



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Determinación de Naringina por 3 métodos
espectrofotométricos y su comparación
con electroforesis capilar en *Citrus x
paradisi***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO

PRESENTA:

Juan Daniel Gutiérrez Gómez

ASESORES DE TESIS:

**Dra. María Gabriela Vargas Martínez
QFB. Brígida del Carmen Camacho Enríquez**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2020



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.

Agradecimientos

“Por cada mención una bendición
De protección con el corazón
Les digo los quiero y los amo, ¿estamos?”

A mis abuelos: Magodi y Tete, esto es por y para ustedes.

A mis Padres: Porque éste es un logro tanto mío como suyo.

A mis Tías y Tío: Dulce, Adriana, Jazmín (la más guapa) y Alejandro, por cada una de sus enseñanzas está en mí.

A mis primos: Roberto, Alejandra, Eric y Diego, porque con su alegría y ánimos me dieron las ganas de no darme por vencido.

A A⁴: Goliath, Ame, Acha y Negro con quienes he crecido mirando hacia el futuro y tirando cada vez más alto hacia las estrellas.

A *Strutter*: Quien con su amor me regañó, me dio la fuerza y los conocimientos para no rendirme.

A mis amigos de la FESC: Sin ellos esto hubiera sido más estresante y menos placentero.

A la Dra. Gabriela Vargas: Por ser una gran profesora y llevarme de la mano, no solo académicamente, como persona y amiga. ¡Gracias!

A los profesores Brígida Camacho y Mario Morales: Ya que sin su apoyo, paciencia y amenas pláticas esto no tendría sentido.

A la UNAM: Por ser mi segundo hogar y donde por mi raza hablará el espíritu.

A dios: Quien se revela así mismo en una armonía de lo existente, de lo intangible y sobre todo en el amor.

A I.A.: Porque la esencia es la naturaleza intrínseca o cualidad indispensable de algo, especialmente algo abstracto, que determina su carácter.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
OBJETIVO GENERAL	2
OBJETIVOS PARTICULARES.....	2
HIPÓTESIS	2
MARCO TEÓRICO	3
<i>CITRUS × PARADISI</i> (TORONJA)	3
<i>Descripción</i>	3
<i>Clasificación taxonómica</i>	6
<i>Comercialización</i>	6
COMPUESTOS FENÓLICOS	7
<i>Flavonoides</i>	9
<i>Naringina</i>	11
<i>Propiedades</i>	12
ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS	12
<i>Bases teóricas</i>	13
<i>Transiciones electrónicas</i>	14
<i>Efecto del disolvente</i>	16
LEY DE LAMBERT-BEER.....	17
<i>Instrumentación</i>	17
ELECTROFORESIS CAPILAR.....	18
<i>Bases Teóricas</i>	19
<i>Instrumentación</i>	20
<i>Aplicaciones</i>	21
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	21
DESARROLLO EXPERIMENTAL	23
MATERIAL VEGETAL	23
SECADO	23
MOLIENDA	24
EXTRACCIÓN	24
DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	24
ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS	25
<i>Detección directa</i>	25
<i>Reacción con aluminio</i>	25
<i>Reacción con magnesio (Shinoda)</i>	26
ELECTROFORESIS CAPILAR	27
<i>Solución buffer de boratos 20 mM</i>	27
<i>Condiciones</i>	28
<i>Curva de calibración</i>	28
<i>Extracto vegetal</i>	28
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	29
<i>Detección directa</i>	29
<i>Curva de calibración</i>	29
<i>Extracto</i>	32
<i>Reacción de aluminio (Al (III))</i>	33
<i>Cinética de reacción</i>	40
<i>Curva de calibración</i>	41

<i>Extracto</i>	43
<i>Reacción de Shinoda</i>	44
<i>Mecanismo de reacción</i>	48
<i>Cinética de reacción</i>	51
<i>Curva de calibración</i>	51
<i>Extracto</i>	53
<i>Electroforesis Capilar (EC)</i>	54
<i>Extracto</i>	56
COMPARACIÓN DE MÉTODOS DESARROLLADOS.....	56
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXO	67
EQUIPOS	67
REACTIVOS	67
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	67

Abreviaturas

	Significado
A	Absorbancia
H _{Nar}	Altura del pico de Naringina
ANOVA	Análisis de variancia
BGE	Background electrolyte (electrolitos soporte)
cm	Centímetros
r ²	Coefficiente de determinación
CV	Coefficiente de variación
S	Desviación estándar
S _{bo}	Desviación estándar de la ordenada al origen
S _{b1}	Desviación estándar de la pendiente
S _{y/x}	Desviación estándar de la regresión lineal
Ec	Ecuación
EC	Electroforesis capilar
ECZ	Electroforesis capilar de zona
EI	Estándar interno
EtOH	Etanol
F _{exp}	F calculada experimentalmente
F _{tablas}	F de tablas de la distribución de Fisher
FEO	Flujo electroosmótico
°C	Grados Celsius
g	Gramos
Neo	Neohesperidina
psi	Libra fuerza por pulgada cuadrada
μA	Microamperios
μm	Micrómetros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molar
nm	Nanómetros
Nar	Naringina
b _o	Ordenada al origen o intercepto
b ₁	Pendiente
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
t _m	Tiempo de migración
UV-Vis	Espectrofotometría Ultravioleta Visible

Introducción

México es un importante productor de cítricos a nivel mundial, en especial de toronja (*Citrus x paradisi*). De acuerdo con datos de SAGARPA (2012) el principal productor de cítricos a nivel mundial es China con un 21% de la producción total, después le sigue Brasil (18%), Estados Unidos (8%), la India (6%) y México con un 4.6 %. La citricultura es una actividad de gran importancia económica y social; se realiza en poco más de medio millón de hectáreas en regiones con clima tropical y subtropical en 23 entidades federativas. De esa superficie, aproximadamente 80% se destina a los denominados cítricos dulces, cuya producción es del orden de 4.9 millones de toneladas por cosecha, principalmente de naranja (83% del total), toronja (8%), mandarina (5%) y tangerina (4%) (SAGARPA., 2012). En un estudio publicado por el Ministerio de Agricultura Estatal de China y la Universidad de Zhejiang revela que la naringina (Nar) y la Neo tienen propiedades beneficiosas para personas que sufren diabetes, ya que reducen el nivel de azúcar en la sangre (Escobar, 2010). Estas dos sustancias se encuentran tanto en el jugo como en otras partes de diferentes cítricos principalmente en la toronja (*Citrus x paradisi*) y la naranja agria (*Citrus x aurantium*), aunque los niveles varían mucho según cada variedad de dicha fruta.

La naringina es una flavanona glicosilada, presente en mayor proporción en el albedo (piel blanca) de la toronja, dependiendo de los cuidados y el clima pueden estar presentes en cantidades de 4.9 mg/g (Zhang J. , 2007; deMan, Finley, Hurst, & Lee, 2018) a 42 mg/g (S, J, J.M, & J, 2002).

Debido a la importancia biológica que tienen las flavanonas, en este trabajo se desarrolló una metodología que permite su cuantificación en el extracto de *C. paradisi* por electroforesis capilar y espectrofotometría UV-Vis. En esta última por detección directa y formación de derivados con magnesio y aluminio para discutir sus ventajas y limitaciones y contar con metodologías alternativas de análisis de rutina.

Objetivos

Objetivo general

- Desarrollar 3 métodos espectrofotométricos por ultravioleta visible y 1 método por electroforesis capilar para la determinación de naringina en toronjas con la finalidad de contar con varias alternativas analíticas que puedan ser utilizadas en los laboratorios, acorde a los equipos, recursos y tiempo disponible para realizar su análisis rutinario.

Objetivos particulares

- Desarrollar un método espectrofotométrico en la región UV por detección directa de la absorbancia del extracto, sin transformación química, para la cuantificación de naringina.
- Desarrollar un método espectrofotométrico en la región visible que cuantifique los flavonoides presentes en el extracto vegetal modificado químicamente por la reacción de Shinoda.
- Desarrollar un método espectrofotométrico en la región visible que cuantifique los flavonoides presentes en el extracto vegetal por la formación de derivados de aluminio (III).
- Desarrollar una metodología por electroforesis capilar que permita la identificación y cuantificación de los fenólicos presentes en el extracto de toronja.

Hipótesis

Los flavonoides como la naringina poseen grupos funcionales que permiten su detección y cuantificación por espectrofotometría UV-Vis y electroforesis capilar en extractos sin y con transformación química.

Marco teórico

Citrus x paradisi (Toronja)

La toronja es un árbol frutal híbrido producto del entrecruzamiento entre el pomelo (*Citrus maxima* Merr.) (Figura 1) y la naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (Figura 2). Árbol frutal originario del Caribe descrito por primera vez en 1750 cultivado en climas tropicales y semi tropicales, empleado comúnmente como un complemento del desayuno.



Figura 1 *Citrus maxima*



Figura 2 *Citrus sinensis*

Nota: Imagen adaptada de Garland (2020).

Nota: Imagen adaptada de SINAVIMO (2020).

Descripción

La toronja de nombre científico *Citrus x paradisi* Macfaed perteneciente a la familia Rutaceae es un árbol que mide entre 4.5 – 6 metros de altura. Las hojas son de color verde, miden entre 7.5 - 17 cm de largo y 4.5 -7.5 cm de ancho con una textura correosa. Las flores fragantes crecen en cúmulos de 2 - 20 flores y producen frutos globulosos en forma de pera que cuando maduran tienen un color amarillo pálido hasta naranja pálido y con un diámetro de entre 10 - 15 centímetros (FAO., 1999).



Figura 3 Árbol de *Citrus × paradisi*

Nota: Imagen adaptada de ASU (2020).

Existen varios cultivares con diferentes colores de pulpa desde el blanco hasta el rosa rojizo y con un número de gajos por fruta entre 11 a 14 segmentos. Los frutos se presentan sin semillas o escasas. El sabor particular de la toronja va desde el dulce hasta muy amargo (FAO., 1999).

Los frutos del género *Citrus* están cubiertos por una cáscara dura que protege a la pulpa o porción comestible de la fruta. La cáscara está constituida por una cutícula externa (flavedo) que contiene los sacos oleosos, o glándulas, llenas de aceite esencial con un gran valor comercial (Figura 4.)

Las glándulas oleosas también contienen agentes colorantes distribuidos uniformemente. La parte esponjosa de color blanco se le conoce con el nombre de albedo, está directamente por debajo del flavedo. Esta capa está acomodada de manera irregular con una forma no definida y contiene aproximadamente 20 % de sustancias pectinosas, también con un valor económico agregado.

La pulpa o parte comestible está dividida en 11-14 segmentos con paredes membranosas de sabor amargo; con numerosas vesículas de jugo y semillas. Los sacos de jugo están adheridos a la pared del albedo, el centro de la fruta puede ser sólido o medio hueco con una textura esponjosa (ARS., 1956).

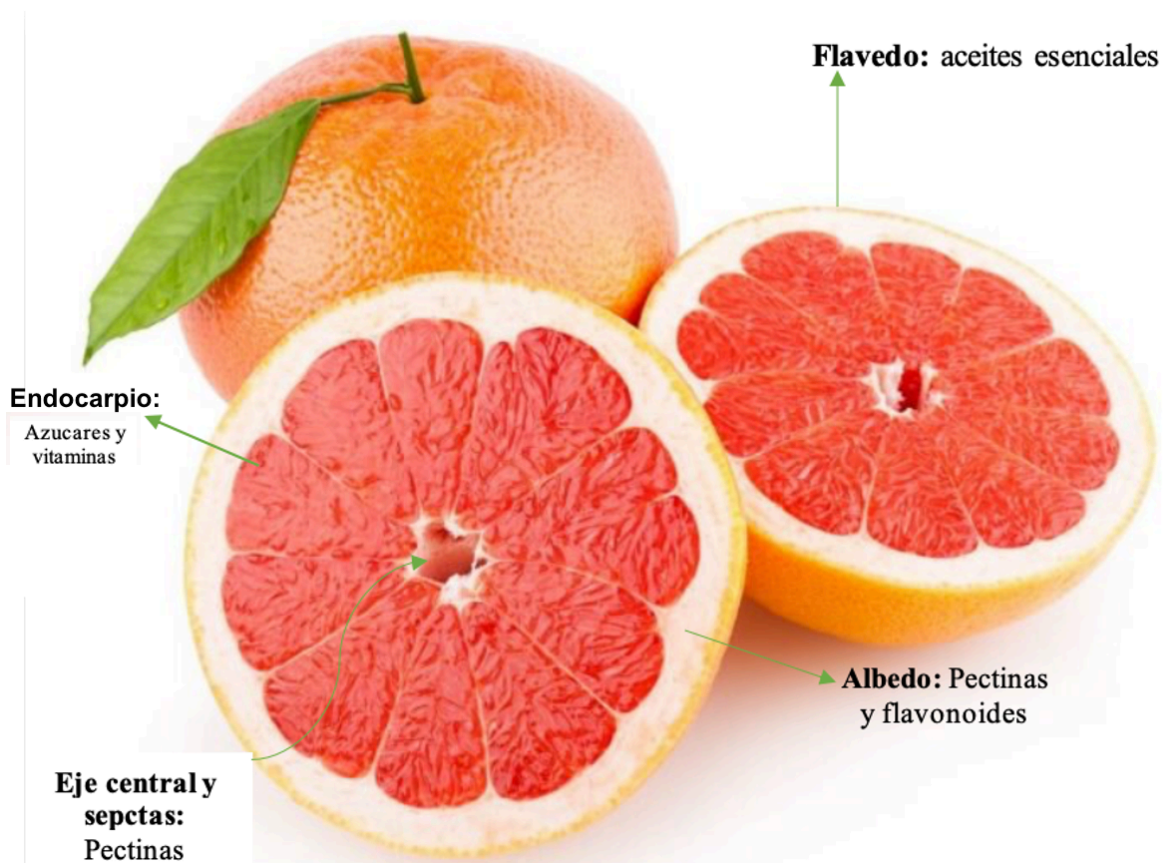


Figura 4 Representación esquemática de la composición química de un cítrico

Nota: Imagen adaptada de Londoño (2019)

Los diferentes compuestos químicos que están distribuidos en sus diferentes tejidos y organelos se concentran más en unos que en otros. Los polifenoles glicosídicos se encuentran en una concentración mayoritaria en el albedo y en una menor concentración en las vesículas de jugo. El albedo también es rico en celulosa, hemicelulosa, lignina y pectinas.

La limonina se encuentra en su mayoría en las semillas y membranas de los gajos, los azúcares están bien distribuidos en las células de todos los tejidos, pero la mayor cantidad está en las vacuolas de las células; de igual manera vitaminas, lípidos y una cantidad muy pequeña de compuestos fenólicos (Kawaii, 2000).

Clasificación taxonómica

Tabla 1 Clasificación taxonómica de la toronja

Categoría taxonómica	Nombre
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Dicotyledoneas
Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae
Género	<i>Citrus</i>
Especie	<i>Citrus x paradisi</i>

Nota: Información obtenida de USDA (2017)

Comercialización

La especie *Citrus x paradisi* se utiliza principalmente como alimento. El sabor amargo que la caracteriza es uno de los atributos que considera el consumidor, aunque no para todos es agradable. La demanda o aceptación de esta especie está fundamentada en su valor nutricional, asociado a su sabor, aroma agradable, color y textura, entre otros. Estos atributos han aumentado la demanda, favoreciendo el cultivo y la necesidad de establecer plantaciones con las variedades más solicitadas. El cultivo de toronja en nuestro país está ubicado en el cuarto lugar después de naranja, limón y mandarina, generando una gran derrama económica, tanto a nivel internacional como nacional, mayor a los 600 millones de pesos al año. Las diferentes variedades de toronja se pueden clasificar de acuerdo con el color de la pulpa (Barreiro, 1999) :

- **Blancas o comunes:** Este tipo de toronja tienen la pulpa de color amarillo y es la más cultivada en México; sin embargo, es desplazada por las variedades pigmentadas como la March.
- **De pulpa rosa:** La variedad Ruby Red es la más común y se consume en fresco; no obstante, en los últimos años se ha visto una reducción en la demanda por las variedades de pulpa roja

- **Pigmentadas rojas:** El licopeno es el componente responsable del color de esta variedad, entre éstas se encuentran la Ruby blush y Rio Red, que presentan la mayor demanda en el mercado, comercializada en fresco (SAGARPA., 2016).



Figura 5 Toronja Ruby Blush (*Citrus x paradisi*)

Nota: Imagen obtenida de SAGARPA (2016)

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo heterogéneo de metabolitos secundarios con una gran diversidad de estructuras químicas. Estos compuestos están presentes en las plantas superiores, donde desempeñan funciones relevantes, participando en los mecanismos de resistencia natural contra el estrés biótico y abiótico. Contribuyen a la integridad estructural de la planta, la fotoprotección UV, la reproducción o la regulación interna de la señalización de las células vegetales, y actúan como factores quimiotácticos, como moduladores químicos de la comunicación de la planta con insectos y microbios, y como fitoalexinas contra patógenos y herbívoros. Los compuestos fenólicos son abundantes en muchos alimentos de origen vegetal y productos derivados, donde contribuyen a las propiedades sensoriales, tecnológicas y de salud.

Los fenólicos vegetales se derivan de la vía shikimato-fenilpropanoide, la vía acetato-malonato o la combinación de ambos y se clasifican comúnmente en dos clases principales: flavonoides (flavonoides, flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles, antocianinas, isoflavonas y chalconas) y no flavonoides, incluidos alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos y derivados (p. ej., ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y sus ésteres), estilbenos y lignanos. Otros grupos fenólicos, como las quinonas naturales (benzo-, nafto- y antraquinonas), xantonas, auronas, ligninas o florotaninos.

En las fuentes naturales, los compuestos fenólicos pueden presentarse en forma libre, como derivados glicosilados, prenilados o acilados. En los tejidos vegetales y alimentos, los ácidos fenólicos a menudo se encuentran en combinaciones con polioles como la glucosa o el ácido quínico, mientras que la mayoría de los flavonoides (excepto los flavan-3-ols, que se encuentran principalmente como agliconas), lignanos y estilbenos generalmente están presentes como glucósidos. Algunos compuestos fenólicos también se presentan como estructuras polimerizadas, como los llamados taninos, de los cuales se distinguen dos clases:

Taninos condensados e hidrolizables. Los taninos condensados (también conocidos como proantocianidinas) son polímeros de unidades flavan-3-ol unidas a través de enlaces C-C entre el C-4 de una unidad flavan-3-ol y el C-8 o C-6 de otra unidad (enlace tipo B); ocasionalmente también pueden contener un enlace de éter adicional entre el C-2 de la unidad superior y el C-7 o C-5 que contiene oxígeno de la unidad inferior (enlace de tipo A). Los taninos hidrolizables están compuestos de polioles unidos a cuando menos un ácido gálico (gallotaninos) o un ácido hexahidroxidifenico (elagitaninos) (Santos-Buelga, González-Paramás, Oludemi, Ayuda-Durán, & González-Manzano, 2019).

