

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

Bibliotecas Bucaramanga
Universidad Santo Tomás

**AISLAMIENTO DE HESPERIDINA A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS
OBTENIDOS DE CÁSCARA DE MANDARINA Y EVALUACIÓN DE SU
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

NATALIA TARAZONA CASTELLANOS

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISIÓN DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2016**

**AISLAMIENTO DE HESPERIDINA A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS
 OBTENIDOS DE CÁSCARA DE MANDARINA Y EVALUACIÓN DE SU
 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

NATALIA TARAZONA CASTELLANOS

Trabajo de grado para optar el título de Químico Ambiental

Directora del proyecto

MARTHA CERVANTES DIAZ, Qca., M. Sc.

Codirector del proyecto

**AMNER MUÑOZ ACEVEDO, Qco. MSc. Ph.D
 UNIVERSIDAD DEL NORTE, BARRANQUILLA**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
 DIVISIÓN DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA
 FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
 BUCARAMANGA
 2016**

***“Si he hecho descubrimientos invaluables ha sido más
por tener paciencia que cualquier otro talento”***

Isaac Newton

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de culminar esta etapa tan importante en mi vida, por fortalecerme como persona e iluminar mi mente.

A mi madre Lucía Castellanos, por darme la vida, por creer en mí cuando yo misma no lo hacía, por enseñarme que aún con obstáculos puedo lograr todo lo que me proponga. Te debo todo lo que soy ahora. Este logro es para ti.

A Álvaro Díaz, Félix Daniel y Genoveva por ser mi apoyo incondicional y mi fortaleza.

A mis profesores Martha Cervantes y Amner Muñoz, por guiarme y darme la oportunidad de realizar este proyecto.

A mis amigos con los cuales nos hemos apoyado mutuamente en nuestra formación profesional y hasta el día de hoy seguimos haciéndolo.

Natalia Tarazona Castellanos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Santo Tomás y a la Facultad de Química Ambiental por la formación profesional que me brindó.

Al Laboratorio de Investigación y Ciencias Básicas de la Universidad Santo Tomás.

Al Grupo de Investigaciones Ambientales para el Desarrollo Sostenible (GIADS).

A mi directora de tesis, Martha Cervantes por haberme confiado este proyecto y quien con sus conocimientos, paciencia, motivación y cariño me ha dado la oportunidad de aprender y terminar mis estudios.

Al Doctor Amner Muñoz, por su colaboración, orientación y todo el apoyo que me brindó para el desarrollo de este proyecto.

A Sol Ángel y a mis compañeras del laboratorio de Fitoquímica en la Universidad del Norte, por acogerme, por compartir sus experiencias y conocimientos.

Agradezco a la Doctora Leonor Vargas y al profesor Hernando Camargo por su asesoría y colaboración.

A todas las personas que contribuyeron de una forma u otra.

Muchas gracias.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xix
INTRODUCCIÓN	20
1. AISLAMIENTO DE HESPERIDINA A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS OBTENIDOS DE CÁSCARA DE MANDARINA Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	21
1.1 Planteamiento del problema	21
1.2 Justificación	22
1.3 Objetivos	23
1.3.1 Objetivo General	23
1.3.2 Objetivos específicos	23
2. MARCO DE REFERENCIA	24
2.1 Frutos cítricos	24
2.1.1 Morfología de los frutos cítricos	24
2.2 Compuestos fenólicos	26
2.3 Compuestos antioxidantes	31
2.4 Hesperidina	35
2.5 Extracción y aislamiento de flavonoides	38
2.5.1 Extracción asistida por Soxhlet	39
2.5.2 Extracción asistida por ultrasonido	39
2.5.3 Extracción asistida por microondas	39
2.5.4 Extracción asistida por supercrítico	39
2.6 Métodos de caracterización e identificación de compuestos flavonoides	41
2.6.1 Ensayos de coloración	41
2.6.2 Espectroscopía ultravioleta-visible	41
2.6.3 Cromatografía de capa fina (CCF)	42
2.6.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	42
2.6.5 Espectroscopía infrarroja (IR)	43

2.6.6 Cristalografía de Rayos X.....	43
2.6.7 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	44
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	44
3.1 Aspectos generales	44
3.2 Obtención de los extractos etanólicos a partir de la cáscara de mandarina .	45
3.2.1 Recolección y preparación del material vegetal	45
3.2.2 Determinación del porcentaje de humedad relativa del material vegetal	46
3.2.3 Extracción asistida por ultrasonido.	47
3.3 Pruebas colorimétricas	48
3.4 Cuantificación polifenoles y flavonoides totales de los extractos etanólicos de cáscaras de mandarina	48
3.4.1 Cuantificación de polifenoles totales:	48
3.4.2 Cuantificación de flavonoides totales	49
3.5 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de cáscaras de mandarina por el método de catión radical ABTS ⁺	50
3.6 Obtención de la hesperidina a partir de los extractos etanólicos de cáscara de mandarina.....	51
3.7 Caracterización espectrofotométrica de la hesperidina obtenida de los extractos etanólicos.	51
3.7.1 Técnicas fisicoquímicas.....	51
3.7.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	51
3.7.3 Difracción de rayos X.	52
3.7.4 Espectroscopía infrarroja.....	52
3.7.5 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear	52
3.8 Evaluación de la actividad antioxidante de la hesperidina aislada de los extractos etanólicos de cáscara de mandarina por el método de catión radical ABTS ⁺	53
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1 Determinación del porcentaje de humedad relativa del material vegetal	54
4.2 Obtención de los extractos de cáscara de mandarina.....	54
4.3 Pruebas colorimétricas	55

4.4 Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de los extractos etanólicos de cáscaras de mandarina	56
4.5 evaluación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de cáscaras de mandarina por el método de catión radical ABTS ⁺	60
4.6 Obtención de la hesperidina a partir de los extractos etanólicos de cáscara de mandarina.....	67
4.7 Caracterización estructural de la hesperidina obtenida a partir de extractos etanólicos de cáscara de mandarina seca.....	69
4.7.1 Técnicas fisicoquímicas.....	70
4.7.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	71
4.7.3 Difracción de rayos-X	73
4.7.2 Análisis de los espectros infrarrojos.	74
4.3.2 Análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹ H y ¹³ C	76
4.8 Evaluación de la actividad antioxidante de la hesperidina aislada de los extractos etanólicos de cáscara de mandarina por el método de catión radical ABTS ⁺	81
5. CONCLUSIONES	83
6. RECOMENDACIONES.....	84
7. BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXOS.....	94

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Especies de frutos cítricos más destacados a nivel comercial.....	26
Tabla 2. Principales flavonoides presentes en frutos cítricos.	30
Tabla 3. Porcentaje de humedad relativa presente en la cáscara de mandarina ..	54
Tabla 4. Porcentaje (%) de rendimiento de los extractos etanólicos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido.	54
Tabla 5. Absorbancias obtenidas de las concentraciones de ácido gálico (AG) para determinar el contenido de polifenoles totales.	57
Tabla 6. Absorbancias obtenidas de las concentraciones de quercetina para determinar el contenido de flavonoides totales	58
Tabla 7. Contenido de polifenoles totales presentes en los extractos etanólicos. .	59
Tabla 8. Contenido de polifenoles totales presentes en los extractos etanólicos. .	59
Tabla 9. Valores de TAA de las sustancias “control” obtenidos en el laboratorio y los encontrados en la literatura.	64
Tabla 10. Valores del TAA para los extractos etanólicos.	65
Tabla 11. Obtención del crudo de HE presente en los extractos etanólicos de cáscara de mandarina.	68
Tabla 12. Relación del contenido de polifenoles, flavonoides totales, actividad antioxidante total y la hesperidina.	69
Tabla 13. Parámetros cromatográficos de HPLC-DAD-UV/Vis para caracterizar HE	71
Tabla 14. Comparación entre las señales obtenida de los espectros ¹ H-RMN de la HE patrón y la HE experimental.....	78
Tabla 15. Concentraciones empleadas para evaluar la capacidad antioxidante por el método ABTS ⁺	81

FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura interna de un fruto cítrico (mandarina).....	25
Figura 2. Estructura básica de los flavonoides.....	27
Figura 3. Clasificación química de los compuestos flavonoides.	29
Figura 4. Estructura de los antioxidantes sintéticos más utilizados por la industria alimenticia.	33
Figura 5. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones (TE) y transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)	34
Figura 6. Hesperidina (flavanona glucósido).....	36
Figura 7. Diosmina (diosmetina-7-ramnoglucósido).....	36
Figura 8. Daflon 500M®, 20 tabletas, Sanfer.....	37
Figura 9. Preparación del material vegetal a partir de residuos de cáscaras de mandarina.	46
Figura 10. Ultrasonido empleado para la extracción, disponible en el Laboratorio de Investigaciones de Química Ambiental de la Universidad Santo Tomás, Bucaramanga.....	47
Figura 11. Espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453, disponible en el Laboratorio de Investigaciones de Química Ambiental de la Universidad Santo Tomás, Bucaramanga.....	49
Figura 12. Resultados de las pruebas colorimétricas de Shinoda y de taninos realizada en los extractos.	55
Figura 13. Curva de calibración del ácido gálico.....	57
Figura 14. Curva de calibración de la quercetina.....	58
Figura 15. Estructura química del Trolox y de la vitamina E.....	61
Figura 16. Microplaca donde se analizaron los seis extractos, los controles, el Trolox y una fila de blanco.	62
Figura 17. Gráfica del efecto de concentración del Trolox vs % de inhibición del ABTS ⁺ con absorbancias medidas a los 30 minutos de reacción.	63
Figura 18. Gráficas del efecto de inhibición del ABTS ⁺ por el BHT, BHA y la vitamina E, como % de inhibición vs concentración (ppm).	64
Figura 19. Gráficas del efecto de la inhibición del ABTS ⁺ por los extractos etanólicos.....	66
Figura 20. Prueba de precipitación de la hesperidina con ácido acético al 10 % ..	67
Figura 21. Obtención de la hesperidina mediante precipitación ácida.	68
Figura 22. Placa de sílica gel en el ultravioleta a 366 nm	70
Figura 23. Espectro ultravioleta de (a.) cuatro componentes presentes en los extractos etanólicos, (b.) estándar certificado de la HE y (c.) HE aislada del extracto etanólico total de cáscara de mandarina.....	72

