. (2010). Contribution of response surface methodology to the modeling of naringin hydrolysis by naringinase Ca-alginate beads under high pressure. *LWT - Food Science and Technology*, 43(3), 482-487.

Rice-Evans. (1998). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.

Rodríguez-Zaragoza, S., Ordaz, C., Avila, G., Muñoz, J.L., Arciniegas, A. y Romo, de V.A. (1999). In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Buddleia cordata* (Loganiaceae, H.B.K.) on several strains of *Acanthamoeba*. *Journal of Ethnopharmacology*, 66(3), 327-334.

Russo, P., Santoro, A., Prota, L., Stigliani, M. & Aquino, R.P. (2012). Development and investigation of dry powder inhalers for cystic fibrosis. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, 2, 17-38.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México) (2009). Estudio orientado a identificar las necesidades de infraestructura logística en la cadena de suministro de cítricos para la exportación de jugo a los mercados meta identificados. Recuperado el 10 de Noviembre de 2013, de [http:// www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)

Sansone, F., Aquino, R.P., Del Gaudio, P., Colombo, P. & Russo, P. (2009). Physical characteristics and aerosol performance of naringin dry powders for pulmonary delivery prepared by spray-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(1), 202-213.

Saura, F., y Larrauri, J.A. (1995). Fibras de frutos tropicales: Aplicaciones dietéticas. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 14(5), 107–111.

Shih-Ying, C., Charng-Cherng, C., Chin-Chen, C., Ya-Hui, C., Tzu-Hsiu, C. & Pin-Der, D. (2013). Hepatoprotection using sweet orange peel and its bioactive compound, hesperidin, for CCl₄-induced liver injury in vivo. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1591-1600.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2014). Anuario estadístico de la producción agrícola. Recuperado el 20 de Noviembre de 2013, de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>

Singh, R.P., Chidambara, M.K.N. & Jayaprakasha, G.K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 81-86.

Tavirini, S., D'Innocenti, E., Remorini, D., Massai, R. & Guidi, L. (2008). Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food Chemistry*, 107(1), 282-288.

Teow, C.C., Truong, V., McFeeters, R.F., Thompson, R.L., Pecota, K.V. & Yencho, G.C. (2007). Antioxidant activities, phenolic and s-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry*, 103(3), 829-838.

Toor, R.K., Lister, C.E. & Savage, G.P. (2005). Antioxidant activities of New Zealand-grown tomatoes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(8), 597-605.

Vargas, Angel. (2005). Dicotyledoneae. En Rzedowski, G. C., y J, Rzedowski. (Eds.). *Flora fanerogámica del Valle de México*. (2a. ed., pp. 547-550). Michoacán,

México: Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Villa, Jorge. (1996). *Cítricos*. Medellín, Colombia: Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.

Vita, J.A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 292-297.

Wang, Y.C., Chuang, Y.C. & Hsu, H.W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 106(1), 277-284.

Wei, M., Yang, Z., Li, P., Zhang, Y. & Sse, W.C. (2007). Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model. *American Journal of Chinese Medicine*. 35(4), 663-667.

Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinión in Plant Biology*, 5(3), 218-223.

Wollenweber, E. (1993). Flavones and flavonols En: J.B. Harborne (Ed.), *The Flavonoids: Advance in Research Since 1986* (pp. 259). London. Chapman and Hall.

Wu, T., Guan, Y. & Ye, J. (2007). Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, 100(4), 1573–1579.

Yeo, Y.S., Nybo, S.E., Chittiboyina, A.G., Weerasooriya, A.D., Wang, Y.H., Gongora-Castillo, E., Vaillancourt, B., Buell, C.R., DellaPenna, D., Celiz, M.D.,

Jones, A.D., Wurtele, E.S., Ransom, N., Dudareva, N., Shaaban, K.A., Tibrewal, N., Chandra, S., Smillie, T., Khan, I.A., Coates, R.M., Watt, D.S. & Chappell, J. (2013). Functional identification of valerena-1,10-diene synthase, a terpene synthase catalyzing a unique chemical cascade in the biosynthesis of biologically active sesquiterpenes in *Valeriana officinalis*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(5), 3163-3173.

Yusof, S., Ghazali, H.M. & King, G. S. (1990). Naringin content in local citrus fruits. *Food Chemistry*, 37(2), 113-121.

Zanwar, A.A., Badole, S. L., Shende, P.S., Hegde, M.V. & Bodhankar, S.L. (2014). Chapter 76-Cardiovascular Effects of Hesperidin: A Flavanone Glycoside. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 2, 898-992.

Zhang, Q., Li, J., Wang, C., Sun, W., Zhang, Z. & Cheng, W. (2006). A gradient HPLC method for the quality control of chlorogenic acid, linarin and luteolin in Flos Chrysanthemy Indici suppository. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(2007), 753-757.