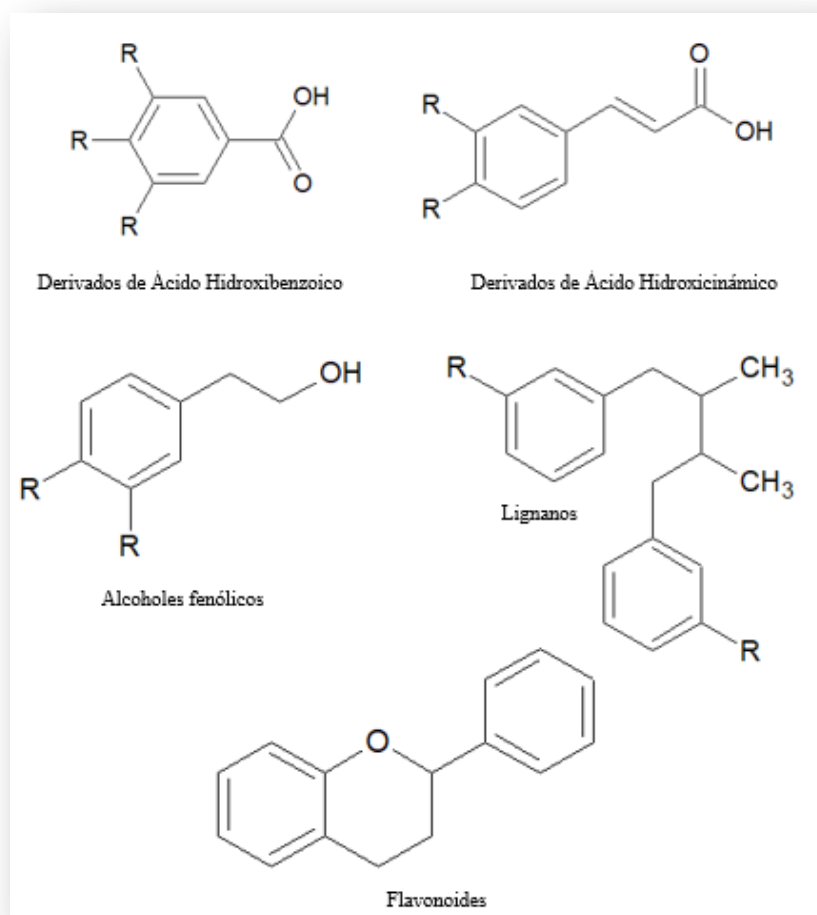


Figura 6 Ejemplos de compuestos fenólicos

Nota: Información obtenida de Quiñones (2012)

Flavonoides

Los flavonoides en específico son compuestos que comparten entre sí un esqueleto de difenilpirano (C₆-C₃-C₆) (Fig. 6). Estas moléculas son pigmentos que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Estos pigmentos protegen al organismo del daño producido por los agentes oxidantes, ya que el organismo es incapaz de producirlos naturalmente, se tienen que obtener mediante la alimentación o en forma de suplementos.

Los flavonoides fueron descubiertos por Gyorgy en 1930, aislando de la cascara del limón la citrina. Antiguamente se les denominaban vitamina P y como vitamina C, ambas denominaciones se dejaron de utilizar alrededor de los años 5 (Singleton, 1981).

Los flavonoides presentan actividades diversas antioxidantes, antifúngicas, bactericidas, con una importante capacidad para la fijación de hierro y cobre. Este grupo de compuestos se encuentra en cerveza, vino, té verde, cítricos, entre otros (Formica & Regelson, 1995).

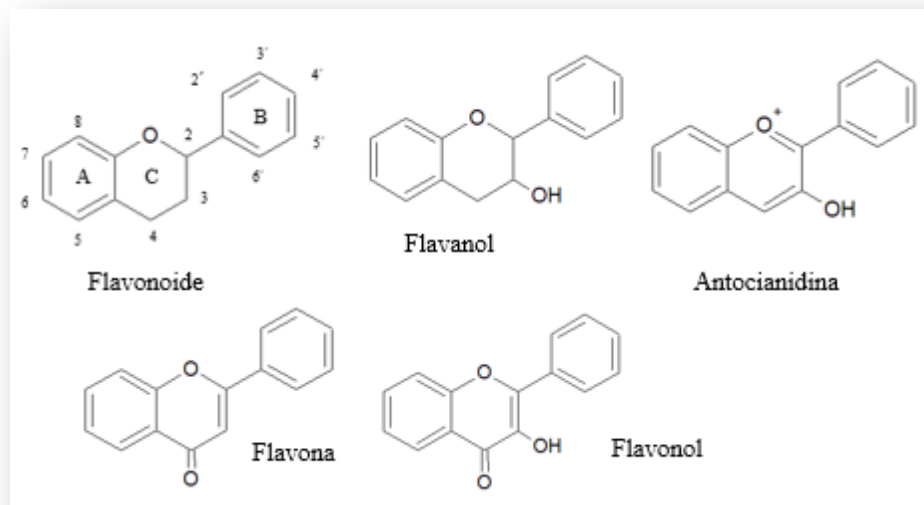


Figura 7 Flavonoides. Estructura básica y tipos

Nota: Imágenes adaptadas de Singleton (1981)

La clasificación de los flavonoides se plantea en función de sus características estructurales. A continuación, algunos ejemplos.

- **Flavonoles:** Los flavonoles tienen un doble enlace entre C-2 y C-3, con un grupo hidroxilo en la posición C-3 y un grupo carbonilo en C-4. Representan los flavonoides más ubicuos en los alimentos, con la quercetina como el compuesto más representativo. Las principales fuentes de flavonoles son las cebollas (hasta 1.2 g / kg de peso fresco), la col rizada o kale, el poro, el brócoli y los arándanos (Viñas & Campillo, 2019).

- **Flavanonas:** Las flavanonas tienen la estructura básica de 2,3-dihydroflavona, carecen de un doble enlace entre C-2 y C-3 y tienen un centro quiral en la posición C-2. La quiralidad implica que ese carbono tiene cuatro sustituyentes diferentes y carece de elementos de simetría, por lo que el anillo B puede estar arriba o abajo del plano en relación con los anillos A-C por lo que la molécula no es plana como las flavonas conjugadas. Las flavanonas son el grupo dominante de los flavonoides presentes en el género *Citrus*, por ejemplo, la naringenina en la toronja, que ha sido ampliamente estudiada por sus beneficios para la salud (Duodu & Awika, 2019).

Naringina

La naringina (4', 5, 7-trihydroxiflavanona 7-ramnoglucósido) es el principal glucósido de flavanona presente en los cítricos con un sabor amargo. Está presente como los diastereómeros (2S) - y (2R) - en muchas frutas y cuando se ingiere, las enzimas α -ramnosidasa y β -glucosidasa la hidrolizan para producir la forma absorbible, naringenina. La bioactividad de la naringenina se atribuye a su capacidad para transferir electrones, atrapar radicales libres, formar quelatos metálicos, activa las enzimas antioxidantes e inhibe las oxidasas. Entre los principales usos de la naringina están: perfumería, saborizante de golosinas, bebidas y panadería. Además de utilizarse como precursor del edulcorante dihydrochalcona de la naringina con un poder endulzante 300 veces mayor que la sacarosa (deMan, Finley, Hurst, & Lee, 2018).

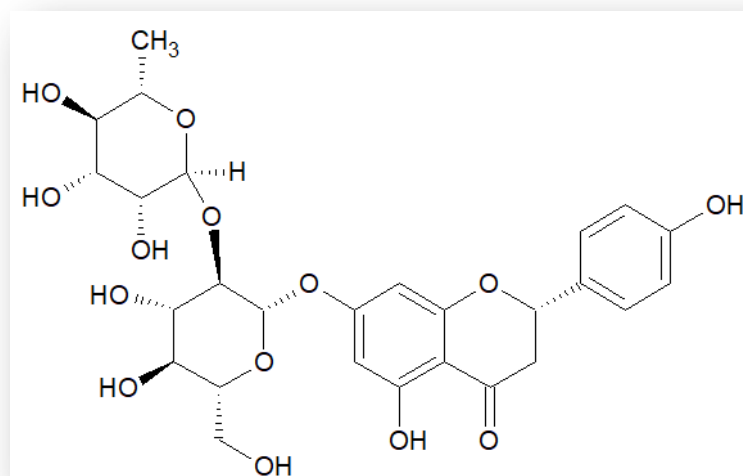


Figura 8 Estructura de la Naringina

Propiedades

La naringina y su aglicona naringenina (figura 9) son antioxidantes presentes en muchas variedades de cítricos como la toronja, ligeramente solubles en agua y con propiedades antiulcerosas, antiinflamatorias, y anticancerígenas (Guthrie, Chambers, Moussa, & Carroll, 1996).

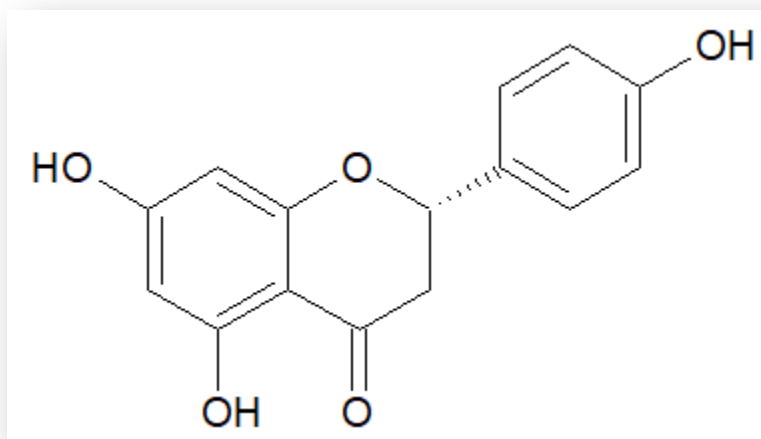


Figura 9 Estructura de la Naringenina

La naringina es un antioxidante menos potente que la naringenina por el disacárido enlazado en el oxígeno del C-7 (Choudhury & Chowrimootoo, 1999).

Espectrofotometría UV-Vis

La espectrofotometría UV-Vis es principalmente una técnica analítica cuantitativa relacionada con la absorción de radiación en la región del ultravioleta cercano (180-390 nm) o visible (390-780 nm) por especies químicas en solución o en fase gaseosa. Estas regiones del espectro electromagnético proporcionan energía que da lugar a transiciones electrónicas. Los diversos colores de la luz visible y los colores complementarios de las soluciones que absorben a longitudes de onda particulares se muestran en la tabla 2 (Worsfold & Zagatto, 2019).

Tabla 2 Colores y regiones del espectro visible

Longitudes de onda (nm)	Color absorbido	Color Transmitido (Observado)
100-190	Ultravioleta del vacío	Ninguno
190-380	Ultravioleta cercano	Ninguno
380-435	Violeta	Amarillo-verde
435-480	Azul	Amarillo
480-500	Verde-azul	Naranja-Rojo
500-560	Verde	Púrpura
560-580	Amarillo-verde	Violeta
580-595	Amarillo	Azul
595-650	Naranja	Verde-Azul
650-780	Rojo	Azul-Verde

Nota: Información obtenida de Skoog (1998)

Bases teóricas

Las bandas de absorción en las regiones UV-Vis que presentan los compuestos orgánicos están asociadas con transiciones electrónicas en la capa de valencia. Los electrones implicados en estas transiciones corresponden a los electrones más débilmente atraídos por el conjunto de núcleos atómicos que componen la molécula y cuyos estados se pueden describir por los orbitales moleculares que se enuncian como combinaciones lineales de orbitales atómicos de la capa de valencia. Los orbitales moleculares de la capa de valencia de los compuestos orgánicos se clasifican:

Orbitales σ y σ^* : Son orbitales moleculares localizados a lo largo del eje de unión de los átomos. Los orbitales σ generan una densidad electrónica elevada en la región internuclear teniendo un carácter fuertemente enlazante. Los orbitales σ^* , como todos los orbitales antienlazantes, presentan un plano nodal perpendicular al eje del enlace en la región internuclear y tienen un acentuado carácter antienlazante.

Orbitales π y π^* : Este tipo de orbitales se emplean para la descripción de los enlaces múltiples. Las regiones de mayor densidad electrónica se encuentran perpendiculares al eje del enlace. El carácter enlazante o antienlazante de estos orbitales es menos acentuado que el de los orbitales σ .

Orbitales n: Los orbitales moleculares tienen un acentuado carácter local y describen pares electrónicos libres asociados a heteroátomos como O, S, N y halógenos. Energéticamente tienen carácter no-enlazante (Ríos, 2017).

Transiciones electrónicas

En la figura 10 se muestran las energías de los diferentes tipos de orbitales moleculares y las diferencias significativas que hay entre ellos. Existen cuatro tipos de transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$.

Transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Esta transición se realiza cuando un electrón de una molécula en un orbital enlazante absorbe energía y es excitado al orbital de antienlace.

La energía para realizar esta transición es muy grande y corresponde a frecuencias pertenecientes al ultravioleta lejano o de vacío.

Transiciones $n \rightarrow \sigma^*$. Estas transiciones son de menor energía que las $\sigma \rightarrow \sigma^*$ y se pueden generar por la absorción de energía proveniente de la región entre 150 y 250 nm.

Transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$. La transición n o π al estado excitado π^* es la que mayor aplicación tiene en la espectroscopia de absorción de compuestos orgánicos. La energía necesaria para esta transición conduce a bandas en una región espectral conveniente experimentalmente del orden de los 200 a 700 nm. Las dos transiciones requieren de un grupo funcional que proporcione los orbitales π . Estos centros absorbentes insaturados se denominan cromóforos. En su mayoría la aplicación de UV-Vis se basa en transiciones de electrones n o π al estado π^* . (Skoog, 1998)

En la tabla 3 se muestran algunos ejemplos comunes de transiciones electrónicas específicas:

Tabla 3 Ejemplos de transiciones electrónicas permitidas

Electrones implicados	Enlace	Transición	Longitud de onda (nm)
Electrones σ	C-C, C-H	$\sigma-\sigma^*$	150
	-O-	$n-\sigma^*$	185
	-N-	$n-\sigma^*$	195
Electrones n	-S-	$n-\sigma^*$	195
	C=O	$n-\pi^*$	290
	C=O	$n-\sigma^*$	190
Electrones π	C=C	$\pi-\pi^*$	190

Nota: Información obtenida de Vallejo (2014)

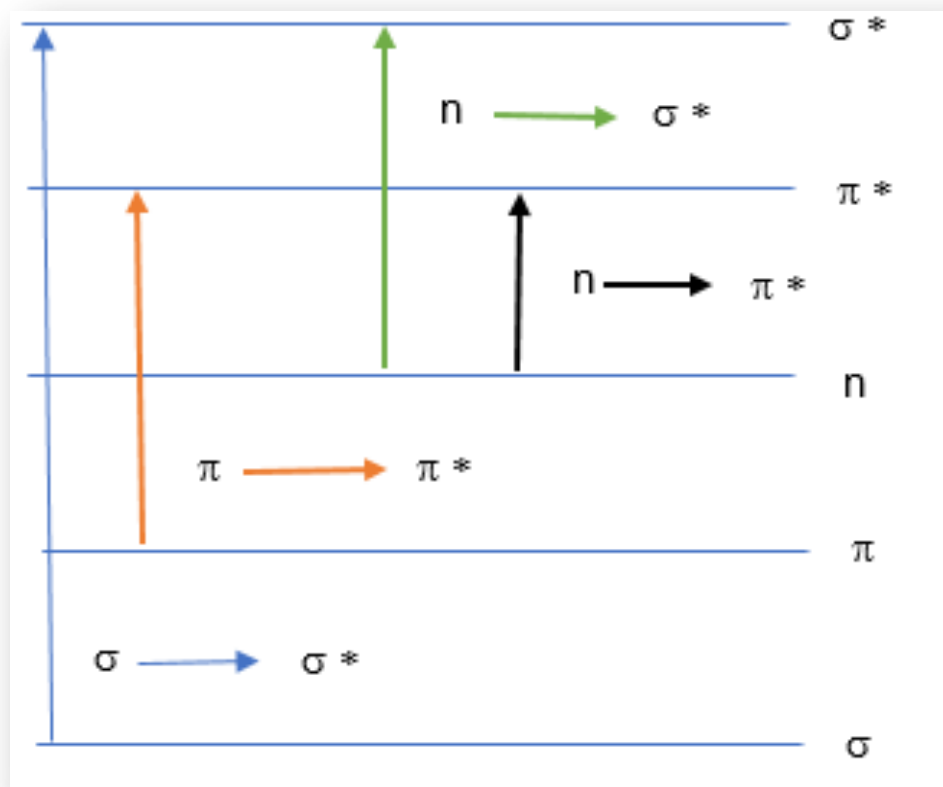


Figura 10 Niveles energéticos para diferentes orbitales moleculares y las transiciones electrónicas posibles

Los auxocromos son grupos funcionales que por sí solos no tienen absorción, sino que tienden a modificar la absorción del grupo cromóforo produciendo un desplazamiento de la banda.

Los grupos auxocromo tienen los siguientes efectos sobre los cromóforos:

- **Desplazamiento batocrómico.** La absorción del cromóforo se desplaza hacia mayores longitudes de onda, esto es, desplazamiento al rojo.
- **Desplazamiento hipsocrómico.** La absorción del cromóforo se desplaza hacia menores longitudes de onda, es decir, desplazamiento al azul. Este desplazamiento puede ser provocado por el disolvente o por un sustituyente.
- **Efecto hipercrómico.** Aumento en la intensidad del máximo de absorción.
- **Efecto hipocrómico.** Disminuye la intensidad del máximo de absorción.

Efecto del disolvente

En términos generales en las transiciones $\pi-\pi^*$ los estados excitados son más polares que los fundamentales, por lo tanto, al haber un aumento de polaridad del solvente, la interacción dipolo-dipolo disminuye la energía de transición entre el estado de excitación y el fundamental; esto da como resultado un efecto **batocrómico**.

En el caso de electrones no compartidos (**n**) se forman puentes de hidrógeno con los protones H^+ del solvente polar (agua, alcohol), la energía de transición es mayor y por lo tanto da un efecto **hipsocrómico** (Cuesta, Márquez, & Campo, 2015).

Las bandas de transiciones $n-\pi^*$ se desplazan hacia longitudes de onda más cortas (**hacia el azul**) a medida que aumenta la polaridad del disolvente. Las bandas asociadas a transiciones $\pi-\pi^*$ el estado de excitación es más polar que el basal, por lo tanto, ésta pasará a longitudes de onda más grandes (**hacia el rojo**), en disolventes polares. (Olsen, 1990).

Ley de Lambert-Beer

Esta ley expresa la relación entre la absorbancia de luz monocromática y la concentración de un cromóforo en solución. La cual se enuncia en la siguiente Ec (Holler & Crouch, 2015):

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Donde:

ϵ : Coeficiente de extinción molar, es una constante relacionada con el área de incidencia del cromóforo y la probabilidad de que se produzca la absorción.

l : Recorrido en cm de la radiación a través de la muestra (generalmente 1 cm)

C : Concentración de la muestra en moles/litro

A : La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración, de la distancia que recorre la luz por la solución y, por último, depende de ϵ , una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción, que es específica de cada cromóforo. (Vallejo, 2014)

Instrumentación

En general los equipos de instrumentación de espectroscopia óptica incluyen 5 componentes y el caso de UV-Vis no es la excepción, los componentes son los siguientes: Fuentes de energía (1), Selector de longitud de onda (2), Muestra o cubeta (3), detector (4) y el procesador de señales o computador (5) (Fig.11) (Shimadzu, 2018).

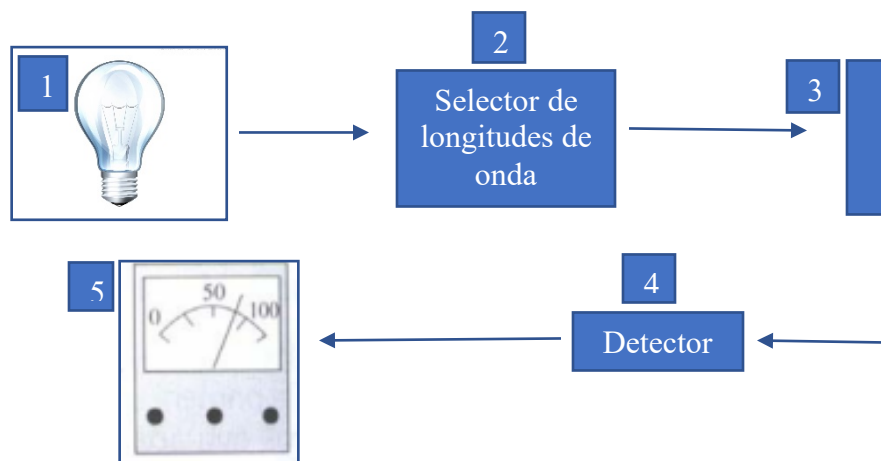


Figura 11 Diagrama básico de un componente UV-Vis

Nota: imagen obtenida de Skoog (1998)

La espectrofotometría UV-Vis se utiliza para la determinación cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos conjugados. Esta técnica tiene una gran aceptación porque tiene un amplio campo de aplicación, con errores relativos entre 1 y 3 %, con resultados con un mínimo de incertidumbre. Además de ser una herramienta con costos razonables y de fácil utilización.

Electroforesis Capilar

La palabra electroforesis proviene de las raíces griegas *electrón* que significa ámbar, es decir producto que emite brillo, vocablo utilizado por el físico inglés George Johnstone Stoney (1891) para referirse al electrón. El otro componente foresis, del griego *phoresis* significa transporte. Electroforesis es un término general que describe la migración y separación de partículas cargadas (iones) sometido a la influencia de un campo eléctrico.