Figura 24. Comparación de los perfiles cromatográficos por HPLC-DAD de (a.) estándar certificado de hesperidina (0,5 mg), (b.) la hesperidina aislada del extracto etanólico y (c.) del extracto etanólico.	73
Figura 25. Espectros de difracción de la HE experimental (negro) y la HE de referencia (verde).....	74
Figura 26. Espectro infrarrojo de la hesperidina aislada de los extractos etanólicos de la cáscara de mandarina.....	75
Figura 27. Espectro infrarrojo de la hesperidina empleada como referencia.	75
Figura 28. Espectro RMN-1H del patrón de hesperidina	76
Figura 29. Espectro RMN-13C del patrón de HE	79
Figura 30. Espectro RMN- ¹³ C de HE aislada a partir de los extractos etanólicos de cáscara de mandarina	80
Figura 31. Esquema de hidrólisis de la HE catalizada por ácidos.....	81

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Reacción de dismutación.	32
Esquema 2. Radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$).	32
Esquema 3. Reacción de Fenton.	32
Esquema 4. Reacción del catión radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ en presencia de un antioxidante durante el ensayo ABTS.	35
Esquema 5. Reacción general de la prueba Shinoda.	56
Esquema 6. Reacción del fenol con cloruro férrico.	56
Esquema 7. Reacción del catión radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ con compuestos fenólicos.	60
Esquema 8. Formación del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$	61

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Sistema de gradiente de elución empleada en HPLC para el análisis de la hesperidina en los extractos etanólicos.	96
Anexo 2. Gráficas del efecto de la inhibición del ABTS ⁺	97
Anexo 3. Metodología aplicada para determinar la actividad antioxidante total (TAA)	105
Anexo 4. Informe de resultados difracción de rayos-X	108

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABTS:	Ácido-2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazonil-6-sulfónico
Trolox:	Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
BHA:	Butilhidroxianisol
BHT:	Butilhidroxitolueno
EUA:	Estados Unidos de América
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficiencia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
DAD:	Detector de arreglo de diodos (<i>Diode Array Detector</i>)
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear
FAO:	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
UV:	Ultravioleta
UV-Vis:	Ultravioleta-visible
ERO:	Especies Reactivas de Oxígeno
Tons:	Toneladas
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
AG:	Ácido gálico
nm:	Nanómetro
USD:	Dólar estadounidense
mg:	Miligramo
g:	Gramo
HE:	Hesperidina
%:	Porcentaje
US:	Ultrasonido
TAA:	Actividad Antioxidante Total

ppm:	Partes por millón
h:	Hora
min.	minuto
mL:	Mililitro
μL:	Microlitro
L:	Litro
M:	Molar
CO₂:	Dióxido de carbono
NO:	Óxido nítrico
IR:	Infrarrojo
cGMP:	Guanosida monofosfato cíclico
TST:	Ensayo de suspensión de cola de ratón (<i>Mause Tail Suspension Test</i>)
BDNF:	Factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)
HIE:	Encefalopatía hipóxica-isquémica (<i>Hypoxia-Ischemic Encephalopathy</i>)
GHE:	Glucosil de hesperidina
kg:	Kilogramo
Hz:	Hertz
DMSO-D₆:	Dimetilsulfóxido deuterado

GLOSARIO

RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS: residuos provenientes de restos de productos de origen orgánico, la mayor parte de estos son biodegradables; se desintegran o se degradan rápidamente convirtiéndose en otro tipo de materia orgánica, por ejemplo, los restos de comida, frutas, verduras, huevos, etcétera.¹

APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS: recuperación eficiente de los diferentes materiales encontrados en los desechos, se puede realizar por medio de la reutilización, el reciclaje, la incineración con generación de energía y compostaje.²

COMPUESTOS BIOACTIVOS: constituyentes extra nutricionales producidos en pequeñas proporciones en los alimentos; presentan variaciones en su estructura química y función, por tanto, están siendo fuertemente estudiados con el fin de evaluar sus efectos sobre la salud.³

ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO): son moléculas muy reactivas debido a que en su último orbital tienen un electrón desapareado, es decir un radical libre, generando una inestabilidad física. Estas especies participan en procesos fisiológicos en el organismo; no obstante, cuando las ERO supera a los mecanismos de inactivación, se presenta el estado metabólico de estrés oxidativo caracterizado por daños moleculares y celulares.⁴

ESTRÉS OXIDATIVO: es un desequilibrio entre la producción de radicales libres y los metabolitos reactivos, llamados oxidantes o especies reactivas de oxígeno, y su eliminación por mecanismos de protección, haciendo referencia a los antioxidantes; este desequilibrio produce daño en las biomoléculas y células importantes, impactando potencialmente todo el organismo.⁵

ÁCIDOS CINÁMICOS: son un grupo de ácidos carboxílicos aromáticos que aparecen naturalmente en el reino vegetal. Se forman en la ruta bioquímica que produce lignina, el material polimérico que proporciona soporte mecánico a la pared celular de la planta. Se generan en todas las plantas verdes, en pequeñas cantidades unido covalentemente a las paredes celulares, también en los órganos reproductores de las plantas con flores.⁶

FITOALEXINAS: son metabolitos secundarios de naturaleza química diversa, principalmente flavonoides, de bajo peso molecular, que se sintetizan en los vegetales después de una infección microbiana.⁷

RESUMEN

Colombia es un país que se caracteriza en la producción de frutos cítricos; no obstante, esto genera un mayor consumo lo que conlleva a la problemática de la disposición de los residuos sólidos orgánicos. A nivel científico se ha tomado impulso en aprovechar estos residuos con el fin de recuperar sustancias de interés farmacéutico, cosmético y alimenticio entre los cuales se destacan los flavonoides.

La hesperidina es un flavonoide presente en la cáscara de los frutos cítricos y sobresale por tener una amplia gama de propiedades farmacológicas como antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y antialérgica.

El objetivo principal de este trabajo fue aislar la hesperidina a partir de residuos de cáscara de mandarina empleando la extracción asistida por ultrasonido como técnica de obtención de los extractos etanólicos, logrando un rendimiento promedio de 7 % para las cinco muestras realizados.

Se cuantificó el contenido polifenoles (de 18,74 a 24,66 mg AG/g extracto) y de flavonoides (de 0,41 a 0,50 mg de quercetina/g extracto) presentes en los extractos, así mismo se evaluó su actividad antioxidante por medio del método de catión radical ($ABTS^{+\cdot}$), obteniendo valores de $112,7 \pm 3,1$ a $174,2 \pm 4,7$ mmol de Trolox / Kg muestra.

La hesperidina aislada no presentó inhibición sobre el catión radical $ABTS^{+\cdot}$ su estructura fue confirmada por las diferentes técnicas espectrofotométricas, HPLC-DAD-UV/vis, infrarrojo, difracción de rayos-X y RMN, empleando un patrón como referencia.

PALABRAS CLAVES: residuos orgánicos, mandarina, hesperidina, antioxidante, caracterización.

ABSTRACT

Colombia is a country characterized in the production of citrus fruits; however, this generates increased consumption that leads to the problem of disposal of solid organic waste. A scientific level has gained momentum in exploiting these wastes in order to recover substances of pharmaceutical, cosmetic and food interest among which include flavonoids.

Hesperidin is a flavonoid found in the skin of citrus fruits and is known for having a wide range of pharmacological properties as an antioxidant, anti-inflammatory, anti-allergic and anti-carcinogenic.

The main objective of this work was to isolate hesperidin from tangerine peel residues using the ultrasound as a technique for obtaining the ethanolic extracts, achieving an average yield of 7 % for the five samples made.

The polyphenols content was quantified (18,74 to 24,66 mg AG/ g extract) and flavonoids (0,41 to 0,50 mg quercetin/ g extract) present in the extracts, also its antioxidant activity was evaluated by the radical cation (ABTS⁺) method, obtaining values of $112,7 \pm 3,1$ to $174,2 \pm 4,7$ mmol Trolox/ kg sample.

Hesperidin isolated did not show inhibition on the radical cation ABTS. Different spectrophotometric techniques, HPLC-DAD-UV / Vis, IR, NMR, and diffraction X-ray, using a standard reference, confirmed its structure.

KEY WORDS: organic waste, tangerine, hesperidin, antioxidant, characterization.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la protección del medio ambiente más que un deber se ha convertido en una obligación, tanto del estado como de los ciudadanos. Una problemática que se ha vivido durante años en Colombia, es la disposición de los residuos sólidos orgánicos, ya que estos constituyen cerca del 70% del volumen total de desechos generados y han ocasionado problemas ambientales como el efecto invernadero, aguas de lixiviación y el desarrollo de vectores que producen enfermedades; además este hecho se ve vinculado al incremento de la población, globalización y hábitos de consumo de los humanos.^{1,8}

No obstante, una forma de reciclar estos residuos sólido orgánicos y que ha tomado fuerza entre la comunidad científica, es recuperar e identificar sustancias de interés farmacéutico o alimentario presentes en las frutas y verduras, tales como enzimas, ácidos orgánicos, amino-ácidos y metabolitos secundarios;⁹ en este último se destacan los flavonoides, los cuales son compuestos naturales que protegen al organismo del daño ocasionado por agentes oxidantes.¹⁰ Los flavonoides no sólo se encuentran en la parte comestible de los frutos, también están presentes en la cáscara y semillas; una fuente común de estos son los frutos cítricos, las cerezas, uvas, albaricoques, grosellas negras, etc.¹¹

La mandarina (*Citrus reticulata*) es uno de los frutos cítricos de mayor producción y consumo en el mundo, no solo se caracteriza por su sabor dulce y su fácil pelado, sino también por tener una mezcla de nutrientes como los flavonoides, vitamina A y C, ácido fólico y potasio.¹² Entre los flavonoides presentes se destaca la hesperidina, una flavanona con múltiples propiedades benéficas para la salud tales como antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígenas y antialérgicas;¹³ por esto se han realizado varios esfuerzos para su extracción y purificación.

En este trabajo se obtuvo hesperidina a partir de extractos etanólicos de cáscara de mandarina en estado seco, empleando como método de aislamiento la extracción con solvente asistida por ultrasonido y como técnicas de caracterización: cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por su significado en inglés), difracción de rayos-X, infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN); así mismo se determinó el contenido de polifenoles y flavonoides totales presentes en los extractos etanólicos y se evaluó la actividad antioxidante mediante el ensayo del catión radical ABTS⁺.