La electroforesis capilar (EC) es una de las técnicas de separación en fase líquida más poderosas, introducida en 1967 por Hjertén y después desarrollada por Virtanen. Esta técnica surge a partir de las técnicas tradicionales como la electroforesis en gel, convirtiéndose en una alternativa a la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y la cromatografía de gases (GC).

La electroforesis capilar es una técnica de separación en fase líquida que utiliza un campo eléctrico de alto voltaje como fuerza impulsora y un tubo capilar como canal de separación para lograr la separación en función de las diferentes velocidades de migración y los coeficientes de distribución de los analitos, generalmente con carga eléctrica (Shallan, Guijt, & Breadmore, 2013).

Bases Teóricas

La separación se lleva a cabo en un tubo capilar con un diámetro interno entre 10-75 μm y una longitud de 20 -100 cm, generalmente está compuesto de sílice fundida recubierto de poliamidas. El capilar se llena con un buffer que constituye el medio de separación a partir de los viales situados en los extremos del capilar. La muestra (contenida en un vial diferente) se introduce en uno de los extremos del capilar. El campo eléctrico necesario se consigue al conectar el capilar a una fuente de alimentación de 10 a 30 kV y una corriente de 5-100 μA en los extremos del capilar de separación (Gutiérrez, 2018).

Los grupos silanol (Si-OH) del capilar son ionizados a un pH menor a 3, en consecuencia, la superficie del capilar presentará carga negativa por la presencia de iones Si-O^- . Una doble capa eléctrica se forma en la pared del capilar formada por una primera capa (fija) de cationes que son atraídos por la carga negativa del capilar, seguida por una segunda capa (móvil) que está compuesta de cationes que están adyacentes a la capa fija y hacia el centro del capilar, el número de cationes y aniones son equivalentes (Figura 12c). Cuando se aplica el campo eléctrico, el exceso de cationes de la capa móvil genera un flujo de migración hacia el polo negativo (cátodo), produciendo un flujo electroosmótico (FEO). El FEO señala la migración de un líquido (solución buffer) respecto a una superficie cargada (pared del capilar) cuando se aplica un campo eléctrico. La movilidad del FEO (μ) está en función de la viscosidad (η) de la solución buffer, la constante dieléctrica del medio (ϵ) y del potencial Z (ζ) que se forma por la diferencia de cargas entre las capas.

$$\mu_{\text{feo}} = \epsilon\zeta/4\pi\eta$$

Al generar un campo los cationes de la capa móvil se establece un flujo de migración hacia el polo negativo (cátodo), con esto se genera un flujo electroosmótico (FEO), es decir, a la migración de un líquido respecto a una superficie cargada (pared capilar) (Chopin, 2012).

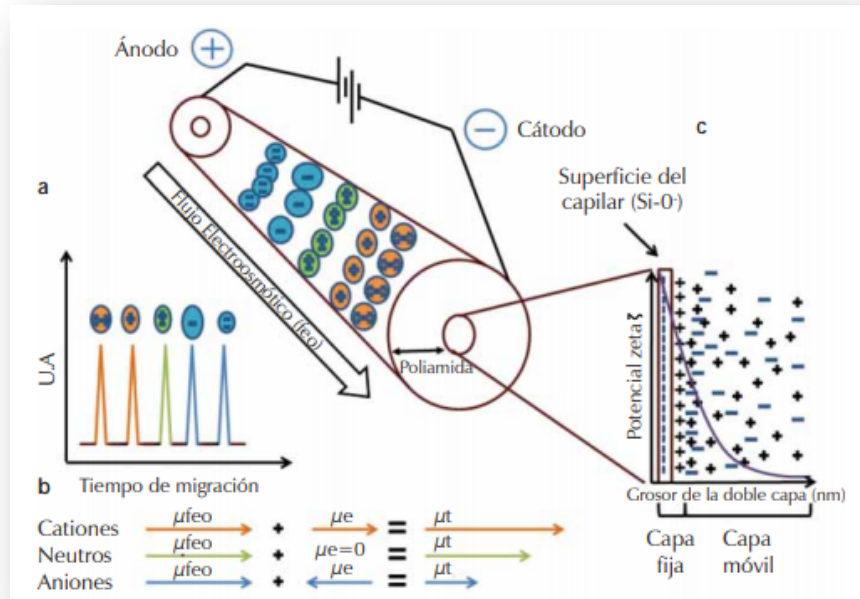


Figura 12 A) Separación Relación carga-masa, B) Movilidad de los analitos, C) Representación de la doble capa eléctrica

Nota: Imagen obtenida de Chopin (2012)

Instrumentación

En principio, todas las técnicas de CE se llevan a cabo utilizando el mismo equipo: (1) Un electrodo de platino, (2) La cámara de separación, es decir, el tubo capilar, (3) Una fuente de alimentación de alto voltaje, (4) Los depósitos de tampón anódico y catódico, (5) el sistema de inyección con la muestra y (6) El detector. (Chopin, 2012).

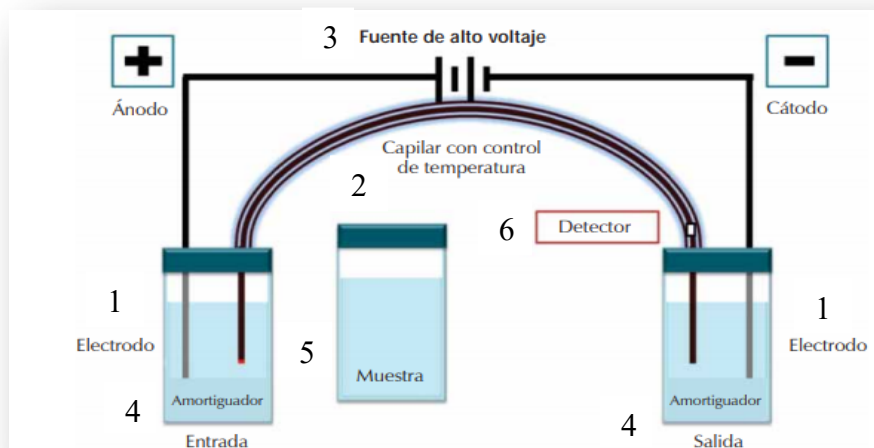


Figura 13 Diagrama básico de un equipo de EC
 Nota: Imagen obtenida de Skoog (1998)

Aplicaciones

La electroforesis capilar tiene una amplia gama de aplicación en áreas como: análisis de producto farmacéuticos, ADN, compuestos quirales, proteínas, péptidos, muestras clínicas y forenses, iones metálicos y aniones inorgánicos (Bosserhoff & Hellerbrand, 2010).

Determinación de compuestos fenólicos

En la tabla 4 se muestran las diferentes técnicas y condiciones utilizados para la identificación y cuantificación de naringina. Esta tabla incluye pruebas a la gota que son rápidas, económicas; sin embargo, poco selectivas y técnicas instrumentales como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) que permite la separación y cuantificación de cada compuesto presente en la muestra de análisis.

Tabla 4 Métodos de identificación y cuantificación de polifenoles

Tipo de prueba	Técnica Analítica	Analito	Resultado	Condiciones de trabajo	Referencia
Cuantitativa	HPLC	Naringina	49,9399 ± 0,32 mg/g	Columna C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm x 5 µm), 40°C, λ= 254nm - 300 nm, una velocidad de flujo de 1,0 mL/min, y un volumen de inyección de 40 µL.	(Dominguez, 2016)
Cuantitativa	HPLC	Naringina	14.9 mg/g	Fase móvil: metanol/agua/ácido acético (37:59:4 v/v). Pretratamiento: calentar las cáscaras a diferentes temperaturas y tiempos. Extracción: Metanol 80%, 120°C por 90 min	(Xu, 2007.)
Cuantitativa	HPLC	Naringina	23.6951 mg/g	Cromatograma del extracto alcohólico de la cáscara de Toronja. Extracción: 80% etanol, 25°C, una semana. Fases: (A) ácido acético-agua 2.5%, (B) acetonitrilo 80%-fase A 20%. Longitud de onda 280nm. Columna C ₁₈ Waters, Novapack 3.9 x NG NG 50 150mL	(Escobar, 2010)
Cualitativa	Cloruro férrico.	Polifenoles	Color verde oscuro indica presencia de flavonoides	Algunas gotas de solución neutra de cloruro férrico (5%) son añadidas a extractos etanólicos	(Saptarini, 2016)
Cualitativa	Acetato de plomo	Polifenoles	Precipitado color ante	Se añaden algunas gotas de acetato de plomo (10%)	(Rengifo, 2013)
Cualitativa	OH ⁻ / H ⁺	Polifenoles	Color amarillo pálido al adicionar base fuerte / incoloro al adicionar ácido concentrado	Se añade unas gotas de hidróxido de sodio / adición de unas gotas de ácido clorhidrico concentrado.	(Funmilayo, 2017)

Por último, el consumo de cítricos es muy saludable, su composición química rica en compuestos fenólicos favorece la prevención de algunas enfermedades (Alam, y otros, 2014). México tiene condiciones climatológicas favorables para la producción de cítricos que lo convierten en líder mundial. El desarrollo de métodos que permitan detectar y cuantificar a los compuestos fenólicos (como la naringina) podría contribuir al desarrollo de variedades con un alto contenido en compuestos de este tipo.

Desarrollo experimental

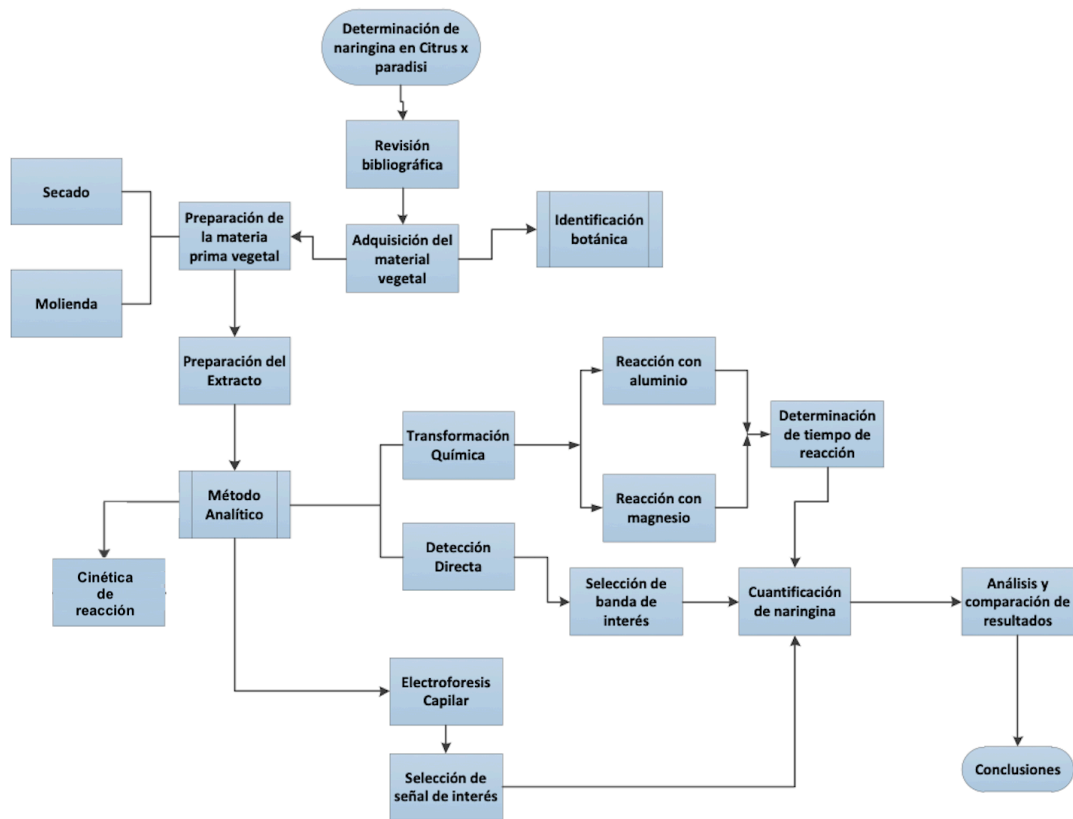


Figura 14 Diagrama de la metodología aplicada en el desarrollo de este proyecto

Material vegetal

Las toronjas se compraron en un supermercado en el mes de febrero, se lavaron y con mucho cuidado, se separó la pulpa del resto del fruto para mantener el albedo adherido al epicarpio (cáscara).

Secado

El albedo adherido al epicarpio se extendió sobre papel secante y se dejó secar al aire libre y a la sombra, cuidando que durante el proceso el material estuviera protegido de la luz y el polvo. Después, del material seco se separó el albedo de la cáscara.

Molienda

El albedo seco se colocó en un procesador de alimentos marca Moulinex® y se trituro hasta obtener un polvo más o menos grueso. Este polvo se tamizó a través de una malla 30 para obtener un polvo de tamaño de partícula homogéneo.

Extracción

En un vaso de precipitados de 50 mL se colocó un gramo de polvo de albedo seco y se agregaron 25 mL de etanol-agua(80:20 v/v). La mezcla se colocó en un baño ultrasónico por 30 min manteniendo la temperatura a 30°C. Finalizado el tiempo la mezcla se colocó en una centrifuga a 3500 rpm por 15 min. En un matraz volumétrico de 20 mL se colocó el sobrenadante separado y se llevó a la marca de aforo con agua desionizada (stock del extracto). El proceso se realizó protegido de la luz para evitar la degradación de los compuestos fenólicos y se reservó para la cuantificación.

Tabla 5 Determinación de tiempo y volumen de Etanol Agua 80:20

Volumen de disolvente (mL) / Tiempo (min)	10	15	20	25	30
10	X	X	X	X	-
20	X	X	XX	XX	-
30	XX	XX	XXX	XX	-
40	-	-	X	X	-

Nota: -= Ausencia X= Presencia minima XX= Presencia XXX= Presencia abundante.

Desarrollo del Método Analítico

La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó por espectrofotometría UV-Vis con tres tratamientos diferentes del extracto y los valores obtenidos se compararon entre sí y con electroforesis capilar.

Espectrofotometría UV-Vis

Detección directa

Solución stock. En un matraz volumétrico de 5 mL se colocaron 0.0254 g de Nar reactivo analítico y se disolvieron con etanol-agua (80:20 v/v). En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 0.5 mL de la disolución preparada y se llevó a la marca de aforo con la misma mezcla de disolventes.

La curva de calibración se preparó colocando alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mL de la solución stock en matraces volumétricos de 25 mL y llevando a la marca de aforo con la mezcla etanol-agua (80:20 v/v). Las concentraciones resultantes están entre 1.09×10^{-5} M a 6.55×10^{-5} M y se midió el espectro de absorción UV-Vis (250-400 nm) para cada una. Todo esto se realizó en un espectrofotómetro modelo Halo XB-10 Marca Dynamica con una variación de longitud de onda de 2 nm entre medición y una precisión de 2 nm.

El espectro de absorción del extracto (stock del extracto) se obtuvo bajo las mismas condiciones y el valor de la absorbancia promedio se interpoló en la curva para determinar la concentración en una longitud de onda óptima de 288 nm.

Reacción con aluminio

Cinética de reacción

En un matraz volumétrico de 25 mL se disolvieron 0.0185 g de Nar reactivo analítico con etanol-agua (80:20 v/v). En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 3.0 mL de la disolución anterior y se añadieron 0.6 mL de NaNO_2 (5%), 0.5 mL de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (10%) y 3.0 mL de NaOH (5%) y se disolvieron con etanol-agua (80:20 v/v). Esta solución se colocó en el espectrofotómetro UV-Vis y se programó una cinética

de reacción a una longitud de onda de 380 nm por 180 min para fijar el tiempo de reacción en 100 min.

Curva de calibración

Solución stock. En un matraz volumétrico de 5 mL se disolvieron 0.0174g de naringina reactivo analítico con una mezcla de etanol-agua (80:20 v/v). En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 0.5 mL de la disolución anterior y se llevaron a la marca de aforo con la mezcla etanol-agua (80:20 v/v). Las disoluciones patrón se prepararon en 6 matraces volumétricos de 10 mL colocando, por separado, alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mL. A cada matraz se adicionaron 0.6 mL de NaNO_2 (5%), 0.5 mL de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (10%) y 3.0 mL de NaOH (5%) y se disolvieron con etanol-agua (80:20 v/v) y se dejó reposar por 100 min.

Reacción con el extracto

En un matraz volumétrico de 10 mL se colocó 1 mL de la solución stock del extracto y se llevó al volumen con agua desionizada. En otro matraz volumétrico se colocaron 4 mL de la disolución anterior y se le agregaron 0.6 mL de NaNO_2 (5%), 0.5 mL de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (10%) y 3.0 mL de NaOH (5%) y se completó al volumen con agua desionizada y se dejó reposar durante 100 min. Este procedimiento se realizó por triplicado y se obtuvo el valor de absorbancia promedio y se interpoló en la curva de calibración para obtener la concentración.

Reacción con magnesio (Shinoda)

Cinética de reacción

En un matraz volumétrico de 25 mL se disolvieron 0.0322 g de Nar reactivo analítico con etanol-agua (80:20 v/v). En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 0.5 mL de la disolución anterior y se adicionaron 2.0 mL de ácido clorhídrico concentrado, 0.011 mg de magnesio metálico y la disolución se llevó a la marca de aforo con etanol-agua (80:20 v/v) y se agito hasta homogenizar. Esta solución se colocó en el espectrofotómetro UV-Vis y se programó una cinética de reacción a una longitud de onda de 230 nm por 200 min para fijar el tiempo de reacción en 110 min.

Curva de calibración

En un matraz volumétrico de 25.0 mL se disolvieron 0.0596 g de Nar reactivo analítico con etanol-agua (80:20 v/v) (Solución 3). En matraces volumétricos de 10 mL se colocaron los siguientes volúmenes por separado: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mL, después se adicionaron aproximadamente 0.011 g de Mg metálico y 1 mL de HCl concentrado y se llevaron a la marca de aforo con etanol agua (80:20 v/v). Muestras de cada concentración se colocaron en el espectrofotómetro UV-Vis para obtener los espectros de absorción y el valor de absorbancia que se consideró fue a 553 nm.

Reacción con el extracto

En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 4 mL de la solución stock de extracto, después se adicionaron aproximadamente 0.011 g de Mg metálico y 1 mL de HCl concentrado y se llevaron a la marca de aforo con etanol agua (80:20 v/v). Este procedimiento se realizó por triplicado y se obtuvo el valor de absorbancia (promedio de las tres) y se interpoló en la curva de calibración para obtener la concentración.

Electroforesis capilar

Solución buffer de boratos 20 mM

En un matraz volumétrico de 50 mL se colocaron 0.9565 g de borato de sodio (a partir de tetraborato de sodio) y se disolvieron con agua desionizada. En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 10.0 mL y se llevaron a la marca de aforo con agua desionizada (Buffer de trabajo) (Solución 6).

Condiciones

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: capilar de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno y longitud total de 49.7 cm. Se utilizó un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 200 nm y un voltaje de 24.8 kV y una temperatura constante de 25 °C. El electrolito soporte consistió en una solución de buffer de boratos a una concentración de 20 mM y pH de 9.41.

Curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se preparó una solución stock de Nar. En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 0.0171 g de naringina reactivo analítico y se disolvieron con una mezcla de etanol-agua (80:20 v/v). En matraces volumétricos de 25 mL se colocaron volúmenes de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mL de la solución stock de naringina y se llevaron a la marca de aforo con la mezcla de etanol-agua (80:20 v/v), obteniéndose concentraciones entre 4.24163×10^{-5} – 2.54498×10^{-4} M. Se obtuvieron los electroferogramas de cada concentración para la obtención de la curva de calibración. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Extracto vegetal

En un vaso de precipitados de 10 mL se pesó 1.0 g de albedo seco, se adicionó 20 mL de etanol-agua (80:20 v/v). La mezcla se puso en un baño ultrasónico por 30 minutos cuidando de mantener la temperatura a no más de 30°C. Terminado el tiempo se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se separó de la mezcla y se colocó en un matraz volumétrico de 25.0 mL y se llevó a la marca de aforo con etanol-agua (80:20 v/v). En un matraz volumétrico de 25 mL se colocó 1.0 mL de la disolución anterior y se llevó a la marca de aforo con etanol y agua (80:20 v/v).

Resultados y análisis de resultados

Detección directa

Curva de calibración

En la figura 16 se muestran los espectros de absorción obtenidos para cada concentración. En el espectro se observan dos bandas anchas, la que está marcada como II es más intensa que la I.

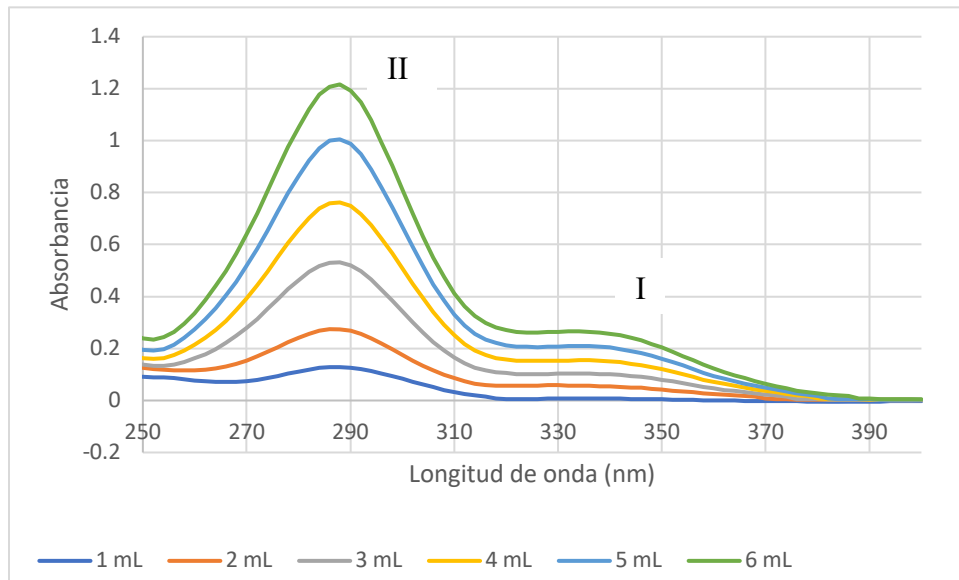


Figura 16 Espectros de absorción de las soluciones patrón de Nar en etanol-agua (80:20) a concentraciones crecientes

La banda II se encuentra en una longitud de onda de 288 nm y corresponde al benzoilo de la naringina, zona coloreada en rojo de la figura 17. La banda I se asigna al cinamoilo con una longitud de onda máxima de absorción de 340, zona coloreada en azul.

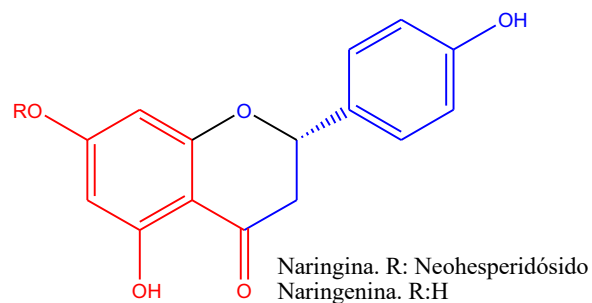


Figura 17 Estructura de naringina separada por regiones

La longitud de onda que se seleccionó para construir la curva de calibración pertenece a la banda de mayor intensidad con un valor de 288 nm, asignada al benzoilo de la estructura de naringina. En la tabla 6 se muestran los valores de absorbancia obtenidos experimentalmente para cada concentración.

Tabla 6 Valores de la curva de calibración

Patrón	Absorbancia
1	0.1276
	0.1284
	0.1411
2	0.2423
	0.2744
	0.2937
3	0.4457
	0.5317
	0.5457
4	0.7621
	0.7638
	0.7941
5	0.9679
	0.9852
	1.0049
6	1.2039
	1.2142
	1.2164

La figura 18. Muestra la curva de calibración obtenida de soluciones de Nar preparadas por triplicado.

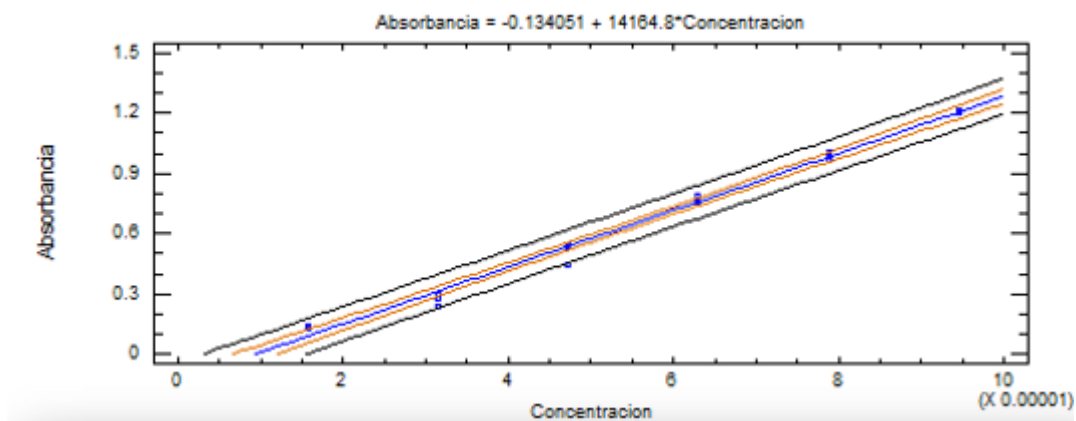


Figura 18 Curva de calibración del método Estándar directo de Nar.

La curva de calibración de naringina cumple con los valores de los parámetros de linealidad y se observa que cumple con los requisitos (tabla 7).

Tabla 7 Parámetros de linealidad de la curva de calibración del método de estándar directo Nar

Parámetros	Valor obtenido	Criterio de Aceptación	Observación
R²	0.9913	$R^2 \geq 0.98$	Sí cumple
IC	14863.2236- 13466.4078	IC No debe incluir a cero	Sí cumple
CV	3.0932	$CV \leq 5\%$	Sí cumple

En la figura 19 se muestra la gráfica de residuales y se observa sin tendencia ni puntos anómalos por lo que el modelo de regresión es homocedástico que implica que la varianza de los errores es constante.

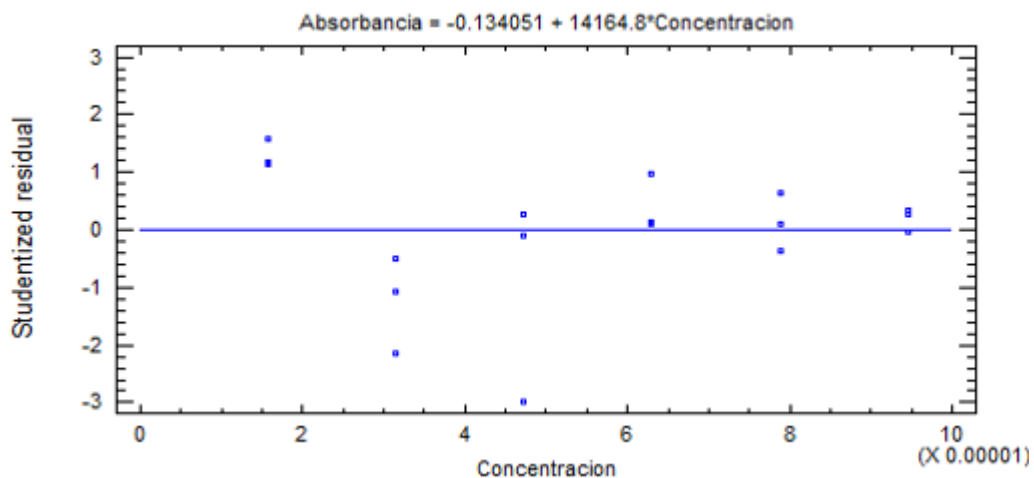


Figura 19 Gráfica de residuales de la curva de valoración de naringina

Extracto

El espectro de absorción del extracto vegetal preparado, como se indicó en anteriores apartados se muestra en la figura 20.

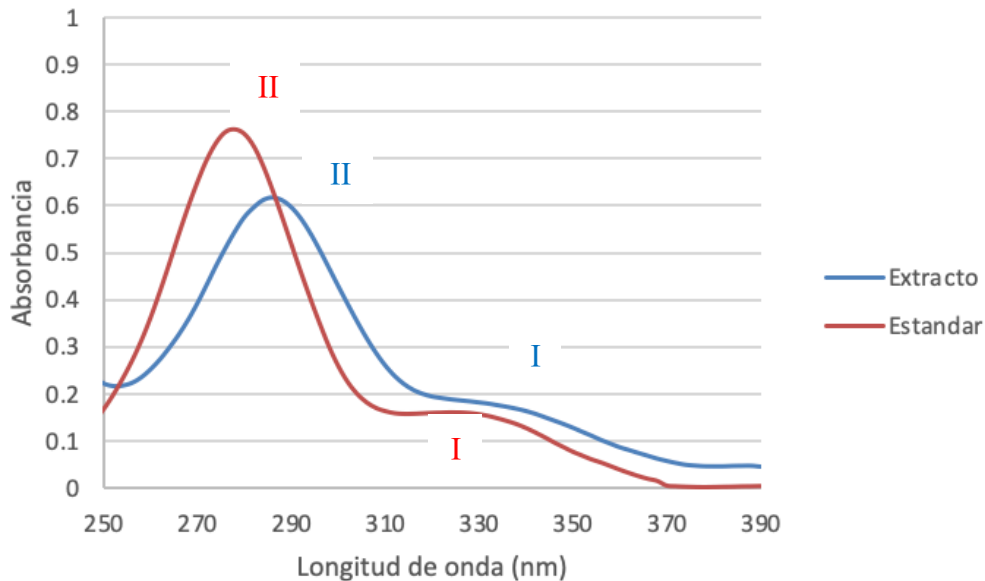


Figura 20 Espectros de absorción de Nar en la muestra vegetal de Toronja y en el estandard

El espectro de absorción del extracto hidroalcohólico de toronja es muy similar al observado con el estándar de naringina, se observan las dos bandas con formas e

intensidades similares con lo que se puede confirmar la presencia de dicho compuesto.

Los valores promedio de absorbancia obtenidos a 288 nm, 0.4504 se interpolaron en la curva de calibración, calculando una concentración de 77.4787 mg/g de naringina, con una desviación estándar de 1.1772.

Reacción de aluminio (Al (III))

El método colorimétrico utilizado para determinar el contenido total de flavonoides se basa en la reacción de los flavonoides con el sistema cromogénico $\text{NaNO}_2\text{-Al(III)-NaOH}$ (Hongbin, W., Yuxuan, & Yalin, 2009).

Los flavonoides presentes en el flavedo de *C. paradisi* son eriocitrina, neoeriocitrina, neohesperidina, naringina, entre otros, siendo la naringina el mayoritario (Zhang, Duan, Zang, Huang, & Liu, 2011).

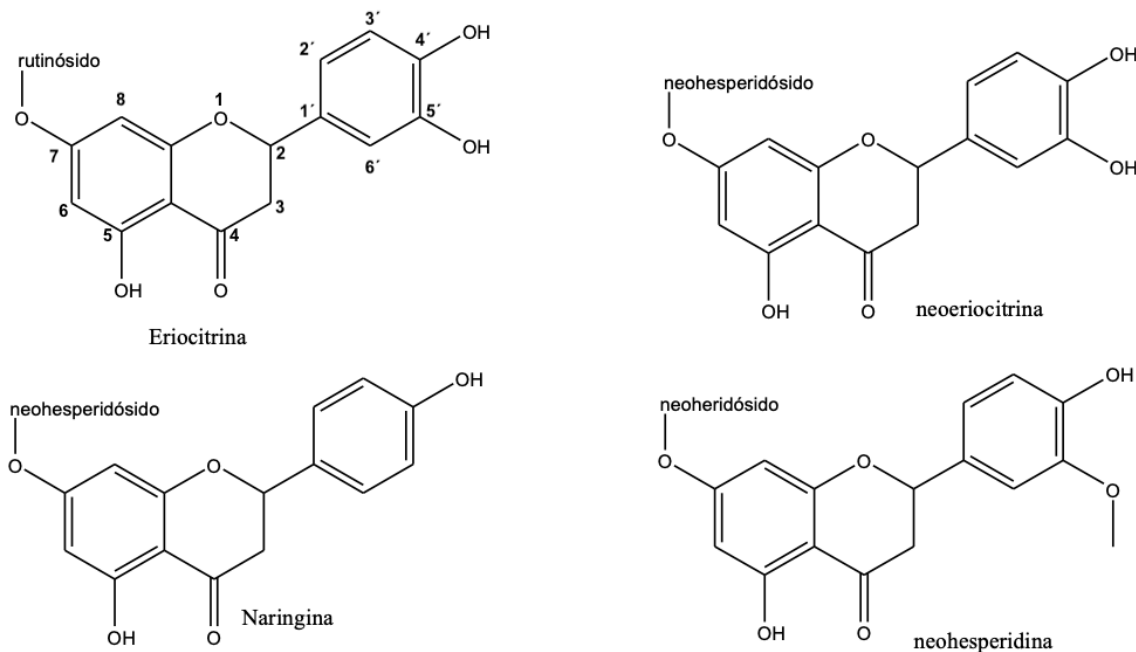


Figura 21 Flavanonas presentes en *C. paradisi*

Los flavonoides presentes en la toronja son las flavonas, en las que se pueden establecer algunas características que los diferencian, como el tipo de carbohidratos a los que están unidos en el carbono 7. Con respecto a la aglicona, el anillo B presenta un patrón de hidroxilación en el carbono 4' (naringina) o 3' y 4' como en eriocitrina y neoeriocitrina y en la neohesperidina que presenta un grupo metoxilo en la posición 3' y 4'-hidroxilo. La característica en común de este grupo de flavonoides está en el anillo C; los carbonos 2 y 3 son saturados y un grupo carbonilo en C-4.

De acuerdo con Magalhães y cols. (2012), el ensayo colorimétrico se basa en la formación de complejos coloridos entre Al (III) y los grupos carbonilo e hidroxilo de los flavonoides en medio alcalino.

El análisis de resultados se basará en los elementos anteriormente expuestos y algunos otros que sea necesario mencionar. En la figura 22 se presentan los espectros de absorción de tres sistemas con naringina, naringina con nitrito de sodio y medio básico, y naringina con nitrito de sodio, nitrato de aluminio e hidróxido de sodio. En la tabla 8 se muestran los valores de las longitudes de onda máximas y absorbancia para cada banda identificada en el espectro.

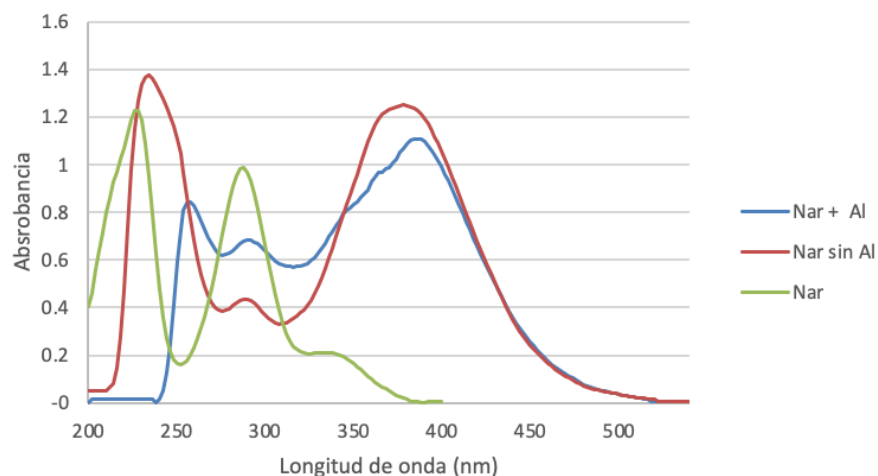


Figura 22 Espectro UV-Vis de naringina a diferentes condiciones

Tabla 8 Valores de longitud de onda máxima de las bandas de absorción de naringina en las diferentes condiciones experimentales

Sistema	Transición $\pi \rightarrow \pi^*$ permitida λ máx.	Transición $\pi \rightarrow \pi^*$ prohibida λ máx. Banda II	Transición $n \rightarrow \pi^*$ λ máx. Banda I
Naringina	228	288	334
Naringina sin Al	234	288	378
Naringina con Al	258	292	384

Primero se realizará un análisis de los espectros de absorción buscando una relación con la estructura de la flavanona naringina. Primero se debe establecer que la molécula de naringina no es plana, existe conjugación, pero está limitada por los carbonos 2 y 3, que son saturados. Se puede observar en el espectro de naringina 2 bandas de absorción intensas y una de menor intensidad. La primera banda de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de 228 nm se asigna al anillo B. Después la banda II en 288, de la porción C6-C1 asociada al anillo A. Por último, la banda I que corresponde a la porción C6-C3 que incluye al anillo B la longitud de onda experimental es de 334 nm.

Cuando al estándar de naringina se le adiciona nitrito de sodio e hidróxido de sodio se observa en el espectro de absorción UV-Vis lo siguiente: hay un desplazamiento batocrómico de la banda de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de 228 a 234 nm y de la banda de cinamoilo (banda I) de 334 a 378 nm (desplazamiento batocrómico), la banda II tiene la misma longitud de onda, pero con una disminución considerable en la intensidad (desplazamiento hipocrómico). Las razones de estos cambios podrían ser ocasionadas por:

- Las disoluciones de naringina en valores de pH alcalinos produce desplazamientos batocrómicos instantáneos en los espectros de flavonoides, en los que aparecen bandas a 245 y 365 debido a la pérdida de protones de los grupos hidroxilo fenólicos de la estructura de la flavanona en su forma aniónica.
- El desplazamiento al rojo de la banda I de la naringina puede estar asociado a la desprotonación del 4'-OH.

En la figura 23 se muestran las especies formadas en el equilibrio a diferentes valores de pH, que van desde la pérdida de protones de los grupos hidroxilo hasta la reacción de apertura del anillo C. generalmente la apertura de este anillo se produce a concentraciones altas de base y produce una banda alrededor de 430 nm. En los resultados experimentales esta banda no se presenta por lo que queda descartada la apertura del anillo, pero si existe la posibilidad de la forma FI²⁻ (González, Nazareno, & Borsarelli, 2002).

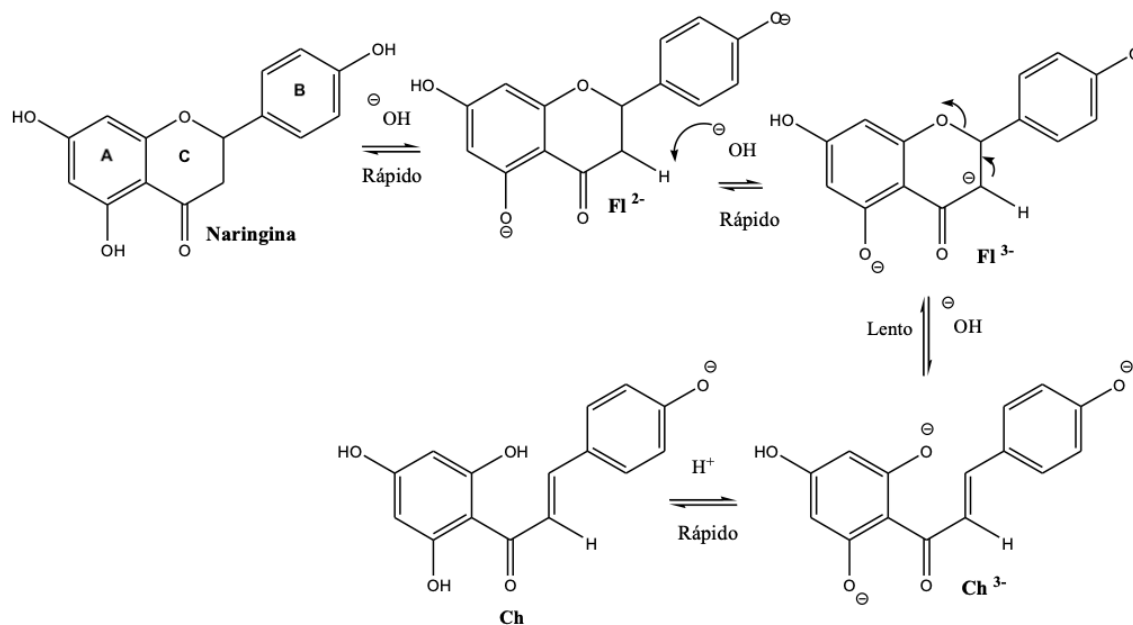


Figura 22 Isomerización de flavanona-chalcona de la naringina en medio básico
 Nota: Imágenes obtenidas de González, Nazareno & Borsarelli (2002)

Para corroborar la existencia de la especie FI²⁻ se hizo una estimación de los valores de longitud de onda máxima utilizando las reglas de Woodward-Fieser. En la figura 23 se puede observar que para la banda del anillo B hay un buen acercamiento $\lambda_{\text{máx}}$.
 $\lambda_{\text{máx}}$. estimada: 237.5 nm y $\lambda_{\text{máx}}$. experimental 234 nm.