1. AISLAMIENTO DE HESPERIDINA A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS OBTENIDOS DE CÁSCARA DE MANDARINA Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A lo largo de los años, el manejo de los residuos sólidos ha sido uno de los principales problemas ambientales que se vive a diario en las ciudades; en Colombia, según la Política para la Gestión de Residuos emitida por el Ministerio de Medio Ambiente en 1998, el aumento de residuos sólidos se debe a las estrategias de mercadeo y la producción insostenible para el consumo de la población; otro factor es la falta de conciencia ciudadana en la relación residuos, ambiente y economía.¹⁴

Colombia genera diariamente 27 300 toneladas de basura (proyecto de acuerdo 113 del 2011, Secretaría General de la Alcaldía Mayor de Bogotá), el 70 – 80 % de esta basura es reciclable, tan sólo se recupera el 10 % de los residuos sólidos; el 55 % del peso total de los residuos generados en todo el país, corresponde a material orgánico y son la principal causa de la producción de lixiviados, gases efectos invernadero, olores y moscas en los rellenos sanitarios.¹⁵

A nivel científico e industrial, se ha tomado impulso para aprovechar los residuos orgánicos, ya que su transformación genera desechos y subproductos que pueden ser de gran utilidad en otros campos. No todos los residuos orgánicos de las agroindustrias son aprovechados, sin embargo, se le ha dado gran importancia a identificar y recuperar aquellas sustancias de interés farmacéutico, cosmético y alimenticio de gran valor comercial como ácidos orgánicos, enzimas, metabolitos secundarios, biológicamente activos presente en los residuos de las frutas, cítricos, bagazos, aceites esenciales.⁹

El procesamiento de frutos cítricos, es una de las ramas de la industria alimenticia con mayor impacto, ya que son de mayor producción y consumo en el mundo. Los desechos obtenidos a partir de la extracción del jugo, son la cáscara y el bagazo, siendo casi un 50% de la masa total del fruto;¹⁶ los cuales bien aprovechados son utilizados para la obtención de harinas, pectinas, aceites esenciales, pigmentos, así mismo compuestos bioactivos con efectos benéficos sobre la salud, como la fibra y los polifenoles, especialmente los flavonoides. Aunque en la mayoría de casos, simplemente se emplean como abono o alimento para animales.

Una fuente económica para la obtención de hesperidina (flavanona presente en los cítricos) son los residuos sólidos orgánicos como la cáscara de mandarina, teniendo en cuenta que la producción en Colombia es bastante significativa, 109768 toneladas, lo que representa un 23,9 % de la producción total de cítricos (producción

nacional en el 2010), Santander es el principal productor de mandarina con un 85,5% de la producción nacional.¹⁷

El interés y la necesidad de utilizar estos residuos orgánicos para la obtención de productos naturales con fines medicinales, como la hesperidina, ha ido aumentando a través de los años, ya que puede disminuir el impacto ambiental en la producción de las basuras que se depositan en los rellenos sanitarios.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Los frutos cítricos, no solo se destacan por su sabor amargo y por su alto contenido de vitamina C, también son importantes por la cantidad de compuestos flavonoides presentes tanto en su pulpa como en su cáscara y semillas. Varios estudios han mostrado que la acumulación de flavonoides se relaciona con algunas etapas de crecimiento del fruto; por ejemplo, los niveles más altos de hesperidina se encuentran en los tejidos inmaduros.¹⁸

La hesperidina es una flavanona presente en mayor proporción en la cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*),¹² su contenido puede alcanzar más del 30% sobre base seca en frutas de tamaño pequeño y hasta un 5% en frutos en estado maduro.¹⁹ Su obtención ha sido de gran importancia para el desarrollo de muchos estudios científicos, ya que posee propiedades farmacológicas como la disminución de la permeabilidad capilar, inhibición de la proliferación *in vitro* de células cancerosas, así mismo es un poderoso agente antioxidante y muestra actividad antiinflamatoria y antialérgica.²⁰ Debido a esto, existe un gran interés en la búsqueda de métodos de extracción ideales para obtener un máximo de estos compuestos bioactivos a bajo costo; el uso de la extracción asistida por ultrasonido ha demostrado una disminución en el tiempo de extracción y un aumento en el rendimiento en diferentes tipos de material vegetal.²¹

Tanto la extracción de flavonoides, como el aislamiento de la hesperidina a partir de cáscara de mandarina, ha tenido un impacto positivo a nivel ambiental, ya que pueden ser empleados como antioxidantes naturales tanto por la industria farmacéutica como la alimentaria, dándole un valor agregado a estos residuos.

Hoy en día existe gran polémica en el uso de antioxidantes sintéticos, aunque estos presenten mayor estabilidad, eficacia y economía en la industria alimenticia, están siendo cuestionados debido a sus posibles efectos adversos sobre la salud, como promover enfermedades cancerígenas.²² Por otro lado, los antioxidantes naturales han ido tomando de forma progresiva el mercado, ya que no existe una legislación que prohíba su uso en caso de que sea un extracto y no un compuesto puro, ambos son aceptados;²³ además están al alcance de todos, en las frutas y verduras que se consumen diariamente.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Aislar la flavanona hesperidina a partir de residuos de cáscara seca de mandarina, utilizando la extracción asistida por ultrasonido asimismo evaluar la actividad antioxidante tanto de los extractos como de la hesperidina por medio del catión radical (ABTS⁺).

1.3.2 Objetivos específicos

- Obtener los extractos etanólicos a partir de las cáscaras secas de mandarina, empleando la extracción asistida por ultrasonido.
- Determinar el contenido de flavonoides y polifenoles totales presentes en los extractos obtenidos, utilizando los métodos colorimétricos de cloruro de aluminio y Folin-Ciocalteu, respectivamente.
- Aislar la flavanona hesperidina presente en los extractos obtenidos de la cáscara de mandarina por medio de precipitación con ácido acético al 10%.
- Caracterizar la hesperidina empleando las diferentes técnicas físicoquímicas y espectrofotométricas: HPLC-DAD, rayos-X, infrarrojo y RMN.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos y de la hesperidina aislada utilizando el ensayo de catión radical ABTS⁺.

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 FRUTOS CÍTRICOS

El género *citrus*, también conocido como *agrumes* (ácido), perteneciente a la familia *Rutaceae*; representa uno de los principales cultivos del mundo, tanto a nivel económico como nutricional. Según datos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (*Food and Agriculture Organization, FAO*) de las Naciones Unidas, los principales productores son China, Brasil, Estados Unidos, India, México y España, representando aproximadamente dos tercios de la producción mundial.²⁴

En Colombia, según datos del Ministerio de Agricultura en el 2014 el cultivo de cítricos abarca un área de 38 949 hectáreas, con una producción de 654 306 toneladas y un rendimiento de 15,12 ton/ ha.²⁵ Tanto en Colombia como en las zonas tropicales, los cítricos se producen a una temperatura entre 23 y 34°C, con pluviosidades entre 900 y 1 200 mm anuales;¹⁶ hay 21 departamentos productores, los mayoritarios son Meta, con una participación de en la producción nacional de 22,42%, seguido de Valle del Cauca con 21,29% y Quindío con 16,96%.²⁵

En cuanto a las especies, el departamento del Tolima es el mayor productor de limón con una participación de 37,78%; seguido por Atlántico con 18,50% y Santander con 16,23%. Por otro lado, Caldas, Cesar, Risaralda y Santander, representan un 64% en la producción total de naranja (común y valencia),²⁵ siendo ésta destinada generalmente al mercado fresco.²⁶

Respecto a la producción de mandarina, esta ha aumentado significativamente en el período 2012/2014, pasó de 121 857 tons (2012) a 131 541 tons (2014), siendo Santander el principal productor con una participación de 80,81%, seguido por Risaralda y Norte de Santander.²⁵

Los cítricos, además de tener un refrescante aroma y una alta capacidad para calmar la sed, poseen además de la vitamina C, una gran cantidad de compuestos fitoquímicos como carotenoides (licopeno y β -caroteno), limonoides, flavanonas (naringina y rutinósido), vitaminas del complejo B y otros nutrientes, convirtiéndose en uno de los principales aliados en la dieta.²⁷

2.1.1 Morfología de los frutos cítricos

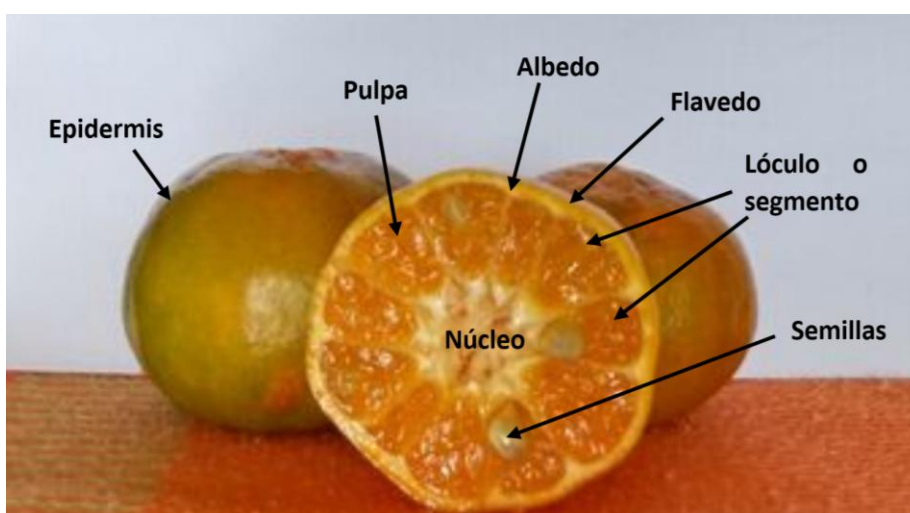
El fruto cítrico como tal, consta de tres partes morfológicas; epicarpio (flavedo), mesocarpio (albedo) y endocarpio (Figura 1).

- *Epicarpio*, también conocido como flavedo, es la parte externa del fruto, la cual puede ser de color verde o amarillento-anaranjado; funciona como

epidermis, protegiendo el fruto del exterior. Contiene glándulas con esencias y pigmentos (carotenoides, flavonoides).²⁸

- *Mesocarpio*, conocido también como albedo, es la parte interna del fruto, la cual envuelve al endocarpio. Es una capa de color blanco, contiene vitamina C y es rica en sustancias pécticas y hemicelulosas. En conjunto con el flavedo, forma el pericarpio, es decir la cáscara de la fruta.²⁴
- *Endocarpio*, es la parte comestible del fruto cítrico, contiene fracciones divididas donde se encuentran las semillas y los pelos vesiculares los cuales están llenos de jugo.²⁹

Figura 1. Estructura interna de un fruto cítrico (mandarina).