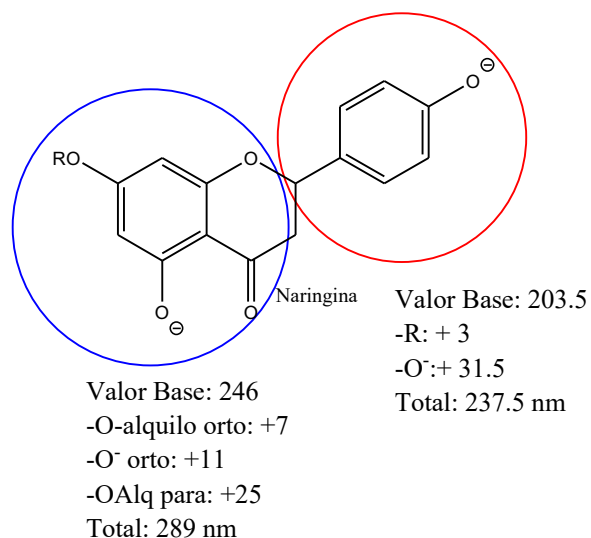


Figura 23 Cálculo de λ máx. de las dos porciones aromáticas de naringina

Por otro lado, para justificar el desplazamiento batocrómico de la banda 1 se consideran las condiciones del medio de reacción; el pH básico favorece la forma básica del flavonoide y su oxidación a quinona. El nitrito de sodio, un agente oxidante suave también podría contribuir a la oxidación del flavonoide. Se propone la oxidación del anillo B con formación de un sistema quinoide, para sustentar esta propuesta se hace una estimación de la longitud de onda máxima utilizando las reglas de Woodward-Fieser (figura 24). El cálculo teórico dio por resultado 377 nm y está muy próximo al valor experimental de 378 nm.

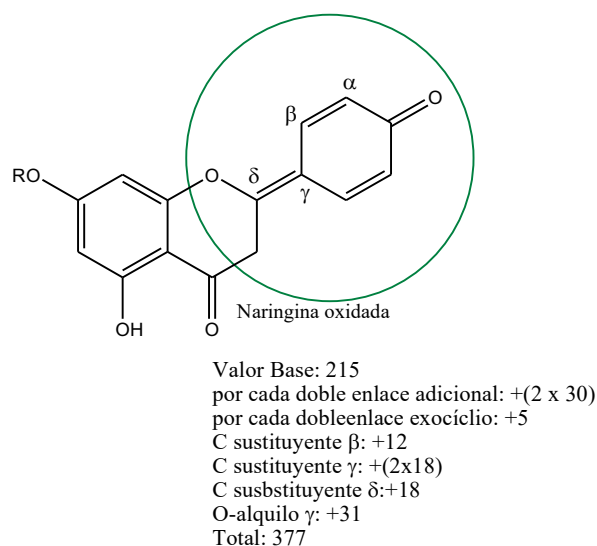


Figura 24 Estimación de la λ máx. del sistema quinoide

En el caso del sistema con nitrito de sodio, hidróxido de sodio y nitrato de aluminio primero se considerarán algunos conceptos. Las funciones oxigenadas presentes en la estructura del flavonoide son sitios de interacción con iones metálicos que pueden conducir a la formación de compuestos de coordinación. En general, los flavonoides poseen tres sitios quelantes de metales: los grupos 3-hidroxi-4-cetona en el anillo C (coordinación tipo maltol); el grupo 5-hidroxi en el anillo A y el grupo 4-carbonilo del anillo C (coordinación tipo acetilcetona) y los grupos 3',4'-dihidroxi ubicados en el anillo B (coordinación tipo catecol) (figura 25).

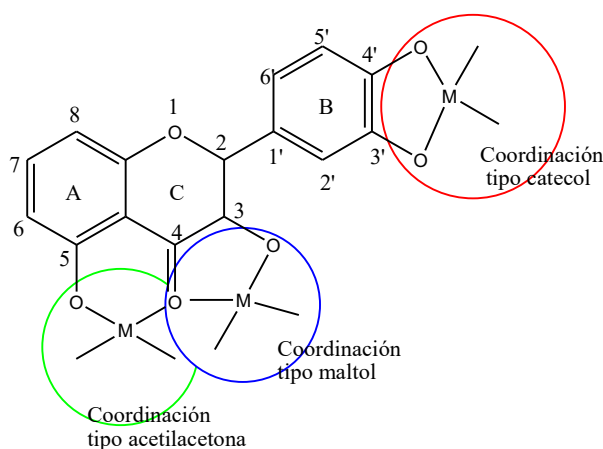


Figura 25 Modos posibles de coordinación de los flavonoides
Nota: Adaptado de Uivarosi y cols. (2019)

De acuerdo con la estructura de la naringenina solo hay un sitio de coordinación con metales, la de tipo acetilacetona. Las estequiometrías más comunes de los complejos de iones metálicos flavonoides son 1:1 1:2 y 2:1. Con esta información se propone que la naringenina puede formar un compuesto de coordinación como el de la figura 26, explicando el desplazamiento batocrómico de las bandas del espectro de absorción con una longitud de onda máxima en 258, 292 y 384 nm y que el aluminio está influyendo en las diferencias; es indiscutible que se necesitan más experimentos para confirmar lo antes expuesto, por lo que únicamente se debe considerar como una propuesta.

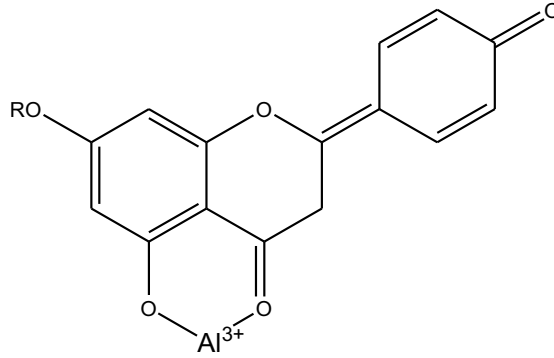


Figura 26 Propuesta de compuesto de coordinación de naringina y aluminio


La coloración que presenta la reacción con aluminio, de acuerdo con el sistema RGB es rojo 246, verde 199, azul 0 y 55% de transparencia().



Figura 27 Color presentado con Nar en condiciones de la reacción de Al

En el caso del extracto se presentan los valores obtenidos experimentalmente en la tabla 9 y los espectros de la figura 28.

Tabla 9 Valores de λ máx. del espectro UV-Vis extracto y naringina de la reacción con aluminio

Sistema	Transición $\pi \rightarrow \pi^*$ permitida λ máx.	Transición $\pi \rightarrow \pi^*$ prohibida λ máx. Banda II	Transición $n \rightarrow \pi^*$ λ máx. Banda I	Banda la
Naringina	228	288	334	-
Extracto sin aluminio	224	286	342	392
Extracto con aluminio	260	284	~338	390
Naringina con Al	258	292	~384	

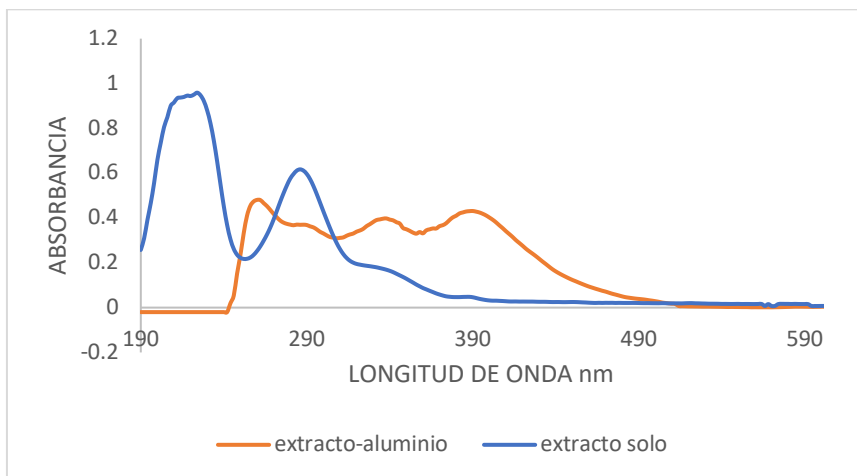


Figura 28 Espectros de absorción UV-Vis de los extractos

El espectro del extracto solo, es muy similar al de la naringina estándar, las diferencias en las longitudes de onda podrían deberse a la interacción de la naringina con otro componente del extracto, y en el caso del extracto con aluminio, también se comporta de manera similar al de la naringina con aluminio.

Cinética de reacción.

La cinética de reacción se midió con la solución de naringina a una concentración de 3.44×10^{-4} mol/mL y se seleccionó la banda 1 correspondiente al cinamoilo a 380 nm hasta un tiempo de 180 min.

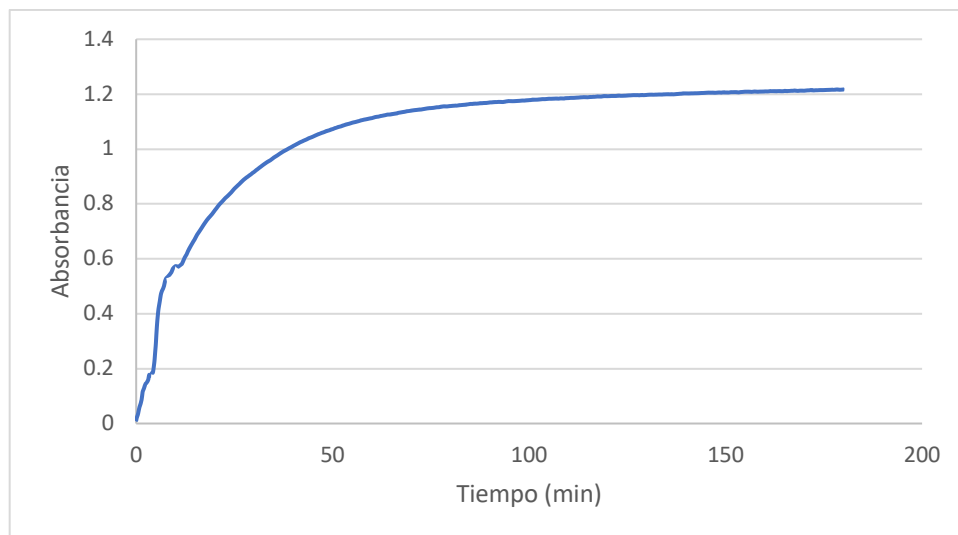


Figura 29 Cinética de reacción del complejo naringina Al (III)

La cinética de reacción de la figura 29, muestra que a un tiempo de 100 min (1h 40 min) permanece una absorbancia constante y la reacción ha llegado a un equilibrio.

Curva de calibración

El espectro de absorción de cada una de las disoluciones a diferentes concentraciones se muestra en la figura 30.

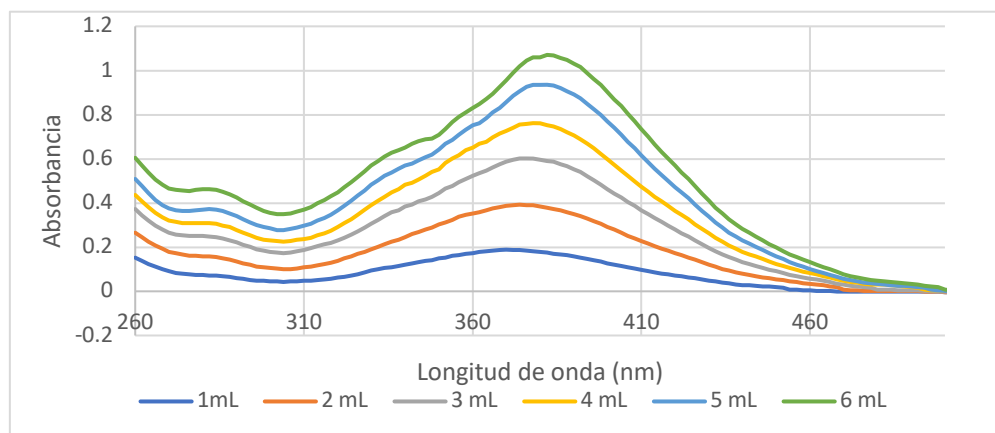


Figura 30 Espectro de absorción de las disoluciones a diferentes concentraciones del complejo Nar-Al

La curva de calibración se construyó con los valores de absorbancia a una longitud de onda de 374 nm.

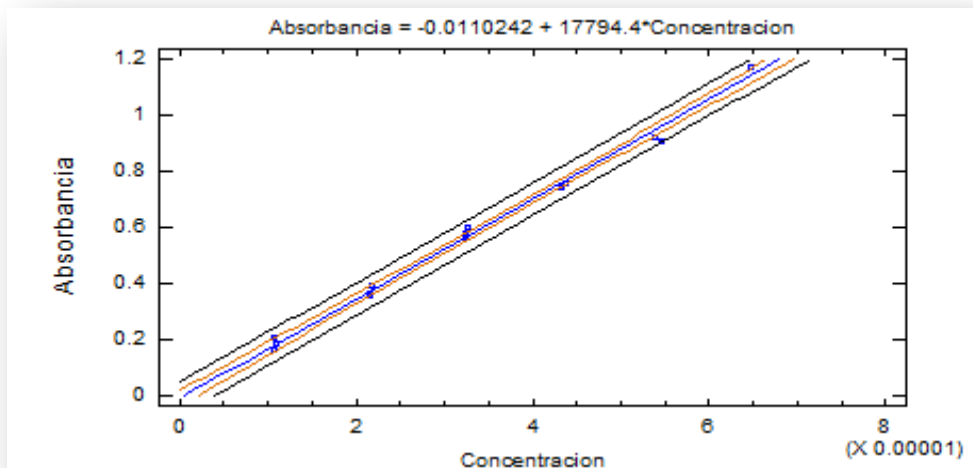


Figura 31 Curva de calibración del complejo Nar-Al

La curva de calibración de naringina cumple con los valores de los parámetros de la linealidad y se observa que cumple con los requisitos (tabla 11).

Tabla 11 Parámetros de linealidad de la curva de calibración de naringina-aluminio

Parámetros	Valor obtenido	Criterio de Aceptación	Observación
R^2	0.9945	$R^2 \geq 0.98$	Sí cumple
IC	18285.9314- 17111.9454	IC No debe incluir a cero	Sí cumple

En la figura 32 se muestra la gráfica de residuales y se observan sin tendencia ni puntos anómalos por lo que el modelo de regresión es homocedástico que implica que la varianza de los errores de estimación es constante.

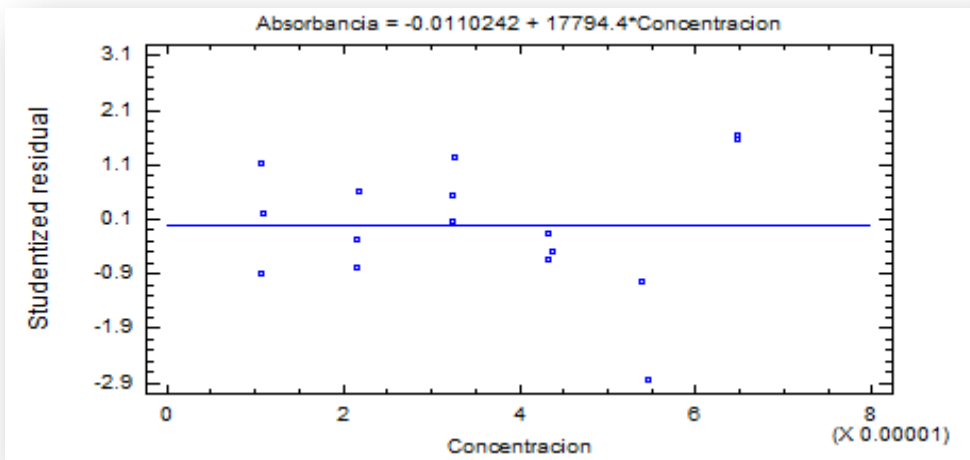


Figura 32 Gráfica de residuales de la Curva de calibración del complejo Nar-Al

Extracto

En la figura 33 se muestra el espectro de absorción del extracto etanol-agua de toronja en las condiciones de reacción de la formación de compuestos de coordinación con aluminio, en el que se observan las bandas correspondientes a la transición $n \rightarrow \pi^*$.

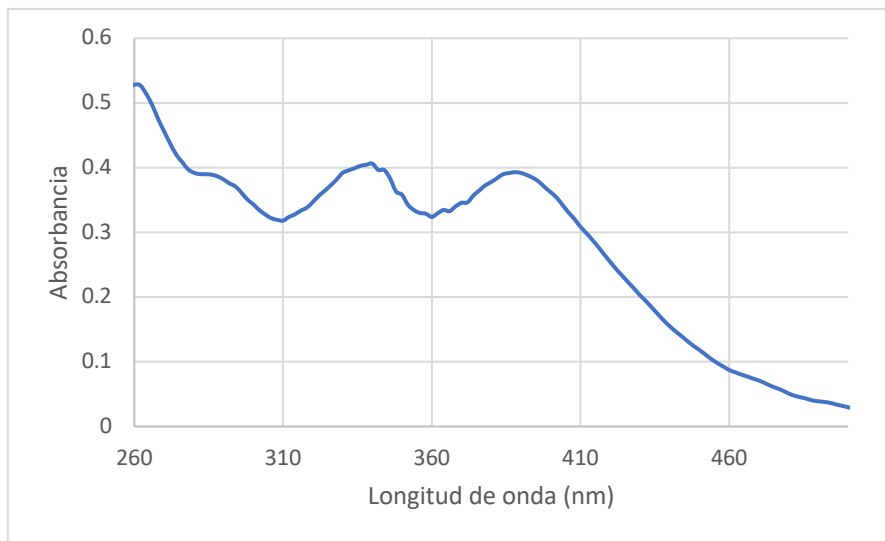


Figura 33 Espectro de absorción del extracto vegetal-Al

El valor promedio de absorbancia 0.41 se interpoló en la curva de calibración y dio por resultado una cantidad de 29.93 mg de naringina por gramo de albedo de toronja, con una desviación estándar de 1.7556.

Reacción de Shinoda

La reacción de Shinoda de la cianidina es una reacción compleja para detectar la presencia de flavonas, flavonoles y flavanonas en extractos vegetales. La reducción de flavonoide se puede realizar con magnesio o con magnesio amalgamado con mercurio en medio ácido, generalmente ácido clorhídrico alcohólico. La reacción transcurre con una vigorosa emisión de hidrógeno, seguida de la aparición de tonos de color rojo brillante. La reducción también se puede realizar con sodio amalgamado en solución alcohólica y después acidificar para producir la sal de pirilio coloreada. Shinoda determinó que el número de hidroxilos en la estructura del flavonoide determinará la naturaleza del color formado, en ausencia, color amarillo y con un número creciente de tonos rojos más profundos. El uso de agentes reductores ácidos y alcalinos difiere entre flavonas flavonoles y flavanonas. Las flavanonas producen sales de pirilio rojo mediante reducción por ambos métodos (magnesio y ácido clorhídrico y amalgama de sodio). Los flavonoles responden a la reducción en medio ácido solamente y las flavonas producen una reacción de color solo con el agente reductor alcalino, la amalgama de sodio. En el caso de las isoflavonas y flavonas solo se reducen con amalgama de sodio, y no con magnesio y ácido clorhídrico, para formar productos de color rojo. Parece que no hay una gran diferencia entre flavonas, flavanonas y flavonoles; sin embargo, debe considerarse que los 2 primeros grupos carecen de un hidroxilo en la posición 3 y no cambian fácilmente a pseudo bases¹, por lo tanto, no requieren una alta concentración de ácido, mientras que al realizar la prueba para flavonoles se debe agregar una cantidad suficiente de ácido antes de ver el color.

¹ Pseudo base: compuesto que, aunque no contiene por sí mismo ion hidroxilo básico, es capaz de isomerizarse en una base verdadera que contiene ion hidroxilo.

Cuando se utiliza magnesio y ácido clorhídrico en una disolución alcohólica de flavanonas producirá los siguientes resultados: naringina, sora brillante; naringenina y hesperidina, rosa rojizo; butrina, rosa marrón; butina, violeta azulado. (Rangaswami & Seshadri, 1942)

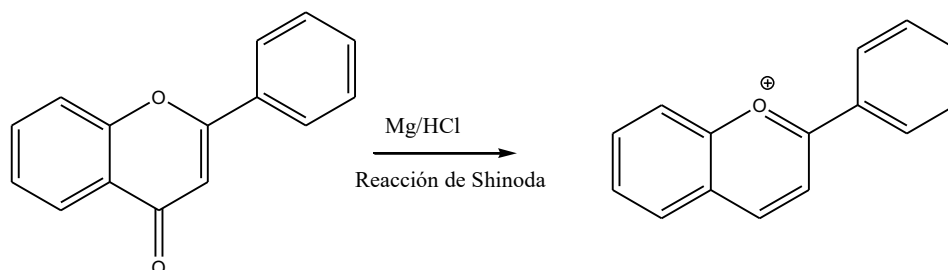



Figura 34 Posible Reacción general de Shinoda.

Con los elementos antes mencionados se realizará el análisis de los resultados obtenidos. La reacción de Shinoda realizada en las disoluciones de naringina produjo un color rosa brillante, sistema RGB rojo 23; verde 69; azul 130 ().

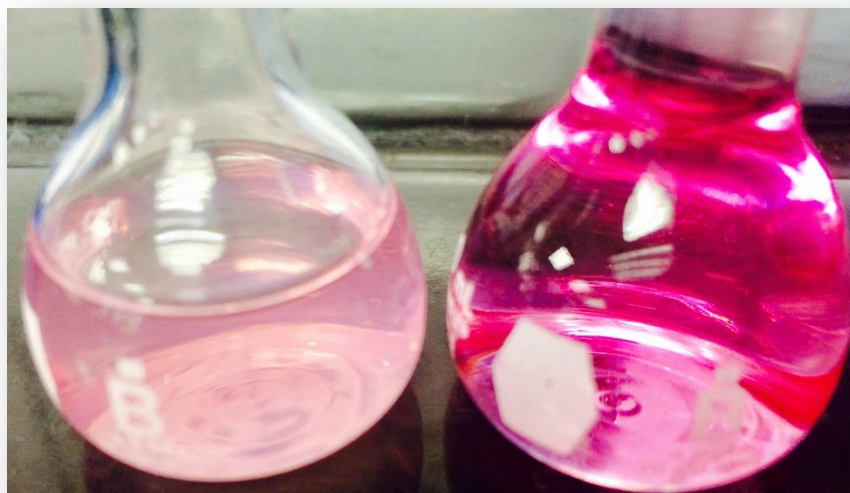


Figura 35 Color producido por la naringenina en la reacción de Shinoda

En la figura 36 se muestran los espectros de absorción de la disolución de naringina y de la reacción de Shinoda en 2 concentraciones de naringina para poder apreciar la banda en alrededor de los 550 nm.

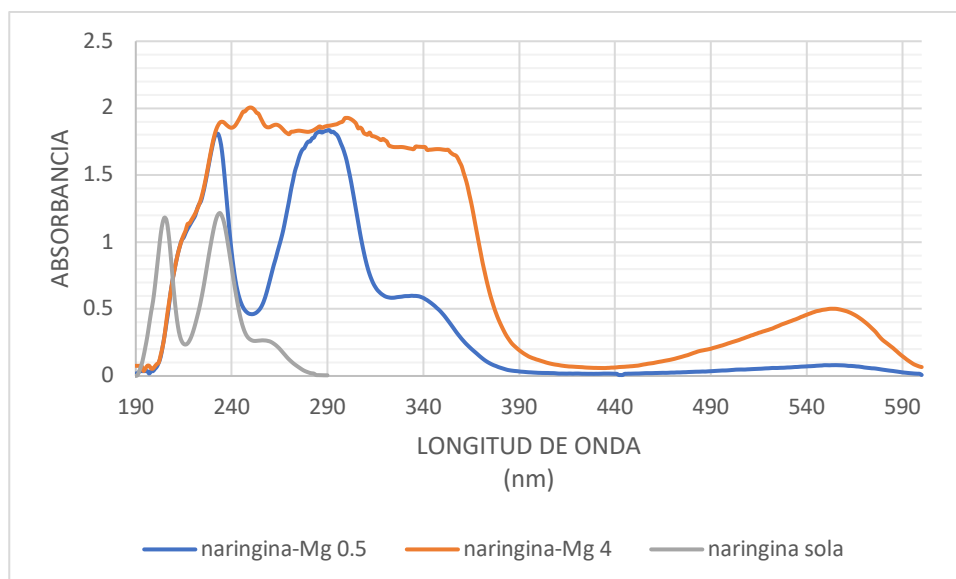


Figura 36 Espectros de absorción de naringina y naringina-magnesio en las condiciones de la reacción de Shinoda

En el espectro de naringina se observan 2 bandas perfectamente diferenciadas y una de menor intensidad. La banda con una longitud de onda de 228 nm pertenece al anillo B, le sigue la banda (II) con una longitud de onda de 288 nm que se asigna al anillo A y parte del C (benzoilo) y por último la banda en 332 nm correspondiente al anillo B y parte del C.

Tabla 10 Longitudes de onda de las bandas del espectro de absorción UV-Vis en diferentes condiciones

Sistema	Transición $\pi \rightarrow \pi^*$ permitida λ máx. (nm)	Transición $\pi \rightarrow \pi^*$ prohibida λ máx. Banda II (nm)	Transición $n \rightarrow \pi^*$ λ máx. Banda I (nm)	Banda la (nm)
Naringina sola	228	288	332	-
Naringina-Mg 0.5	232	286	334	555
Naringina-Mg 4	235	286	328	553

En la figura 37 se estimaron las longitudes de onda correspondientes a cada región de la naringina. Estos datos solo son una aproximación a los datos obtenidos experimentalmente y además se hace la propuesta entre la estructura cíclica y la estructura abierta, en donde los valores estimados se acercan más a los valores experimentales y se hace más evidentes las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$.

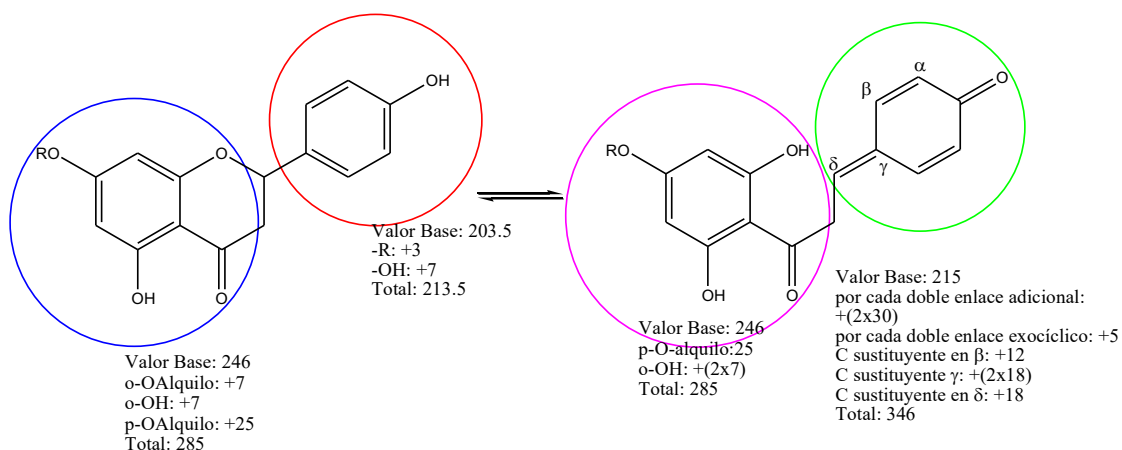


Figura 37 Estimación de la longitud de onda máxima de las bandas de naringina

Nota: Los valores de tablas se obtuvieron de Pretsch, Bülmann & Badertscher (2009)

Por otra parte, en el caso de la reacción de Shinoda en la que Rangaswmi y Seshardi (1992) proponen la formación de una cianidina, cuyas bandas de absorción características aparecen en la región ultravioleta y visible. La banda II con valores alrededor de 260-280 nm y otra en la región visible alrededor de 490-550 nm (Demir, y otros, 2015). En la figura 38 se muestran las estructuras que justifican las longitudes de onda obtenidas.

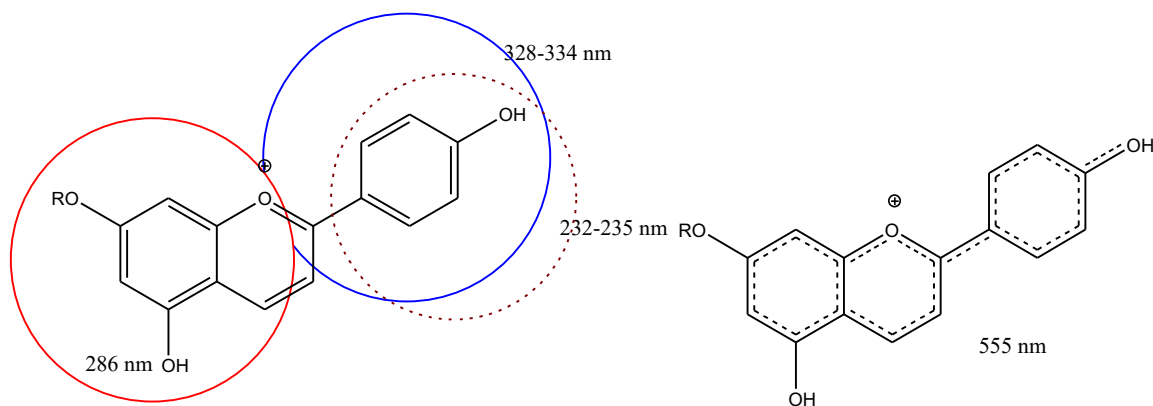


Figura 38 Estructuras y longitudes de onda experimentales de la reacción de cianidina

Mecanismo de reacción

El mecanismo real de reacción no se conoce con certeza, algunas fuentes mencionan que la formación del complejo no es viable y que en realidad solo se lleva a cabo una reacción de reducción (fig. 39) transformando los flavonoides en su correspondiente antocianina (glucósido) o su antocianidina (aglicona). (Ringuelet & Viña, 2013)

A continuación, se hace una propuesta de mecanismo de reacción para la reacción de Shinoda con naringina.

En la reacción de Shinoda, la naringina se transforma a la cianidina a través de reacciones oxido reducción. En la figura 39 se observa que el carbono 2 y 3 pierde hidrógeno (reacción de oxidación) y el carbono 4 se reduce. Estas reacciones conducen a la aromatización del anillo C.

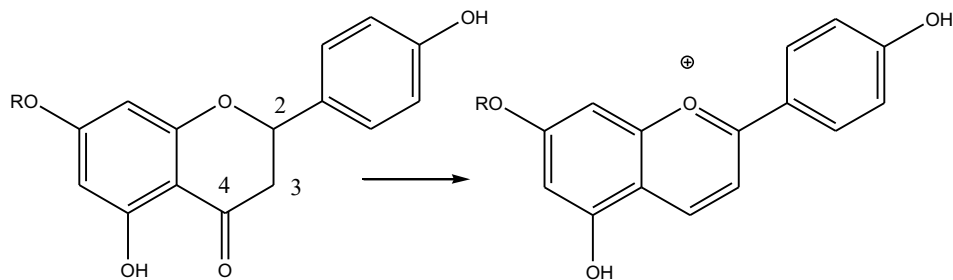
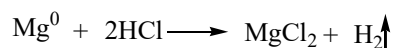


Figura 39 Oxidación reducción de naringina

En el primer paso el magnesio reacciona con el ácido clorhídrico produciendo calor e hidrógeno que se libera en forma de burbujas.



El cloruro de magnesio actúa como ácido de Lewis y se une al grupo carbonilo C-4.

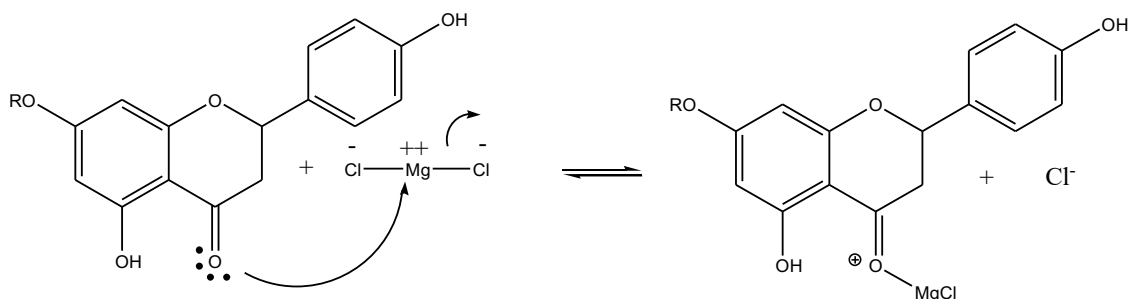


Figura 40 Reacción ácido Lewis-base Lewis entre naringina y cloruro de magnesio

La reacción de eliminación que se muestra en la figura 41 es favorecida por la formación de un sistema conjugado entre el anillo A y C.

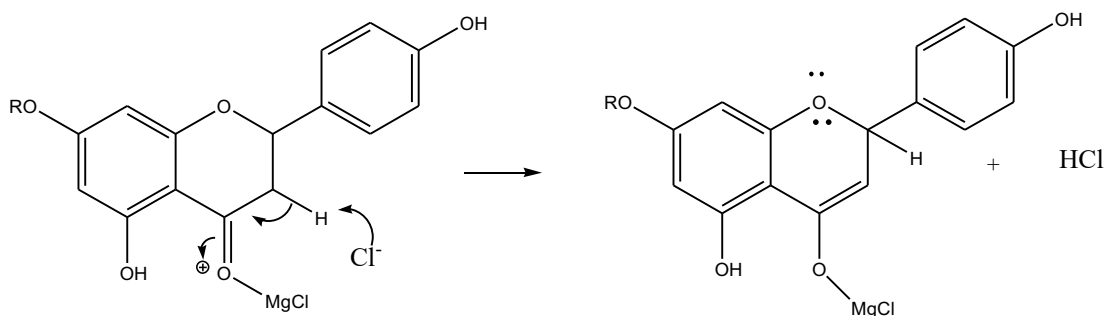


Figura 41 Reacción de eliminación en C-3 y C-4

En el producto de la reacción anterior el hidrógeno del carbono 2 aumenta su acidez por estar en la posición alílica y bencílica, formación del doble enlace entre C-2 y C-3 y reducción del C-4.

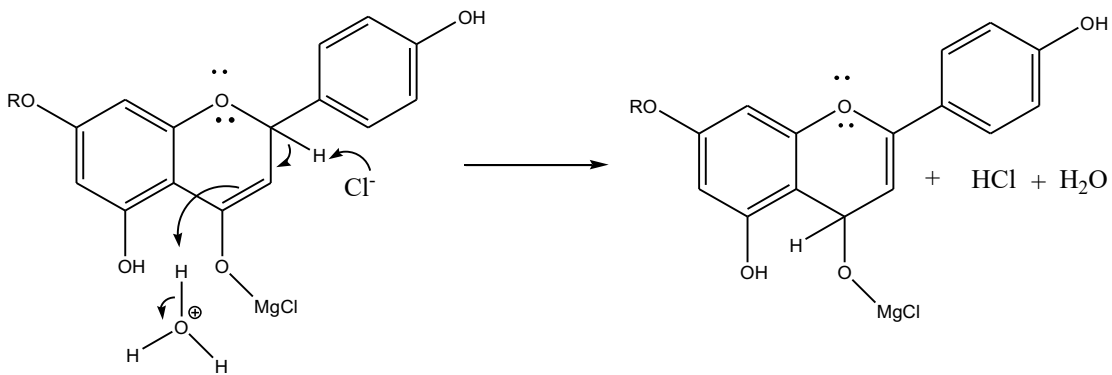


Figura 42 Eliminación del hidrógeno ácido en C-2

Para facilitar la aromatización del anillo C y por el medio ácido se propone un equilibrio ácido-base.

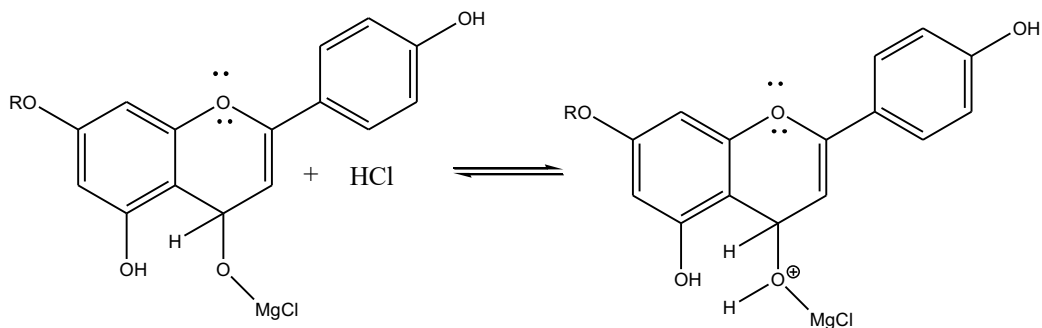


Figura 43 Reacción ácido-base

La aromatización del anillo C y formación de la cianidina se produce desde uno de los pares de electrones libres del oxígeno.

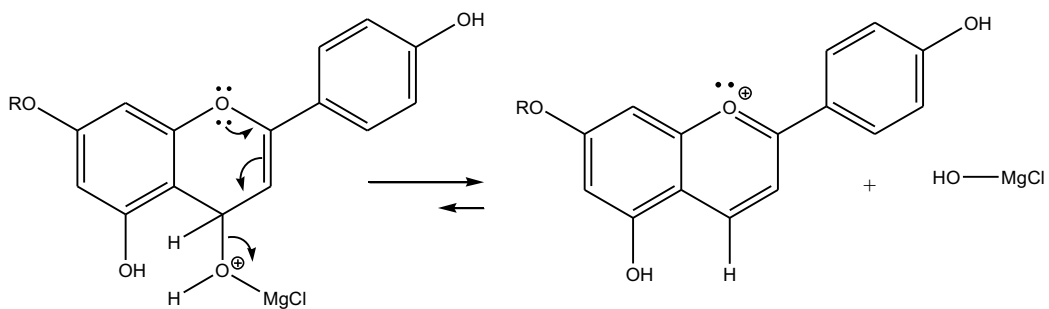
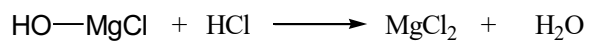


Figura 44 Aromatización del anillo C para formar la cianidina

El mecanismo de reacción finaliza con la descomposición del compuesto inorgánico y regeneración del cloruro de magnesio, por lo que la reacción se lleva a cabo mediante una catálisis ácida.



Cinética de reacción.

La gráfica de la cinética de reacción se muestra en la figura 45 y se observa que la reacción tarda en completarse en 110 min.