FUENTE: Autora

La composición química del fruto cítrico en general está dada por gran cantidad de macronutrientes como azúcares simples y fibra dietaria; también contiene numerosos micronutrientes como ácido fólico, tiamina, niacina, vitamina B6, riboflavina, ácido pantoténico, potasio, calcio, fósforo, magnesio, cobre, flavanonas glicosídicas y flavanonas polimetoxiladas.²⁴ Muchos de estos nutrientes se encuentran distribuidos en la cáscara, por ejemplo, los ácidos fenólicos y los flavonoides se encuentran en mayor proporción en el albedo, donde cumplen su función como antioxidantes naturales.³⁰

A nivel comercial, se destacan las siguientes frutas cítricas: naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*), limón (*Citrus aurantifolia*) y toronja (*Citrus paradisi-Citrus reticulata*).²⁴ En la Tabla 1, se pueden observar sus características principales.

Tabla 1 Especies de frutos cítricos más destacados a nivel comercial.

Fruta	Especie de <i>Citrus</i>	Características
Naranja	<i>sinensis</i>	Es de suave corteza, de color anaranjado en su etapa madura, con pulpa jugosa de sabor dulce, posee semillas blancas y arrugadas. Aunque es una cosecha demorada, los árboles pueden mantener los frutos maduros durante un tiempo prolongado. Se divide en tres grupos: Navel, Valencia y de sangre. ³¹
	<i>aurantium</i>	Sus frutos son agrios y poco comestibles; tiene cualidades decorativas y un alto contenido de aceites esenciales lo cual la hace útil en la industria de los perfumes. ³²
Mandarina	<i>reticulata</i>	Es el grupo más importante para la comercialización de cítricos frescos, gracias a su buena apariencia, agradable sabor y facilidad para pelarla y extraerle las semillas. A diferencia de las naranjas, pueden resistir temperaturas más frías. Existen dos clases de <i>Citrus reticulata</i> : la clementina que es de frutos pequeños y puede permanecer durante largo tiempo en el árbol; y la <i>Citrus reticulata var austera</i> , que es de sabor amargo y más pequeña que la clementina. ²⁸
Limón	<i>aurantifolia</i>	Es de color amarillento y su corteza es lisa, delgada y compacta. Su pulpa es carnosa, de color verde traslúcido y jugoso con un sabor ácido o dulce, con poca cantidad de semillas. Se destaca principalmente por su aroma tan peculiar. ³³
Toronja	<i>paradisi-reticulata</i>	Es de las frutas cítricas de mayor tamaño. Es de color amarillo pálido, por dentro, su centro puede ser sólido o semi hueco, con una pulpa de color rojo oscuro, amarillo pálido o rosado; las semillas son blancas, puntiagudas y puede haber hasta 90. Es de sabor amargo. Su cultivo ha sido importante en Estados Unidos, México, Argentina, Marruecos y en algunas zonas de Suramérica. ³⁴

Como se mencionó anteriormente, dentro de la composición química de los cítricos se encuentran compuestos tipo polifenoles, los cuales se describen a continuación.

2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS

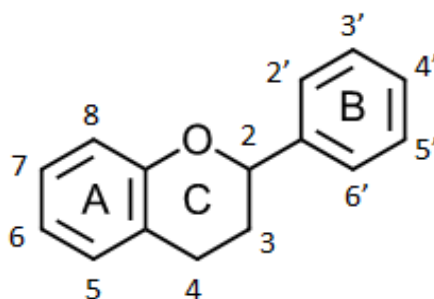
Los fenoles, son compuestos orgánicos que contienen en su estructura molecular un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo. Tienen su origen en el reino vegetal, siendo uno de los principales metabolitos secundarios de las plantas, ya que actúan como fitoalexinas, anti-alimentadores, atrayentes para los polinizadores, también son contribuyentes de la pigmentación, antioxidantes y agentes protectores de UV, entre otros. Estas características juegan un rol en el crecimiento y la reproducción de las plantas.³⁵ Entre los alimentos ricos en fenoles se encuentran:

la cebolla, el vino tinto, el cacao, el aceite de oliva, los frutos cítricos, las aceitunas, etc.³⁶

Actualmente, el interés por los polifenoles ha ido aumentando gracias a sus beneficios sobre la salud humana, ya que poseen actividad antiinflamatoria, antiviral y antialérgica; además, debido a sus propiedades antioxidantes pueden prevenir algunas enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas como el Alzheimer.³⁶ Los polifenoles se pueden dividir en dos grandes grupos: ácidos cinámicos y flavonoides; este último representa el grupo más importante y generalizado de los metabolitos secundarios de las plantas, abarca a más de 6500 moléculas.³⁷

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, su estructura de (C₆-C₃-C₆) C₁₅ incluye dos anillos de fenilos (A y B) unidos a través de un anillo C de pirano (heterocíclico),³⁸ ver Figura 2.

Figura 2. Estructura básica de los flavonoides.³⁸



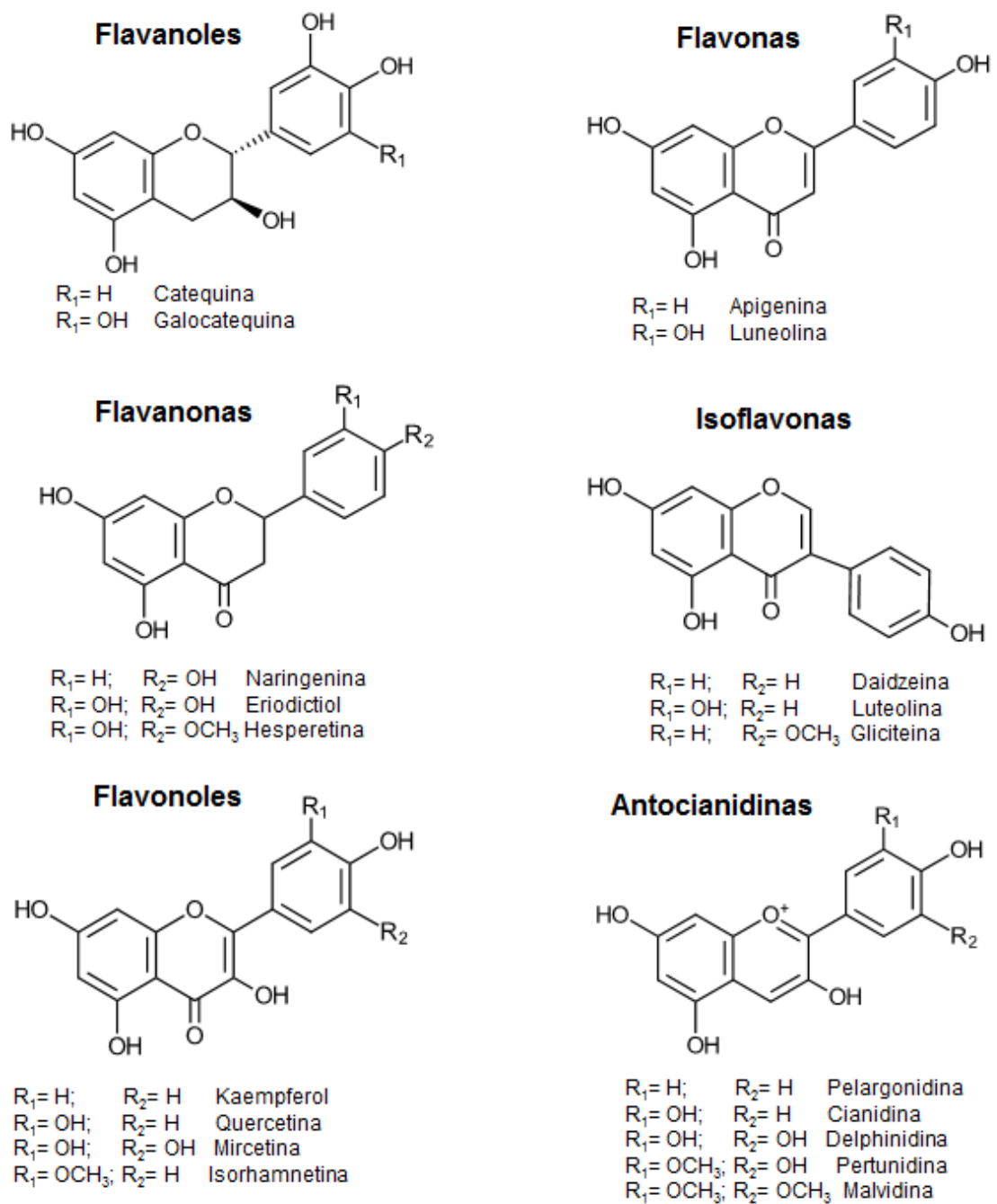
Los flavonoides se pueden subdividir según los sustituyentes y el nivel de oxidación en el anillo heterocíclico en:

- Flavonoles: representado por la quercetina, con un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C;³⁷ los flavonoles y las flavonas se unen a los azúcares, preferentemente a la posición 3 y con menor frecuencia a la posición 7 del anillo A, encontrándose comúnmente como O-glucósidos donde la D-glucosa es el residuo de azúcar más usual. La parte sin azúcares de la molécula de flavonoide se conoce como aglicona; los glucósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres en comparación con su aglicona.¹⁰
- Flavanonas: se caracterizan por la presencia de un centro quiral en la posición 2 y por la ausencia del doble enlace entre las posiciones 2 y 3; se presentan como glucósidos, generalmente rutinósido (6-O- α -L-ramnosil-D-glucósidos) y neohesperidosidos (2-O- α -L-ramnosil-D- glucósidos) unido en la posición 7.³⁷

- Isoflavonas: el anillo heterocíclico B está unido a la posición 3, a diferencia de los otros flavonoides que lo tienen en la posición 2. En los granos de soja las isoflavonas se pueden dividir en tres grupos, los cuales se basan en sus fracciones de aglicona: daidzeína, genisteína y gliciteína, en cada grupo están presentes de cuatro formas diferentes: O-malonil- β -glucósido, O-acetil- β -glucósido, β -glucósido y aglicona.³⁹
- Antocianinas: siempre se encuentran como glucósidos, la estructura básica de estas agliconas es el ion flavilio (2-fenil-benzopirilio), el cual consta de dos grupos aromáticos, un benzopirilio y un anillo fenólico;⁴⁰ por lo general el flavilio funciona como un catión. Las más comunes son pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina.³⁷

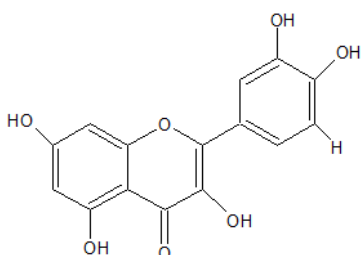
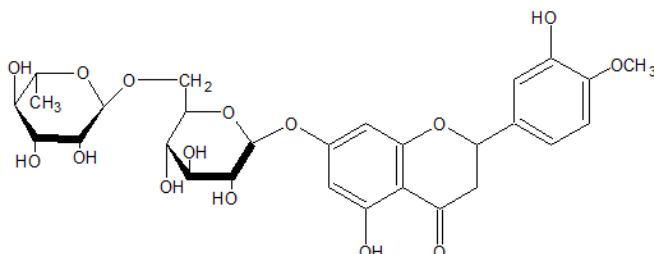
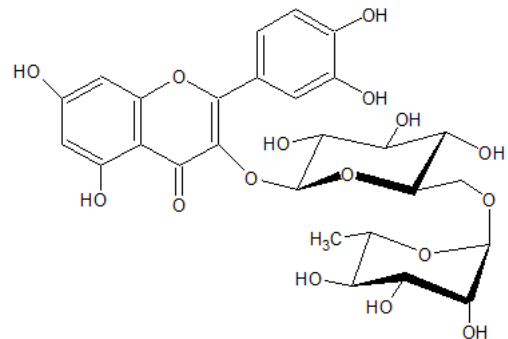
Esta clasificación se puede observar en la Figura 3.

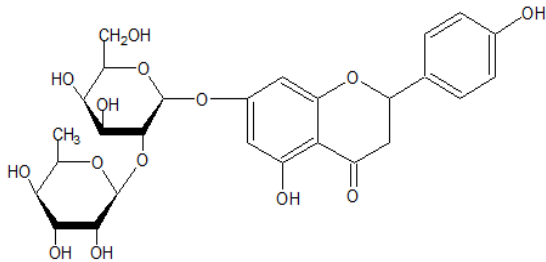
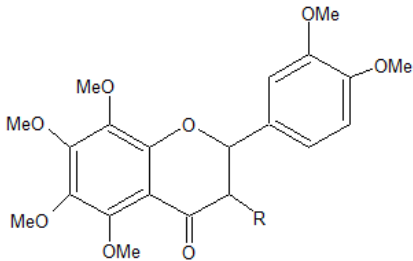
Figura 3. Clasificación química de los compuestos flavonoides.^{37, 41}



En los frutos cítricos, los flavonoides más abundantes son la quercetina, hesperidina, rutina, naringina y nobiletina;¹⁰ sus principales características están presentes en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales flavonoides presentes en frutos cítricos.

Flavonoide	Características
Quercetina 302.24 g/mol	Es un flavonol amarillo-verdoso presente habitualmente en forma de O-glucósido. Aunque contiene cinco grupos hidroxilo, la quercetina posee carácter lipófilo muy difíciles de absorber, de esta se derivan otros flavonoides, como la rutina y la naringenina.⁴²  <i>2-(3,4-Dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-cromen-4-ona</i>
Hesperidina 610.56 g/mol	Es una flavanona glucósida, de color blanco o amarillo pálido. Se utiliza principalmente como protectora de los capilares, eficiente para el tratamiento de varices o hemorroides, también evita las úlceras, reduce los niveles de colesterol y tiene propiedades sedantes.⁴³  <i>(2S)-5-hidroxi-2-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-7-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-yl]oximetil]oxan-2-yl]oxi-2,3-dihidrocroman-4-ona</i>
Rutina 610.52 g/mol	Conocida como rutósido, quercetin-3-rutinósido o soforina, es un glucósido de flavonol compuesto de quercetina y rutinosa. Puede reducir la fragilidad capilar y los hematomas, se ha empleado en la industria alimentaria como un agente colorante, también para fines en los cosméticos.⁴⁴  <i>2-(3,4-Dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-[α-L-ramnopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosiloxi]-4H-cromen-4-ona</i>

Naringina 580.54 g/mol	Es una flavanona glicosídica responsable del sabor amargo de algunos cítricos. Se utiliza en perfumería y para dale sabor amargo a golosinas y bebidas; posee propiedades hipocolesterolémicas, lo que reduce el nivel de colesterol en el plasma.⁴⁵  <i>7-2-O-(6-Deoxy-α-L-manopiranosil)-β-D-glucopiranosilo-2,3-dihidro-5-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona</i>
Nobiletina 402.39 g/mol	Es una flavona polimetoxilada; se han realizado experimentos, donde la nobiletina demuestra capacidad protectora frente al arterioesclerosis, la diabetes tipo 2 y la obesidad.⁴⁶  <i>2-(3,4-Dimetoxifenil)-5,6,7,8-tetrametoxicromen-4-ona</i>

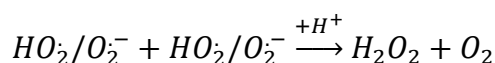
Los flavonoides se destacan por sus múltiples beneficios sobre la salud, principalmente por su capacidad antioxidante como se describirá a continuación.

2.3 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

Los radicales libres son moléculas que presentan un electrón desapareado en su estructura, generando una inestabilidad en su configuración espacial, siendo altamente reactivos con gran capacidad de combinarse con una variedad de moléculas integrantes de estructura celular, como lo son los lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas y los derivados de cada uno.⁴⁷ En concentraciones bajas los radicales libres trabajan como mensajeros estimulando la proliferación celular y/o la activación de las células.⁴⁸ No obstante, una concentración elevada de las ERO llevan a cabo alteraciones funcionales, generando un gran número de problemas fisiológicos como la aterosclerosis, el envejecimiento, el cáncer, la diabetes enfermedades cerebrales, entre otros.⁴⁹

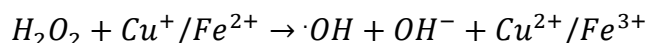
Algunas de las ERO son extremadamente más reactivas (radical hidroxilo) que otras (superóxido y peróxido de hidrógeno).⁵⁰ La reacción que más se destaca de los radicales superóxido, es la dismutación (Esquema 1), donde un radical superóxido reacciona con otro radical superóxido; uno es oxidado por el oxígeno y el otro se reduce a peróxido de hidrógeno.⁵¹

Esquema 1. Reacción de dismutación.⁵¹



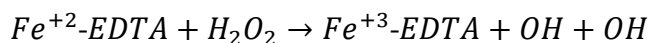
El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) no es un radical, pero su importancia radica en la facilidad de penetrar las membranas biológicas, su papel como intermediario en la producción de moléculas ERO y la formación de ·OH por medio de la oxidación de los metales de transición (Esquema 2).⁵⁰

Esquema 2. Radical hidroxil (·OH).⁵⁰



Los radicales superóxido son capaces de reaccionar con peróxido de hidrógeno, dando como resultado radicales altamente reactivos del hidroxilo;⁵⁰ esta reacción se conoce como Fenton (Esquema 3) y es catalizada por metales de transición, por lo general el hierro.³⁷

Esquema 3. Reacción de Fenton.⁵²

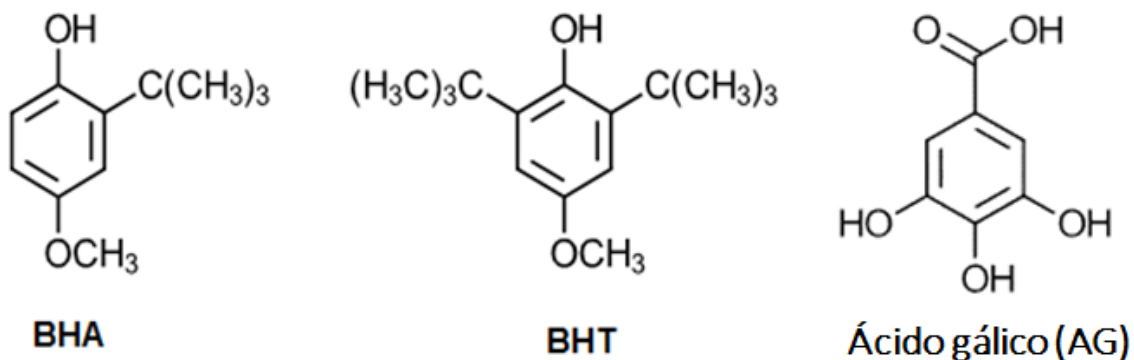


La importancia de los antioxidantes en la dieta y su considerado valor en la intervención de enfermedades cardiovasculares, han sido de gran interés durante los últimos años.⁵³ Los flavonoides son potentes antioxidantes, ya que pueden reducir el efecto de los radicales libres altamente oxidantes, mediante la formación menos reactiva de radicales flavonoides,⁵⁴ de esta manera pueden impedir, por ejemplo, la peroxidación lipídica, una de las acciones más importantes de los radicales libres, que conlleva a daños en la membrana celular e inclusive, la muerte de la célula. Otra actividad que realizan los flavonoides es limpiar el óxido nítrico que se forma en combinación con los radicales libres de superóxido, el peroxinitrito, el cual puede dañar gran variedad de moléculas celulares, incluyendo el ADN y las proteínas.⁵⁵

En los alimentos, la oxidación es causante de la pérdida del sabor, de la textura y de la calidad nutricional.⁵⁶ Para esto, la industria alimenticia ofrece por lo general antioxidantes sintéticos, ya que son más baratos, su pureza es controlada y tienen capacidad antioxidante uniforme; dentro de este grupo se encuentran BHA

(butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno) y los ésteres derivados del ácido gálico (galatos) (Figura 4).⁵⁷

Figura 4. Estructura de los antioxidantes sintéticos más utilizados por la industria alimenticia.^{22; 58}

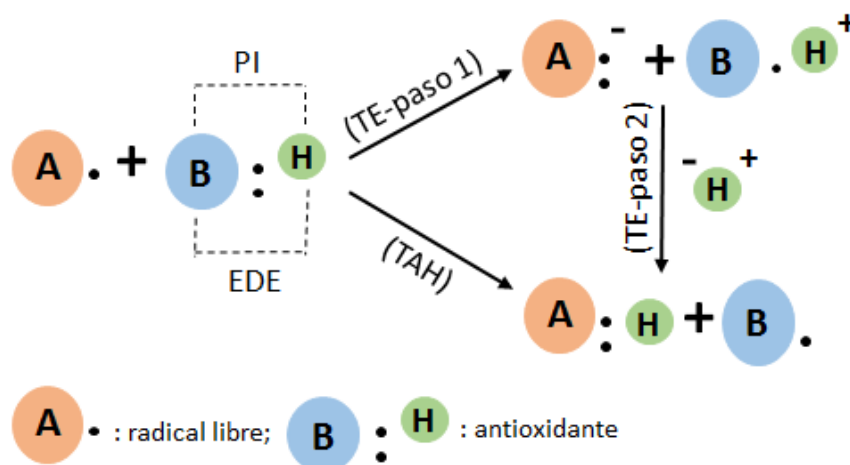


El uso de estos aditivos alimentarios sintéticos se está limitando, ya que pueden ser tóxicos y cancerígenos para el ser humano;⁵⁹ por esto, la industria alimenticia ha aumentado el uso de los aditivos naturales como las vitaminas C y E, flavonoides, fenoles, terpenos, presentes en las frutas y vegetales.⁶⁰