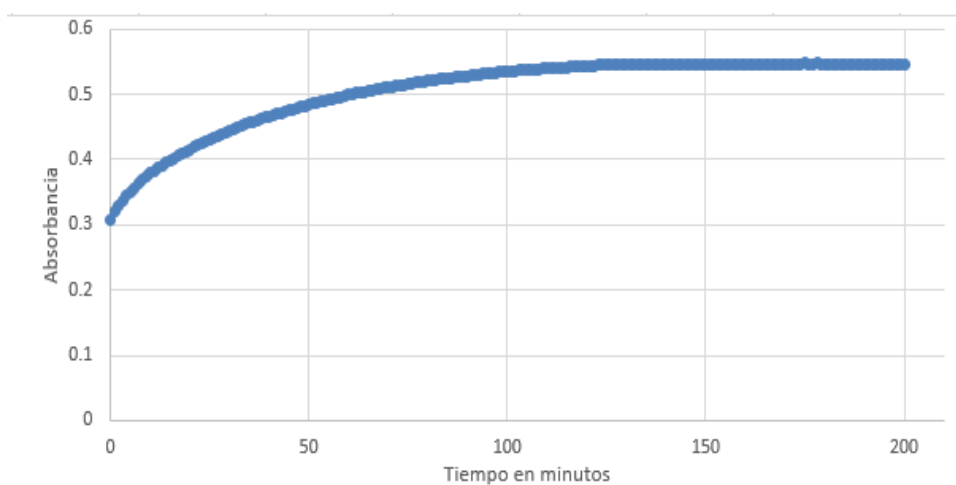


Figura 45 Cinética de la Reacción de Shinoda

Curva de calibración.

Los espectros de absorción de las diferentes concentraciones de naringina se muestran en la figura 46 y se observa como la absorbancia aumenta con cada aumento en la concentración de naringina.

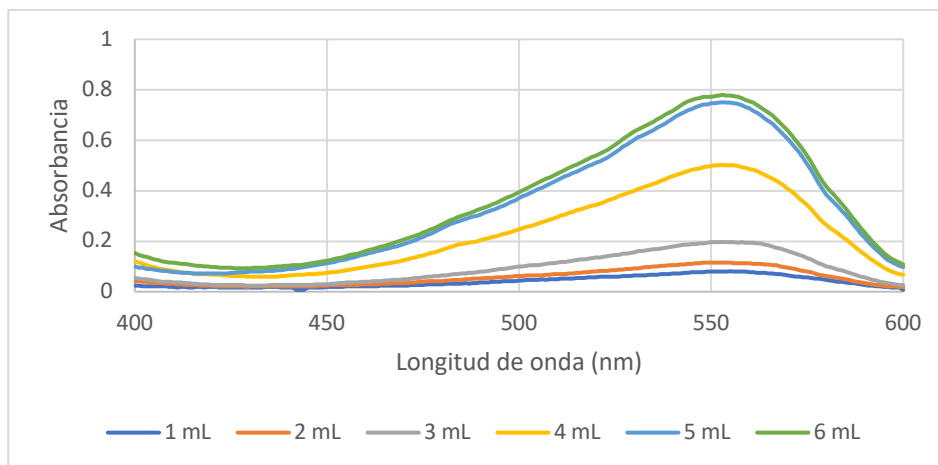


Figura 46 Espectros de absorción de cada concentración de naringina en condiciones de Shinoda

La curva de calibración se construyó con los valores de absorbancia de cada concentración a una longitud de 553 nm, correspondiente a la esperada para la antocianina. Cada concentración se preparó por triplicado.

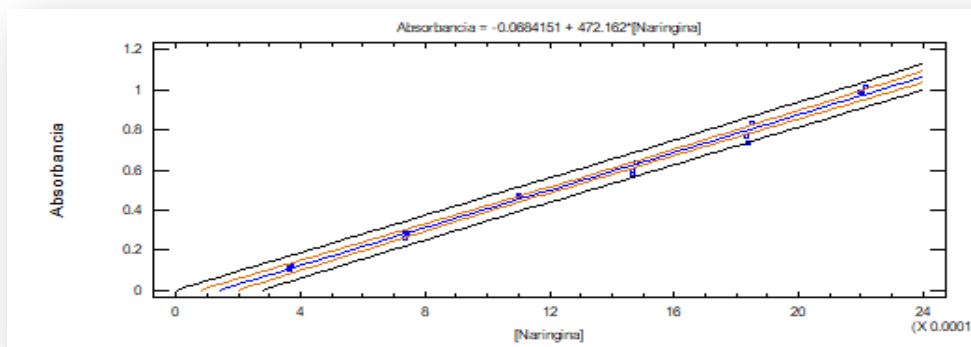


Figura 47 Curva de calibración de naringina en las condiciones de la reacción de Shinoda

La curva de calibración de naringina cumple con los valores de los parámetros de linealidad y se observe que cumple con los requisitos (tabla 11).

Tabla 11 Parámetros de linealidad de la curva de calibración de naringina en las condiciones de Shinoda

Parámetros	Valor obtenido	Criterio de Aceptación	Observación
R²	0.9927	R ² ≥ 0.98	Sí cumple
IC	484.5821- 440.3712	IC No debe incluir a cero	Sí cumple

En la gráfica de residuales (figura 48) se observan los puntos sin tendencia y sin puntos anómalos por lo que el modelo de regresión lineal es homocedástico que implica que la varianza de los errores de estimación es constante a lo largo del tiempo y se puede utilizar para los fines estipulados.

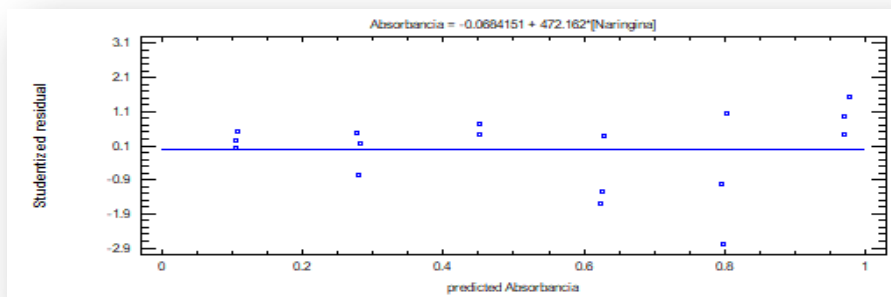


Figura 48 Gráfica de residuales de la reacción de Shinoda

Extracto

En la figura 49 se muestra el espectro de absorción del extracto vegetal en las condiciones de la reacción de Shinoda, observándose la banda correspondiente a la formación de la cianidina.

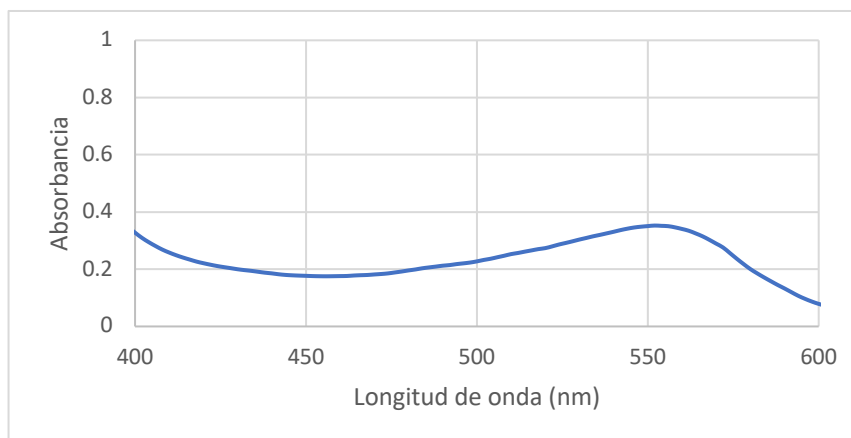


Figura 49 Espectro de absorción del extracto vegetal en las condiciones de la reacción de Shinoda

El valor promedio de absorbancia de 0.3361 se interpoló en la curva de calibración y dio por resultado una cantidad de 24.86 mg de naringina por gramo de albedo de toronja, con una desviación estándar de 1.8175.

Electroforesis Capilar (EC)

La naringina es un polifenol con propiedades ácido-base por la presencia de grupos hidroxilos unidos a los anillos aromáticos en los carbonos 5 y 4'. Esta propiedad hace posible que sean analizados por la técnica de electroforesis capilar de zona (ECZ).

Para la selección de electrolito soporte se consideraron las propiedades ácido-base del analito. El pH básico favorece la formación de la base conjugada (pK_a 8.58), por lo que el electrolito soporte deberá estar a un pH alcalino que asegure su ionización. El electrolito soporte que reunió estos requisitos fue una solución buffer de boratos a una concentración 20 mM y pH 9.41.

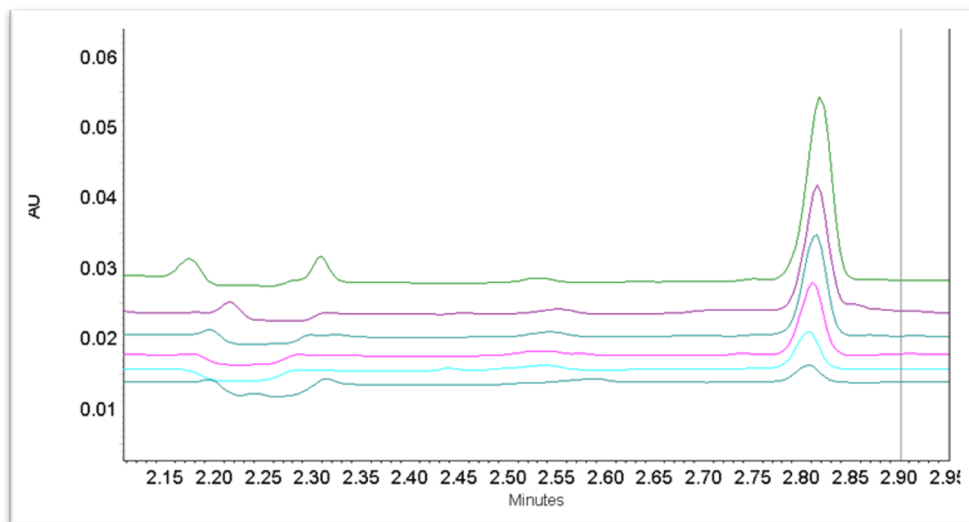


Figura 50 Espectro de absorción de la curva de calibración de EC a concentraciones crecientes.

Los valores de absorbancia de cada concentración a una longitud de onda de 200 nm se graficaron obteniéndose la curva de calibración correspondiente (figura 51).

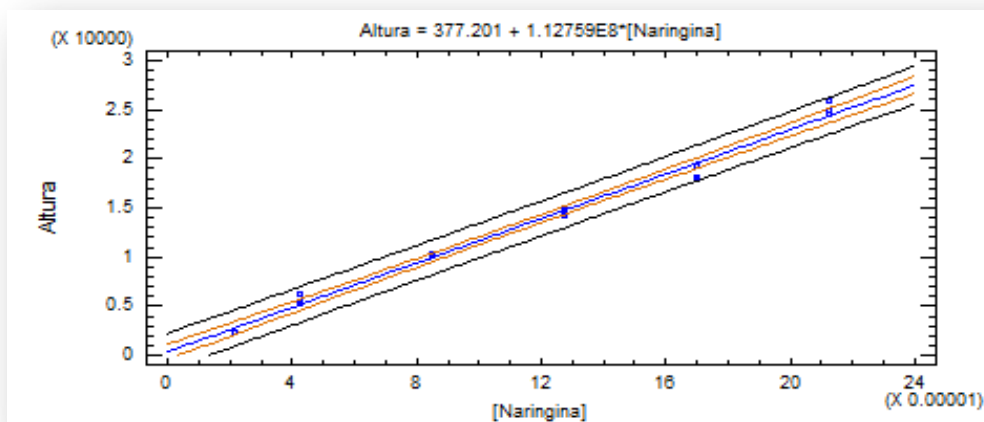


Figura 51 Curva de calibración de naringina por Electroforesis Capilar

La curva de calibración de naringina cumple con los valores de los parámetros de linealidad y se observa que cumple con los requisitos (tabla 12).

Tabla 12 Parámetros de linealidad de la curva de calibración de naringina por electroforesis capilar

Parámetros	Valor obtenido	Criterio de Aceptación	Observación
R^2	0.99	$R^2 \geq 0.98$	Sí cumple
IC	118729866-106787183.1	IC No debe incluir a cero	Sí cumple

En la gráfica de residuales (figura 52) no se observan puntos anómalos y sin tendencia por lo que el modelo de regresión lineal es homocedástico que implica que la varianza de los errores de estimación es constante a lo largo del tiempo y se puede utilizar para los fines estipulados.

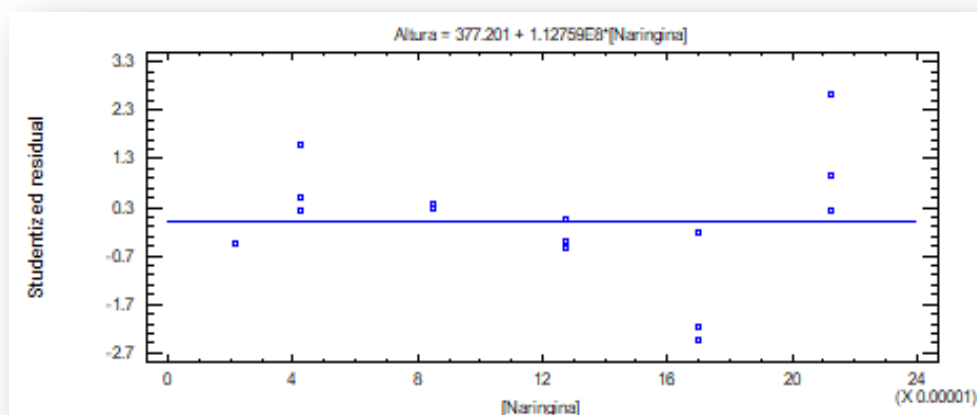


Figura 51 Gráfica de residuales de la curva de calibración de naringina por EC

Extracto

El extracto vegetal se midió en las condiciones anteriormente descritas y se obtuvo el electroferograma mostrado en la figura 53, confirmándose la presencia de naringina.

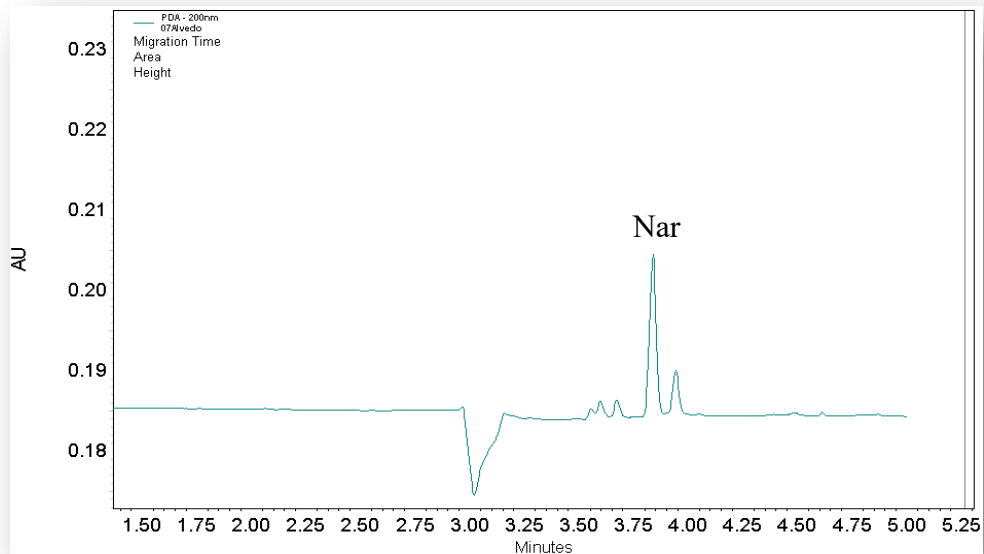


Figura 53 Electroferograma del extracto vegetal que confirma la presencia de naringina

El valor de absorbancia (altura) 19877 se interpoló en la curva de calibración y se obtuvo un valor de 56.65 mg de naringina por cada gramo de albedo con una desviación estándar de 1.1772.

Comparación de Métodos desarrollados

En la Tabla 13 se muestran las ecuaciones obtenidas de las curvas de calibración para la determinación de Nar por el método de Electroforesis Capilar (EC) y por los 3 métodos espectrofotométricos.

Tabla 13 Resumen de las características de los métodos para la determinación de Nar

Método	Ecuación	Comentarios
EC	$\text{Altura}=377.201+1.12759 \times 10^8 [\text{Naringina}]$	Interpolación directa del extracto
UV directo	$A = 0.1340 + 14,164.8 [\text{Naringina}]$	Interpolación directa del extracto
Shinoda	$A = -0.0684 + 472.1 [\text{Naringina}]$	Formación de producto colorido y espera de 110 min para completar la reacción
AI (III)	$A = -0.0110 + 17,797.4 [\text{Naringina}]$	Formación de producto colorido y espera de 100 min para completar la reacción

Para empezar la comparación entre métodos se deben especificar algunos puntos:

- En los 4 métodos, la concentración de Nar es molar.
- En los métodos UV directo, Shinoda y AI (III), la propiedad medida proporcional a la concentración es la absorbancia.
- Por último, en el caso de la electroforesis capilar la concentración es proporcional a la altura del pico.

Por lo anteriormente dicho, es posible comparar la sensibilidad entre los métodos UV directo, Shinoda y AI (III), analizando el valor de las pendientes. Ordenando los métodos desde el más al menos sensible y quedaría:

AI (III) > UV-Vis directo > Shinoda.

Esto quiere decir que, si se desea determinar bajas concentraciones de Nar (trazas) es mejor utilizar el método de AI(III) y contrariamente, si el contenido es muy alto se recomienda utilizar el de UV directo. Este método se caracteriza por ser rápido, económico y fácil ya que solo se necesita interpolar en la curva de calibración el valor de absorbancia de la muestra sin tratamiento para determinar la concentración. Entonces, el método menos sensible es el de Shinoda. Sin embargo, estos 3 métodos espectrofotométricos no son selectivos, ya que, si se quiere incrementar la selectividad, ésta dependerá del tratamiento previo que se dé al extracto para refinarlo.

Entonces estos métodos medirán no solo a naringina sino a aquellos flavonoides que tengan un comportamiento similar.

Por otro lado, los resultados provenientes de la cuantificación por medio de la técnica de 1) EC (electroforesis capilar) son muy sensibles y selectivos ya que, al ser una técnica de separación, no hay traslapamiento de señales con otros flavonoides minoritarios. Sin embargo, la electroforesis capilar es una técnica que no está al alcance de muchos laboratorios, por el costo del equipo. Por lo anteriormente expuesto, no importa si un laboratorio no tiene los recursos económicos para utilizar el método por electroforesis capilar ya que los métodos espectrofotométricos desarrollados serán favorables para la determinación de naringina en toronja, por ser el flavonoide mayoritario. En el caso de que surja la necesidad de analizar otras muestras que no reúnan la característica de flavonoide mayoritario, entonces se recomienda utilizar electroforesis capilar o en su defecto, reportar la determinación como flavonoides totales utilizando de preferencia los métodos de Shinoda y aluminio.

En lo que respecta a los tiempos de migración se obtuvieron %RSD < 2% (Tabla 14) y de acuerdo a los criterios de aceptación (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C., 2002) podemos afirmar que el método es preciso en el caso de los tiempos de migración.

Tabla 14 Precisión (%RSD) para tiempo de migración de Nar

Repeticiones	t_m	Desv. Est (s).	%RSD
1	3.837		
2	3.837		
3	3.858		
4	3.858		
5	3.859		
6	3.865		
Promedio (\bar{x})	3.852	0.0121	0.3167

Tabla 15 Resultados de las concentraciones de polifenoles en el extracto de albedo en las diferentes condiciones de trabajo

Método	mg / 1 g Albedo	S	%RSD
EC			
1	57.43805		
2	55.2927		
3	57.2055		
Promedio (x)	56.6454	1.1772	2.0782
UV-Directo			
1	76.3482		
2	75.8564		
3	80.2315		
Promedio (x)	77.4787	2.3966	3.0932
Shinoda			
1	25.8822		
2	25.9437		
3	22.7654		
Promedio (x)	24.8638	1.8175	7.3098
Aluminio			
1	30.0168		
2	31.6236		
3	28.1164		
Promedio (x)	29.9190	1.7556	5.8679

Con lo anterior se puede ver que las diferencias son muy grandes entre el UV-directo y los métodos (Tabla 15) 3 y 4 (Shinoda y aluminio); en el caso de los métodos de Shinoda y aluminio ambos entran en las concentraciones de polifenoles totales reportados en literatura, también se puede apreciar que los resultados de los métodos 1 y 2 (EC y UV directo). Tienen valores muy similares.

En la Tabla 16 se muestra los parámetros, su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal de la curva de electroforesis capilar. El coeficiente de determinación es mayor al 98%, por lo que los datos se ajustan al modelo lineal.

Tabla 16 Parámetros y coeficientes de la regresión

Parámetro	Valor estimado	Parámetro	Valor estimado	Coficiente	Valor
Intercepto b_0	377.201	Sb_0	364.499	Correlación (r)	0.9949
Pendiente b_1	1.13E+08	Sb_1	2.83E+06	Determinación (r^2)	0.99

En la tabla 17 se muestran los resultados del análisis ANOVA de donde se obtiene los valores de MS_{FDA} , MS_{EP} que son los cuadrados medios para las varianzas de los residuales de la carencia de ajuste y el error puro respectivamente; éstos se obtuvieron del análisis ANOVA que reporta el software Statgraphics Centurión XVI® y los respectivos grados de libertad (g.d.l.). Para un 95% de confianza ($\alpha=0.05$), se consideró que k es el número de puntos de la curva de calibración y n es el número total de corridas realizadas; de acuerdo con lo anterior, se obtuvo los grados de libertad para MS_{FDA} , MS_{EP} cuyos valores son k-2 y n-k respectivamente, de esta forma se estableció el valor de F_{tablas} . A partir de estos datos y de acuerdo con la siguiente Ec se calculó F_{exp} , lo cual se obtuvo de la siguiente Ec con el siguiente valor:

$$F_{Exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}}$$

$$F_{exp} = \frac{1.87E+06}{253590} = 7.38$$

Tabla 17 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)	F experimental
Modelo	1.05E+09	1	1.05E+09	
Residuo	1.05E+07	16	658286	
-Carencia de Ajuste	7.49E+06	4	1.87E+06	7.38
-Error	3.04E+06	12	253590	
Total (Corr.)	1.06E+09	17		

Una vez determinados los valores de F_{exp} y F_{tablas} se comparan para establecer si hay o no un ajuste al modelo de acuerdo con las siguientes pruebas de hipótesis:

$H_0 = F_{exp} < F_{tablas}$ = Hay ajuste al modelo

$H_1 = F_{exp} > F_{tablas}$ = Hay falta de ajuste al modelo

Por lo que se cumple lo siguiente:

$H_1 = F_{exp} > F_{tablas} = 7.38 > 4.13$, por lo tanto, no hay ajuste de los datos al modelo lineal. Se acepta H_1

Por último, se determinó el intervalo de confianza para la pendiente el cual resultó ser 118729866,106787183.1, éste no incluye el cero, de esta forma se aceptó el intervalo y de nuevo se ve un ajuste al modelo lineal (tabla 18).

Tabla 18 Valores de los términos utilizados para el cálculo

Termino	Valor
Σx	0.002
Σy	229335.000
Σx^2	2.98597E-07
Σy^2	3977495009
xy	34.41386803
$S_{y/x}$	811.3481217
S_{b1}	2830019.652
T_{tablas}	2.11
IC	118729866, 106787183.1

Conclusiones

Debido a las características fisicoquímicas que presenta la Naringina se desarrollaron 4 metodologías para la detección y cuantificación de Naringina en el albedo de toronja (*Citrus × paradisi*) mediante dos técnicas analíticas altamente utilizadas en laboratorios: Espectrofotometría y Electroforesis Capilar.

La implementación de dichas técnicas fue con el propósito de comparar no solamente los resultados obtenidos de la cantidad del analito en estudio sino también qué tan factible es llegar a utilizar alguno de estos métodos de manera rutinaria en diversos laboratorios.

Se encontraron las condiciones óptimas para la medición de flavonoides totales en muestras vegetales por 4 métodos: 1) EC, 2) UV directo del flavonoide, 3) Reacción de reducción del flavonoide a antocianidina (Shinoda) y 4) Complejación del flavonoide con Al (III). Sin embargo, la metodología de EC al ser una técnica de separación, aumenta considerablemente la sensibilidad y selectividad al momento de cuantificar e identificar a la naringina, por lo tanto, se pudiera considerar ésta como la mejor opción para llevar a cabo como análisis rutinario.

Bibliografía

- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C. (2002). *Guía de Validación de métodos analíticos editada por QFB de México*. Recuperado el 4 de Agosto de 2020, de https://kupdf.net/download/guia-para-validacion-de-metodos-analiticos-cnqfb-2002_59cec40608bbc58a5a686faa_pdf
- Lock Sing, O. (1997). *Colorantes Naturales*. Lima: Fondo editorial de la Pontificia universidad catolica de Peru.
- Londoño, J. S. (2019). Aprovechamiento de los subproductos cítricos.
- Chopin, M. (2012). Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de anillos. *Investigación en discapacidad*, 86-89.
- Choudhury, R., & Chowrimootoo, G. S. (1999). Interacciones de la naringenina flavonoide en el tracto gastrointestinal y la influencia de la glicosilación. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 410-415.
- Alam, M., Nusrat, S., Mahbubur, R., Shaikh, J., Hasan, M., Satyajit, D., & Sarker. (2014). Efecto de los flavonoides cítricos, la naringina y la naringenina, sobre el síndrome metabólico y sus mecanismos de acción. *Advances in nutrition an international Review*, 404-417.
- ARS. (1956). *Chemistry and technology of citrus, citrus products and byproducts*. Washington: United States Department of Agriculture.
- ASU. (junio de 2020). Obtenido de Arizona State University: <http://www.public.asu.edu/~camartin/plants/Plant%20html%20files/citrusparadisi.html>
- Blanco, C. (1998). *Electroforesis capilar*. Almeria: Universidad de Almeria Servicio de publicaciones.
- Barreiro, M. (Junio de 1999). La toronja mexicana y sus potencialidades. *De nuestra cosecha*, 4-8.
- Bosserhoff, A., & Hellerbrand, C. (2010). Capillary Electrophoresis. En G. Patrinos, & W. Ansorge, *Molecular Diagnostics* (págs. 59-73). Elsevier Ltd.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 317-333.
- deMan, J. M., Finley, J. W., Hurst, W. J., & Lee, C. Y. (2018). *Principles of Food Chemistry*. New York: Springer.
- Demir, T., Gunesli, Z., Sonmez, F., Bilen, C., Yavuz, E., & Gencer, N. (2015). Inhibition of carbonic anhydrase I y II with total anthocyanins from sweet cherry cultivars. *Environmental Engineering and Management Journal*, 14(4), 935-941.
- Díaz, M., & Roig, A. (1989). *Química Física*. Madrid: Alhambra Universidad.
- Domínguez, M. (07 de November de 2016). Flavonoides extraídos de la cascara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). *Scientia Agropecuaria*, 419-431.
- Duodu, K., & Awika, J. (2019). Phytochemical-Related Health-Promoting Attributes of Sorghum and Millets. En J. Taylor, & K. Duodu, *Sorghum and Millets Chemistry, Technology and Nutritional Attributes* (págs. 225-258). AACC International. doi:10.1016/B978-0-12-811527-5.00008-3
- Escobar, M. (2010). *Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México*. Instituto politécnico nacional. México: Licenciatura.

- Espectroscopia Ultravioleta/Visible*. (14 de Agosto de 2017). Recuperado el 5 de Mayo de 2020, de Transiciones electronicas - WordPress.com: <https://fisicoquimicausac2017.files.wordpress.com/2017/08/transiciones-electronicas.pdf>
- FAO. (1999). Standard for grapefruits. *CODEX STAN 219*, 1-5.
- Formica, J., & Regelson, W. (1995). Review of biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemical Toxicol*, 1061-1080.
- Funmilayo, B. T. (2017). Evaluation of the antioxidants and antimicrobial properties of two nigerian leafy vegetables. *Journal of food and nutrition research*, 418-426.
- Garland, A. (Junio de 2020). *United States Department of Agriculture*. Obtenido de USDA NRCS: https://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=cima5_001_ahp.jpg
- González, E., Nazareno, M., & Borsarelli, C. (2002). Enthalpy–entropy compensation effect in the chalcone formation from naringin in water–ethanol mixtures. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2052-2056.
- Guthrie, V., Chambers, N., Moussa, F., & Carroll, K. (1996). Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutrition and cancer*, 167-181.
- Gutiérrez, J. (13 de 08 de 2018). *Laboratorio de técnicas instrumentales UVA*. Obtenido de Electroforesis Capilar. Principios de la técnica.: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/electroforesis-capilar>
- Holler, J., & Crouch, S. . (2015). *Fundamentos de Química Analítica*. Mexico: Cengage learning.
- Hongbin, Z., W., Y., Yuxuan, L., & Yalin, X. (2009). Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV–Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food Anal. Methods*, 3, 90-97. doi:10.1007/s12161-009-9091-2
- IFPS Global. (16 de Junio 2017 de 2014-2015). *Internacional federation for produce standards*. Obtenido de <https://www.ifpsglobal.com/Terms>
- Iturriaga, L., Olabarrieta, I., Castellan, A., Gardrat, C., & Coma, V. (2014). Active naringin-chitosan films: Impact of UV irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 110, 374–381.
- Kawaii, S. (2000). Quantitative Study of Flavonoids in Leaves of Citrus Plants. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40, 3865-3871.
- Magalhães, L. M., Almeida, M. I., Barreiros, L., Reis, S., & Segundo, M. A. (2012). Automatic Aluminum Chloride Method for Routine Estimation of Total Flavonoids in Red Wines and Teas. *Food Anal. Methods*, 5, 530–539. doi:10.1007/s12161-011-9278-1
- Martinez-Florez, S., Gonzalez, J., Culebras, J., & Tuñon, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 271-278.
- Melquiades, C., Aro, J., Huamani, V., & Cartagena, R. (2018). Antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del mio – mio (*Coriaria ruscifolia* L). *Rev. investig. Altoandin*.
- Murkovic, M. (2003). Phenolic Compounds. En Caballero, & Benjamin, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2a ed., págs. 4507-4514). Academic Press. doi:10.1016/B0-12-227055-X/00914-7
- Olsen, D. (1990). *Métodos Ópticos de Análisis*. Barcelona: Reverté.

- Pretsch, E., Bühlmann, P., & Badertscher, M. (2009). *Structure Determination of Organic Compounds*. Springer.
- Quiñones, M. . (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables cobe el sistema cardiovascular. *Nutricion Hospitalaria*, 76-89.
- Rangaswami, S., & Seshadri, T. (1942). A note on certain useful colour reactions of anthoxanthins and related compounds. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A*, 16(2), 129-134.
- Rengifo, R. (2013). Cuantificacion de flavonoides en el extract etanologico de propoleos . *Pharmaciencia*, 51-56.
- Ringuelet, J., & Viña, S. (2013). *Productos Naturales Vegetales* . Buenos Aires: EDULP.
- Ríos, Y. (12 de Mayo de 2017). *Espectroscopia UV-Visible*. Recuperado el 5 de Mayo de 2020, de uv_3.pdf - UVTeoria.pdf: <http://www.yolanda-rios.net/materiales/UVTeoria.pdf>
- S, M.-F., J, G.-G., J.M, C., & J, T. (2002). Los Flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 17, 271-278.
- SAGARPA. (12 de Noviembre de 2012). *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural*. Obtenido de www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/sanluispotosi/boletines/Paginas/BOL1301112.a.spx
- SAGARPA. (2016). Cítricos limón, naranja y toronja mexicanos. *Planeación agrícola 2016-2030*, 3-6.
- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M., Oludemi, T., Ayuda-Durán, B., & González-Manzano, S. (2019). Plant phenolics as functional food ingredients. En I. Ferreira, & L. Barros, *Advances in Food and Nutrition Research* (págs. 183-257). Elsevier Inc. . doi:10.1016/bs.afnr.2019.02.012
- Saptarini, N. H. (2016). Total flavonoids content in acidified extract of flowers and leaves of gardenia (*Gardenia Jasminoides ellis*). *Asian journal of pharmaceutical and clinical research.*, 213-215.
- Saville, D. . (2001). Inhibición de la actividad del CYP3A4 humano por flavonoides de toronja, furanocumarinas y compuestos relacionados. *Revista de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas.*, 217-227.
- Shallan, A., Guijt, R., & Breadmore, M. (2013). Capillary Electrophoresis: Basic Principles. En J. Siegel, P. Saukko, & M. Houck, *Encyclopedia of Forensic Sciences* (págs. 549-559). Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-12-382165-2.00241-5
- Shimadzu. (22 de 08 de 2018). *Espectrofotómetro UV-VIS (UV-2600, UV-2700 , UV-VIS)*. Obtenido de La estructura de un espectrofotómetro: https://www.shimadzu.com/an/molecular_spectro/uv/uv2600_2700.html
- Sinclair, B. (1972). *The grapefruit*. California : Riverside University .
- SINAVIMO. (Junio de 2020). *Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas*. Obtenido de SINAVIMO.GOV: <https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/citrus-sinensis>
- Singleton, V. (1981). *Singleton*. New York: Academic Press.
- Singh, B. . (2011). An overview of capillary electrophoresis: Pharmaceutical, biopharmaceutical and biotechnology applications. *Journal of Pharmaceutical Educaion*, 2-36.
- Skoog, D. . (1998). *Principios de analisis instrumental* . Mexico: McGraw-Hill.

- Symonowicz, M., & Mateusz, K. (2012). Flavonoids and their properties to form chelate. *Biotechnology and Food Sciences*, 34-41.
- Tec, B. (23 de 07 de 2018). *Servicios Científicos Técnicos de la UPC*. Obtenido de <https://www.upc.edu/sct/es/equip/435/espectrometro-ultravioleta-visible-uvvis.html>
- Ting, S. J. (1971). *The Biochemistry of citrus fruits and their products*. Norwich, Reino Unido.: HULME, AC.
- Tomasik, P. e. (2004). Chemical and Functional Properties of Food Saccharides. *CRC Press*, 389.
- Uivarosi, V., Munteanu, A. C., Sharma, A., & Tuli, S. H. (2019). Metal Complexation and Patent Studies of Flavonoid. En S. H. Tuli, *Current Aspects of Flavonoids: Their Role in Cancer Treatment* (págs. 39-55). Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd. doi:10.1007/978-981-13-5874-6
- USDA. (2017). *Citrus ×paradisi Macfad. (pro sp.) [maxima × sinensis] Grapefruit*. Obtenido de Natural Resources Conservation Services: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CIPA3>
- Vallejo, W. (13 de Octubre de 2014). *Interacciones intermoleculares: Espectroscopia*. Obtenido de Facultad de química UNAM: http://depa.fquim.unam.mx/jesusht/sfi_espectroscopia_wvn.pdf
- Vidaurre, M., Quereval, L. D., & Ruiz, S. (2007). Características farmacognósticas de las hojas de Capparis avicennifolia. *Rev. Med. Vallejana. Vol. 4 N° 2*, 121-131.
- Viñas, P., & Campillo, N. (2019). Gas Chromatography: Mass Spectrometry Analysis of Polyphenols in Foods. En R. Ross Watson, *Polyphenols in Plants (Second Edition) Isolation, Purification and Extract Preparation* (págs. 285-316). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-813768-0.00016-5
- Wätzig, H., & Günter, S. (2003). Capillary electrophoresis a high performance analytical separation technique. *Clinical Chemistry lab Medical*, 724-738.
- Worsfold, P., & Zagatto, E. (2019). Spectrophotometry Overview. *Encyclopedia of Analytical Science*, 244-248. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14265-9
- Wu, M., Zhu, L., Zhou, Z., & Zhang, Y. (2013). Coimmobilization of Naringinases on Silk Fibroin Nanoparticles and Its Application in Food Packaging. *Journal of Nanoparticles*.
- Xu, G. Y. (2007.). Effect of heat treatment on the Phenolic. *Journal of Agricultural*, 55, 330-335.
- Zhang, J. (2007). Flavonoids in grapefruit and commercial grapefruit juice: Concentration, dsitribution, and potencial health benefits. *Proc.Fla.State Hort. Soc.*, 120,292.
- Zhang, M., Duan, C., Zang, Y., Huang, Z., & Liu, G. (2011). The flavonoid composition of flavedo and juice from the pommelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. *Food Chemistry*, 129, 1530–1536.

Anexo

Equipos

- Electroforesis capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter, Con detector de arreglo de diodos (DAD), Acoplado a computador con Software 32 Karat (Beckman Coulter, USA).
- Espectrofotómetro UV-Vis (Halo XB-10 /VIS-20)
- Desionizador de agua tipo (mili Q plus Millipore, USA)
- Potenciómetro (sens ION + PH13 044008)
- Agitador Magnético (Thermolyne, MIRAK)
- Centrifuga (Beakman Coulter, Allegra 21)

Reactivos

- Naringina (NAR), Reactivo analítico (SIGMA) (90%)
- Nitrito de Sodio, Reactivo analítico (MONTERREY) (99.8%)
- Magnesio, Purificado (J.T. BAKER) (99.98 %)
- Nitrato de Aluminio, Reactivo analítico (MEYER) (98%-102%)
- Hidróxido de sodio, Reactivo analítico (MONTERREY) (99.8%)
- Borato de sodio, Reactivo analítico (J.T. BAKER) (100 %)
- Ácido clorhídrico, Concentrado (J.T BAKER) (36 %)

Preparación de soluciones

- Estándar directo (Nar).

En un matraz volumétrico de 5.0 mL se colocaron 0.0254 g de Nar reactivo analítico y disolvieron con etanol-agua (80:20 v/v). En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 0.5 mL de la disolución preparada y se llevó a la marca de aforo con la misma mezcla de disolventes (Solución 1).

- Cinética de reacción de Shinoda.

En un matraz volumétrico de 25 mL se disolvieron 0.0322 g de Nar reactivo analítico con etanol-agua (80:20 v/v). En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 0.5 mL de la disolución anterior y se adicionaron 2.0 mL de ácido clorhídrico concentrado, 0.011 mg de magnesio metálico y la disolución se llevó a la marca de aforo con etanol-agua (80:20 v/v) Solución 2.

- Reacción de Shinoda.

En un matraz volumétrico de 25.0 mL se disolvieron 0.0596 g de Nar reactivo analítico con etanol- agua (80:20 v/v) (Solución 3).

- Cinética de reacción con Aluminio

En un matraz volumétrico de 25.0 mL se disolvieron 0.0185 g de Nar reactivo analítico con etanol-agua (80:20 v/v). En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 3.0 mL de la disolución anterior y se añadieron 0.6 mL de NaNO_2 (5%), 0.5 mL de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (10%) y 3 .0mL de NaOH (5%) y se disolvieron con etanol-agua (80:20 v/v) (Solución 4)

- Reacción de Al

En un matraz volumétrico de 5.0 mL se disolvieron 0.0174 g de Nar reactivo analítico con etanol-agua (80:20 v/v). En un matraz volumétrico de 25.0 mL se colocaron 0.5 mL de la disolución anterior y se llevó a la marca de aforo con etanol-agua (80:20 v/v) (Solución 5).

- Electroforesis Capilar (EC)

Solución buffer de boratos 20 mM

En un matraz volumétrico de 50 mL se colocaron 0.9565 g de borato de sodio (a partir de tetraborato de sodio) y se disolvieron con agua desionizada. En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 10.0 mL y llevaron a la marca de aforo con agua desionizada (Buffer de trabajo) (Solución 6).

En un matraz volumétrico de 25 mL se disolvieron 0.0171 g de Nar reactivo analítico con etanol-agua (80:20 v/v) (Solución7).

- Extracto

En un vaso de precipitados de 50 mL se colocó un gramo de polvo de albedo seco y se agregaron 25 mL de etanol-agua(80:20 v/v). La mezcla se colocó en baño ultrasónico por 30 min manteniendo la temperatura a 30°C. Finalizado el tiempo la mezcla se colocó en una centrifuga a 3500 rpm por 15 min. En un matraz volumétrico de 20 mL se colocó el sobrenadante separado y se llevó a la marca de aforo con agua desionizada. En un matraz volumétrico de 10 mL se colocó 1 mL de la disolución anterior y se llevó al volumen con agua desionizada. En otro matraz volumétrico se colocaron 4 mL de la disolución anterior y se completó al volumen con agua desionizada. Esta disolución se utilizó para la cuantificación. El proceso se realizó protegido de la luz para evitar la degradación de los compuestos fenólicos. En la cuantificación por transformación química con magnesio (reacción de Shinoda) se omitió la dilución de 1 mL en 50 mL.