La mayoría de los métodos empleados para medir la actividad antioxidante de un compuesto o sustancia, se basan en la generación de radicales libres, obteniendo el punto final donde se detecta el radical.⁶¹ Un extracto con actividad antioxidante se utiliza para inhibir ese punto final, y capturar el radical libre generado.⁶²

Los antioxidantes reaccionan con los radicales libres por medio de dos mecanismos: TE (transferencia de electrones), TAH (transferencia de átomos de hidrógeno) o la combinación de ambos TE y TAH. En la reacción de TAH los radicales libres remueven un hidrógeno del antioxidante, convirtiéndose este último en un radical (Figura 5), aquí la entalpía de disociación del enlace (EDE) es un parámetro importante en la evaluación de la acción antioxidante. En el mecanismo TE, el antioxidante proporciona un electrón al radical libre convirtiéndose en sí mismo un catión radical (Figura 5); el potencial de ionización (PI) del antioxidante es el factor energético más importante en la evaluación de la acción antioxidante.⁶³

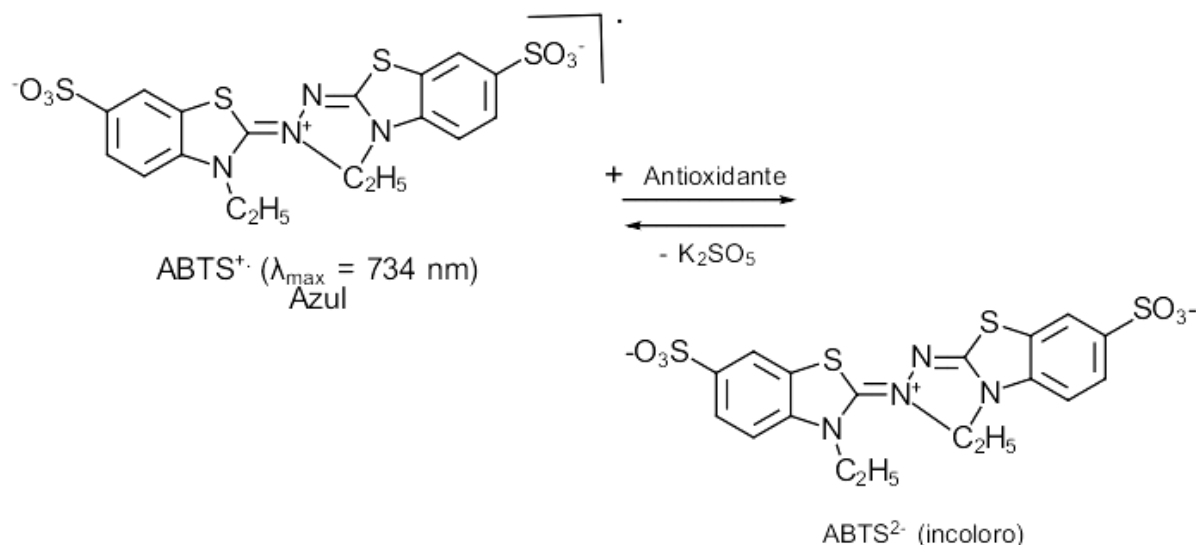
Figura 5. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones (TE) y transferencia de átomos de hidrógeno (TAH).⁶³



Uno de los métodos espectrofotométricos aplicados a la medición de la actividad antioxidante total de soluciones, sustancias puras y mezclas acuosas, es el del catión radical ABTS^+ (ácido-2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazonil-6-sulfónico).⁶⁴ Originalmente, el ensayo se basaba en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS, el cual generaba un radical catión en presencia o ausencia de antioxidantes. Esto fue cuestionado debido a que la rápida reacción de los antioxidantes podría contribuir a la reducción del radical ferrilmioglobina.⁶¹

La nueva técnica mejorada, consiste en la producción directa del cromóforo ABTS^+ verde-azul por medio de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Esquema 4); este presenta tres valores de absorbancia máximos de 645, 734 y 815 nm.⁶⁵ El punto final de la reacción lo marca la adición del antioxidante utilizado al radical pre-formado, reduciéndolo a ABTS; el nivel de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS^+ se determina en función de la concentración y el tiempo.⁶⁶ Los resultados se expresan con equivalentes de Trolox, el cual es empleado como reactivo estándar.⁴⁸

Esquema 4. Reacción del catión radical ABTS^{•+} en presencia de un antioxidante durante el ensayo ABTS.⁶⁵



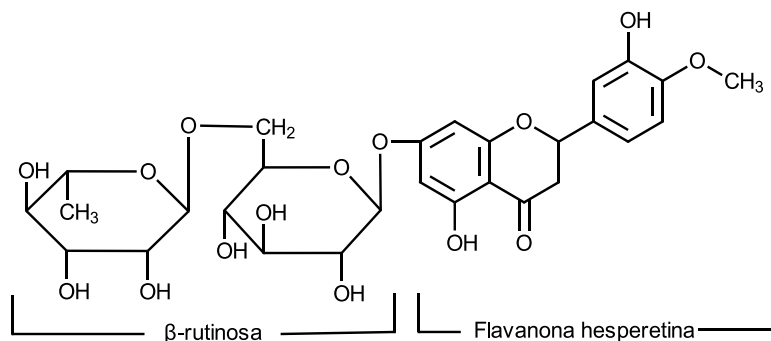
Nutracéuticos y suplementos alimenticios con frecuencia contienen grandes dosis de antioxidantes y, por lo general no se reconoce que el alto consumo de antioxidantes también puede tener efectos adversos, debido a que pueden mostrar actividades prooxidantes bajo ciertas condiciones, como altas dosis o la presencia de iones metálicos.⁵⁹ Un ejemplo de esto es el efecto prooxidante del tocoferol, similar al de la vitamina C, causada por el poder reductor del tocoferol que, además de eliminar los radicales libres, también es responsable de la reducción de los metales en estado de transición, facilitando la formación de radicales libres;⁶⁷ este efecto oxidante del tocoferol está implicado en el aumento de infartos de miocardio que se observó en un estudio clínico con suplementos de vitamina E.⁶⁸

2.4 HESPERIDINA

La hesperidina es un glucósido flavanona que comprende de una aglicona, hesperetina y un disacárido unido, rutinosa (Figura 6).⁶⁹ La hesperidina es una sustancia sólida fácilmente soluble en piridina, generando una solución de color amarillo claro; es ligeramente soluble en metanol, ácido acético glacial caliente y casi insoluble en acetona, benceno y cloroformo, tiene baja solubilidad en agua. En estado puro se produce como agujas y tiene un color entre blanco y amarillo pálido, es insípida e inodora; su fórmula molecular es $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$, con un peso molecular de 610.57 Daltons y un punto de fusión entre 258 y 260 °C.⁷⁰ La hesperidina posee una propiedad para formar cristales complejos con otros glucósidos similares, esto

puede afectar algunas propiedades físicas como la solubilidad y su obtención en estado puro. Tiene un espectro de absorción característico de flavanona, con máximos UV a 289 nm, con una inflexión de baja intensidad a 330 nm.⁴³

Figura 6. Hesperidina (flavanona glucósido).⁶⁹



La hesperidina posee actividad similar a la de las vitaminas, puede disminuir la permeabilidad y la fragilidad capilar (vitamina P), también posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antialérgicas. En combinación con la diosmina, un glucósido de flavona (Figura 7), es utilizada en Europa para el tratamiento de la insuficiencia venosa y se conoce comercialmente como Daflon-500M[®] (Figura 8), contiene hesperidina (50 mg) y diosmina (450 mg).⁷⁰ Con el paso del tiempo, la hesperidina ha adquirido gran importancia, ya que se han publicado un gran número de estudios que describen nuevas actividades farmacológicas, con objetivos moleculares y mecanismos de acción. Durante la última década, se han investigado los efectos de la hesperidina sobre el sistema nervioso central.⁷¹

Figura 7. Diosmina (diosmetina-7-ramnoglucósido).⁵⁸

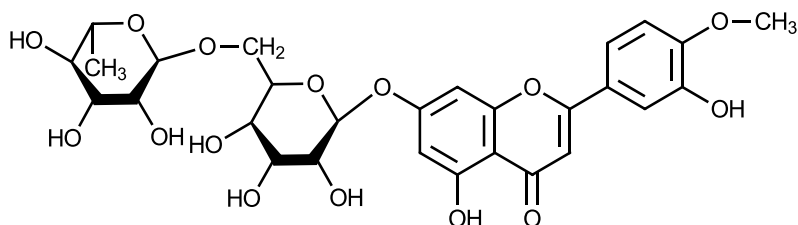


Figura 8. Daflon 500M®, 20 tabletas, Sanfer ⁷².



Laboratorios como SIGMA-ALDRICH comercializan hesperidina $\geq 80\%$ con un precio de \$ 48.10 USD 25 g, y 100 g a \$ 160 USD.⁷³

Tamilselvam, K. (2013),⁷⁴ investigaron los efectos neuroprotectores de la hesperidina, debido a su acción antioxidante puede mantener la función mitocondrial, estudio utilizado para la biopatología de la enfermedad de Parkinson tanto *in vitro* como *in vivo*; este estudio confirmó los efectos protectores de la hesperidina en la neurotoxicidad inducida mediante la normalización del estrés oxidativo y la inflamación. La hesperidina también ha mostrado resultados positivos para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, inducido en ratas.⁷⁵ Una baja cantidad de flavonoides en la dieta, se ha relacionado con la demencia; una cuarta parte de pacientes con enfermedad de Alzheimer, tenían deficiencia de flavonoides.⁷⁶

Marder (2003),⁷⁷ presentó el primer reporte de la presencia de la forma 2S de hesperidina en *Valeriana officinalis* L., donde describieron sus propiedades como sedante. En otro estudio realizado por Loscalzo (2011),⁷⁸ la hesperidina presentó actividad anticonceptiva en ratones después de la administración intraperitoneal, mas no por vía oral.

El efecto antidepresivo de la hesperidina comprende una vía óxido nítrico (NO) – guanosina monofosfato cíclico (cGMP) dependiente;⁷⁹ los resultados mostraron que el tratamiento crónico de la hesperidina tiene comportamiento antidepresivo en el Ensayo de Suspensión de Cola de Ratón (*Mouse Tail Suspension Test (TST)*, por su nombre en inglés). El estudio evaluó el efecto de la hesperidina en el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)*, por su nombre en inglés) como un agente importante en la fisiopatología de la depresión. La hesperidina incremento el nivel de BDNF en el hipocampo.⁸⁰

Rong y colaboradores (2013);⁸¹ realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* de la hesperidina sobre la Encefalopatía Hipóxico-Isquémica (*Neonatal Hypoxia-Ischemic Encephalopathy (HIE)*, por su nombre en inglés), una causa de daño cerebral que

conlleva a la discapacidad y la alta tasa de mortalidad en recién nacidos, es producida por la disminución del aporte de oxígeno (O₂) o una reducción mantenida de flujo sanguíneo cerebral al encéfalo. El pre-tratamiento de la hesperidina, redujo de forma significativa la pérdida de hipoxia-isquémica (*Hypoxia-Ischemic (HI)*, por su nombre en inglés) inducida cerebral y mejoró las respuestas neurológicas.

La hesperidina presenta efectos antihipertensivos; en el estudio realizado por Yamamoto y colaboradores (2013),⁸² suministraron dosis continuas de hesperidina (HE) y glucosil hesperidina (GHE) en ratas con hipertensión espontánea. Los resultados indicaron que la ingestión continua de HE y GHE, previene la hipertensión arterial por medio de la regulación de la expresión de genes que se relacionan con la modulación del tono vascular.

El cáncer de mama es de los más comunes en el mundo; estudios realizados por Natarajan y colaboradores (2011)⁸³ investigaron el impacto de la hesperidina en la línea celular del carcinoma mamario humano (MCF-7) y su posible rol en la inducción de la apoptosis. La apoptosis es una muerte celular programada por la misma célula, con el fin de mantener un control de la tasa de división y muerte celular, si no se necesitan células, estas se suicidan, de esta manera pueden controlar su desarrollo y crecimiento. La apoptosis hace posible la destrucción de células dañadas, con lo que evita enfermedades como el cáncer (replicación sin control de células dañadas).⁸⁴ Los resultados de la investigación mostraron que la hesperidina inhibió de forma significativa la proliferación de células MCF-7 *in vitro*.⁸³

También se han comprobado las actividades bactericidas *in vivo* e *in vitro* de la hesperidina contra *Aeromonas hydrophila*, un patógeno humano que puede causar infecciones invasivas y enfermedad gastrointestinal aguda, así mismo infecciones en tejidos blandos y sepsis.⁸⁵

La extracción, es el proceso más importante para la recuperación y el aislamiento de los compuestos bioactivos a partir de un material vegetal. A continuación, se describen los diferentes métodos de extracción para compuestos flavonoides.

2.5 EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE FLAVONOIDES

Las características que intervienen en el proceso de extracción están relacionadas con la naturaleza química de los compuestos, el método de aislamiento utilizado, el tamaño de la partícula y la presencia de sustancias que interfieren.⁸⁶

En el caso de los compuestos tipo flavonoides, los métodos de extracción más utilizados son:

2.5.1 Extracción asistida por Soxhlet: realiza extracciones de forma continua, empleando el mismo solvente que se evapora y condensa llegando de manera limpia al material.⁸⁶ *Ventajas:* debido al contacto constante entre la muestra y el disolvente, hay mayor eficacia en la extracción, no se requiere una posterior filtración, la instrumentación es sencilla y favorece la solubilidad del analito.⁸⁷ *Desventajas:* posee largos tiempos de extracción, mayor consumo de disolvente y no es adecuado para compuestos termolábiles, ya que se pueden descomponer.

2.5.2 Extracción asistida por ultrasonido: consiste en un fenómeno de cavitación producida en el disolvente por el paso de una onda ultrasónica; se forman burbujas de cavitación, y su energía causa la erosión de los sólidos contenidos en el medio líquido.⁸⁸ *Ventajas:* es de alta reproducibilidad y tiempos cortos, su manipulación es sencilla y requiere de un bajo consumo de disolvente, temperatura y energía.⁸⁹ *Desventajas:* Se requiere una filtración posterior, y el equipo es costoso.

2.5.3 Extracción asistida por microondas: las microondas son ondas electromagnéticas de alta energía, responsables de provocar cambios en la rotación molecular y en la movilidad iónica sin afectar la muestra; también pueden ser absorbidas sólo por la matriz, ocasionando el calentamiento de la muestra y liberación de solutos en el disolvente frío.⁹⁰ *Ventajas:* se requiere bajo consumo de disolvente y energía, la extracción es rápida, con menos costo, se pueden controlar los parámetros de extracción, se pueden lograr altas temperaturas y presiones.⁹¹ *Desventajas:* se requiere de filtración posterior y los equipos pueden ser costosos.

2.5.4 Extracción asistida por supercrítico: el solvente de extracción se encuentra en su estado supercrítico, es decir, tanto la presión como la temperatura están por encima de los valores críticos. Poseen propiedades intermedias entre gas y líquido. El sistema se compone de una bomba de alta presión que suministra el fluido y una célula de extracción que contiene la muestra, que se mantiene a la presión y temperatura adecuada.⁹⁰ *Ventajas:* los extractos son limpios debido al uso de disolventes “verdes” como el dióxido de carbono (CO₂), facilita la disolución de los solutos, tiene facilidad de separación de la matriz, las extracciones son rápidas y eficientes.⁸⁶ *Desventajas:* el equipo es costoso debido a las altas presiones que debe alcanzar, el CO₂ utilizado, también es de alto costo debido a la pureza requerida.⁹²

El aislamiento de flavonoides ha sido un tema de interés desde hace años. En 1828, el químico francés Leberton aisló por primera vez la hesperidina del albedo de la naranja;⁷⁷ también fue detectada en limones por Pfeiffer en 1874.⁹³ La neohesperidina es un isómero de la hesperidina, y junto con ella, ha sido aislada de

naranjas agrias inmaduras cultivadas en Europa.⁵⁸ Horowitz y Gentili (1960)⁹⁴ aislaron hesperidina del limón ponderosa; también se aisló del naranjo *Citrus mitis* por Sastry y Row (1961).⁹⁵ Ikan (1991)⁹³ propuso dos métodos para aislar la hesperidina: uno es por extracción de la cáscara seca con éter de petróleo (remueve el aceite esencial) y metanol (remueve el glucósido). El otro método es por extracción alcalina de cáscara de naranja picada y la acidificación del extracto.

El-Nawawi (1995),⁹⁶ extrajo hesperidina de la cáscara de naranja, por medio de un tratamiento con Ca(OH)_2 . El mayor rendimiento de hesperidina fue de 15,5 g/ 2 kg de cáscara, también se observó que este rendimiento se dio en naranjas en estado inmaduro.

Londoño-Londoño (2010),⁹⁷ realizaron extracciones de flavonoides de cáscaras de frutas cítricas (lima, naranja y mandarina), empleando el método de extracción por ultrasonido con las siguientes condiciones: frecuencia de 60 kHz, tiempo de extracción de 60 min y una temperatura de 40°C, utilizando metanol como solvente. Obtuvieron como resultados $40,25 \pm 12,09$ mg de flavonoides / g de cáscara. Para determinar la composición de los extractos, emplearon HPLC/MS; en los extractos de cáscara de naranja se identificaron compuestos como la hesperidina, neohesperidina, diosmina, nobiletina y tangeritina, mientras que en los de la cáscara de mandarina determinaron la presencia de hesperidina y neohesperidina.

Ma y colaboradores (2008),²¹ aislaron 57 mg de hesperidina de 1 g de cáscara de mandarina seca; el método de aislamiento fue la extracción asistida por ultrasonido y las variables estudiadas fueron: naturaleza del disolvente (metanol, etanol e isopropanol), la frecuencia (20, 60 y 100 kHz) y la temperatura (30, 40 y 50°C). El metanol fue el mejor disolvente; se obtuvo mayor proporción de hesperidina a una frecuencia de 60 kHz, en un tiempo de extracción de 60 min a 40°C.

Por otro lado, Inoue y colaboradores (2010),⁹⁸ emplearon el método de extracción asistida por microondas, obteniendo 58,6 mg de hesperidina por 1 g de cáscara de *Citrus unshiu*, una especie de mandarina; utilizaron metanol como solvente. En tanto que, Makovsek (2013),⁹⁹ reportó que pudo aislar 61,3 mg de hesperidina de 1 g de cáscara de mandarina, los mejores resultados se obtuvieron utilizando una solución de acetona 70%, a 60°C, 90 minutos, con una proporción de material y disolvente 1/50 g/mL en tres etapas de extracción.

Khan y colaboradores (2010);⁸⁹ utilizaron la extracción asistida por ultrasonido, y obtuvieron 205,2 mg de hesperidina / 100 g de cáscara fresca de naranja; las condiciones óptimas empleadas fueron la temperatura a 40°C, una potencia de ultrasonido de 150 W y una proporción de etanol-agua 4:1 (v/v).

Karpakavalli y colaboradores (2012);¹⁰⁰ realizaron una comparación entre el método convencional (lavado con metanol caliente y recristalización ácida) para aislar

hesperidina y asistido por microondas (160 W de intensidad y 15 min de irradiación) siendo este último método en el cual se obtuvieron los mejores resultados.

Lahmer y colaboradores (2015);¹⁰¹ aislaron hesperidina de pieles de naranja y mandarina, por medio de un reflujo con metanol, cristalizaron con ácido acético (6%) y purificaron empleando dos metodologías: con dimetilsulfóxido y con cloroformo. La hesperidina aislada de la mandarina corresponde al 1.75% y de la naranja dulce el 2.4%.

2.6 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FLAVONOIDES

A continuación, se describen los métodos colorimétricos y los espectrofotométricos empleados en el desarrollo de este trabajo.

2.6.1 Ensayos de coloración

Los flavonoides se pueden identificar experimentalmente por medio de diferentes ensayos de coloración, los cuales se describen a continuación.

PRUEBA DE SHINODA: los flavonoides con núcleo benzopirona generan coloración rojiza cuando a sus soluciones acuosas se les adiciona magnesio y ácido clorhídrico concentrado.¹¹

PRUEBA PARA TANINOS: los taninos son compuestos fenólicos presentes en las plantas, son solubles en agua y tienen pesos moleculares entre 500 y 3000, se caracterizan por reaccionar y precipitar a los alcaloides, gelatina y otras proteínas.¹⁰² Un ejemplo de estos es el ácido gálico (Figura 4). Estos compuestos se precipitan en presencia de cloruro férrico, debido al ataque producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo, generando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (formación del complejo color azul verdoso).¹⁰³

2.6.2 Espectroscopía ultravioleta-visible: la espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en la absorción de la radiación UV-vis por una molécula, causando que algunos electrones pasen de un estado de energía basal a uno excitado.⁶⁶ Para esto, se emplea un espectrofotómetro donde se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por la solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración.¹⁰⁴

Las variantes estructurales que existen dentro de la familia de los flavonoides, absorben dentro de un rango que va desde los 220 a los 600 nm; por lo general

presentan dos máximos de absorción que varían en intensidad y en longitudes de onda, según la naturaleza del núcleo del flavonoide.¹⁰⁵

2.6.3 Cromatografía de capa fina (CCF): la cromatografía de capa fina es una técnica empleada para analizar mezclas por separación de los compuestos presentes en ella,¹⁰⁶ involucra varios procedimientos; primero, se aplica una solución hecha a partir de la muestra en una pequeña zona de la placa revestida; la placa se deposita en un recipiente sellado que contiene un pequeño volumen de una mezcla del disolvente apropiado, a medida que esta mezcla se desplaza hacia arriba de la placa, los compuestos de la muestra se desplazan a diferentes velocidades debido a su interacción con el revestimiento de la placa (fase estacionaria) y el sistema de disolvente en movimiento (fase móvil); la placa se retira y se visualizan los compuestos generalmente haciéndolos reaccionar con un reactivo que producen puntos visibles o fluorescentes cuando se observan con luz normal o ultravioleta.¹⁰⁷ Se denomina R_f a la relación entre la distancia recorrida por el compuesto y la recorrida por el disolvente en el mismo tiempo, estos valores varían según el compuesto y el disolvente; el máximo valor que se puede alcanzar es de es 1, lo ideal es un R_f entre 0.65 y 0.7.¹⁰⁸

Los polifenoles se pueden identificar gracias a sus propiedades de fluorescencia en la luz ultravioleta, a sus valores de R_f y a sus características espectrales. Se han identificado una gran variedad de compuestos fenólicos empleando la cromatografía en capa fina, como la naringenina, hesperetina, eriodictiol, kaempferol, quercetina, naringina, hesperidina, rutina, catequina, entre otros.¹⁰⁹

2.6.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD): la cromatografía líquida de alta eficiencia es el método más empleado para la separación de mezclas complejas con contenido de compuestos no volátiles como algunos flavonoides presentes en los extractos a partir de diferentes muestras.¹¹⁰

Las condiciones cromatográficas de los métodos de HPLC incluyen el uso de casi exclusivamente una columna C₁₈ de fase inversa, UV-vis detector de diodos, y un sistema disolvente binario que contiene agua acidificada (disolvente A) y un disolvente orgánico polar (disolvente B).⁵ El detector de arreglo de diodos (DAD) es una herramienta indispensable para identificar las principales estructuras de los compuestos fenólicos presentes en los alimentos, las diferencias espectrales pueden ser útiles para distinguir entre estructuras flavonoides (flavan-3-ol, flavonoles, flavonas, isoflavonas y flavanonas), así como estructuras de glucósidos y no glucósidos.¹¹¹

2.6.5 Espectroscopía infrarroja (IR): la espectroscopía IR trata con la parte infrarroja del espectro electromagnético, se utiliza tanto para identificar un compuesto como la composición de una muestra.¹¹² La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre $12800 - 10 \text{ cm}^{-1}$ y se divide en tres zonas: el IR lejano (aproximadamente $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$) está adyacente a la región de microondas, es de baja energía y se puede usar en espectroscopia rotacional; el IR medio (aproximadamente $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) se emplea para el estudio de las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional; y el IR cercano ($14000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) puede excitar vibraciones armónicas.¹¹³

Una de las grandes ventajas de la espectroscopía IR es su versatilidad, permite el estudio de cualquier muestra independientemente del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, pastas, polvos, fibras, films, gases entre otros.¹¹⁴ En el caso de los flavonoides la espectroscopía vibracional se ha empleado para estudiar sistemáticamente los grupos hidroxilo y carbonilo, así mismo los efectos de los sustituyentes de la geometría de la molécula, particularmente los ángulos diedros, también en el análisis intramolecular e intermolecular del enlace del hidrógeno con otro flavonoide o con moléculas del disolvente.¹¹⁵

2.6.6 Cristalografía de Rayos X: la cristalografía de rayos X es una técnica que emplea un haz de rayos X que atraviesa un cristal, al entrar en contacto, el haz se divide y toma diferentes direcciones debido a la simetría y agrupación de los átomos y, por difracción, da lugar a un patrón de intensidades que se interpretan según la ubicación de los átomos de los cristales.¹¹⁶ Muchos materiales forman cristales, como las sales, los metales, las moléculas orgánicas y biológicas, en especial las proteínas; por otro lado, los flavonoides forman solamente cristales en condiciones ocasionales, siendo el número reportado de estos muy bajo.¹¹⁷

No obstante, la cristalografía de rayos X tradicional se ha empleado para identificar las interacciones π (π) intermoleculares que dirigen el apilamiento de agliconas paralelas para formar capas supramoleculares, también para identificar los residuos de aminoácido implicados en la formación de complejos de proteínas-flavonoides, críticos para la circulación de los flavonoides en los mamíferos.¹¹⁸

Recientemente la difracción de rayos X en polvo se ha empleado solo o en conjunto con RMN en estado sólido, con el fin de obtener estructuras de flavonoides, en especial de las catequinas.¹¹⁹

2.6.7 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN): la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), es una técnica capaz de realizar un análisis completo de forma estructural y conformacional de moléculas complejas, así mismo análisis cuantitativos de mezclas complejas y la medición de la velocidad de reacción tanto de los sistemas químicos en el tubo de ensayo como en los organismos vivos, incluyendo los seres humanos.¹²⁰

Esta técnica determina las estructuras de los flavonoides, aunque está limitada debido a una baja sensibilidad, un rendimiento lento y algunas dificultades en el análisis de las mezclas.¹¹⁵ Sin embargo, algunos hechos recientes han convertido el RMN en una herramienta importante para la especificación completa de la estructura de los flavonoides, ya que es posible hacer asignaciones de todas las señales de protones y carbonos en los espectros de RMN para la mayoría de los flavonoides aislados de bajo peso. Estas asignaciones se basan en los desplazamientos químicos (δ) y en las constantes de acoplamiento (J) observadas en los espectros 1D del ^1H y del ^{13}C combinados con correlaciones vistas como señales cruzadas en los experimentos de RMN en 2D homo y heteronucleares.¹¹⁷

Los solventes más utilizados en RMN para análisis de flavonoides son el dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-d_6) y el metanol tetradeuterado (CD_3OD); la elección del solvente depende de la solubilidad del analito, la temperatura del ensayo, la viscosidad del solvente y la facilidad con que el flavonoide se puede recuperar a partir del disolvente después del análisis.¹¹⁷

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 ASPECTOS GENERALES

3.1.1 Equipos menores. En esta investigación se usaron los siguientes equipos: balanza analítica (OHAUS PA214); horno (GEMMY 888); licuadora con jarra de vidrio refractario con programa Auto-Blend (Oster®, 16 velocidades; 450 vatios); ultrasonido (ULTRASONIK NEY modelo 57H); manta de calentamiento (E&Q Equipos, electrónica y químicos M-250); rotoevaporador (IKA RV 10 control; IKA HB 10 control); centrífuga (Hettich ZENTRIFUGEN, D-78532 Tuttlingen, disponible en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad del Norte, Barranquilla); espectrofotómetro UV-Vis (Agilent 8453); equipo UV-vis BMF FLUOstar OPTIMA; ultrasonido (Fisher Scientific™ 1,9 L CPXH, disponible en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad del Norte, Barranquilla).

3.1.2 Reactivos. Durante la realización del proyecto se emplearon diferentes reactivos y disolventes: éter de petróleo (Merck, 90%); etanol (Merck, 99%); etanol industrial (Arquilab, 96%); magnesio en cinta (Merck, 99.5%); ácido clorhídrico (Merck, 32%); cloruro de hierro III (Merck, 98%); persulfato de potasio (Sigma-Aldrich, 99%); Ácido-2,2'-Azinobis-3-etil-Benzotiazonil-6-Sulfónico (ABTS) (Sigma-Aldrich, 99%); Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich, 99%); Butilhidroxianisol (BHA) (Sigma-Aldrich, 99%); Butilhidroxitolueno (BHT) (Merck, 99%); α -Tocoferol (Sigma-Aldrich, 99%); cloruro de aluminio (Alfa Aesar, 99.8%); nitrito de sodio (Merck, 99.5%); quercetina (MP biomedical); hidróxido de sodio (Merck, 98%); reactivo Folin-Ciocalteu (Panreac); carbonato de sodio (Merck, 99.9%); ácido acético (Merck, 99%); acetona (Merck, 98%); metanol (Merck, 99%); ácido fosfórico (Merck,); hesperidina (Sigma-Aldrich, 98%); acetato de potasio (Panreac); ácido gálico (Carlo Erba).

3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS A PARTIR DE LA CÁSCARA DE MANDARINA

3.2.1 Recolección y preparación del material vegetal:

El objeto de este trabajo de investigación es emplear residuos sólidos de frutos cítricos provenientes de diferentes fuentes (hogar, mercado, fruterías, sitios comerciales), en este caso, las cáscaras de mandarina para la obtención de compuestos de valor agregado, tipo flavonoides. Considerando lo anterior, establecer una taxonomía a los frutos empleados en el trabajo no aplica en este caso. No se busca establecer el contenido de hesperidina según la especie de la mandarina, simplemente, generar un valor agregado a partir de los residuos de estos frutos.

Se seleccionaron las cáscaras de mandarinas en buen estado y se lavaron para eliminar impurezas, las cuales se secaron en un horno a 60 °C durante 24 h, luego fueron trituradas en una licuadora con el fin de disminuir el tamaño de partícula y facilitar la extracción. Para el desengrase del material vegetal se realizó un reflujo empleando un equipo de extracción líquido -sólido tipo Soxhlet, empleando 50 g de cáscara seca y 250 mL de éter de petróleo,¹¹ con cuatro repeticiones para cada extracto. En la Figura 9 se puede observar este procedimiento.

Figura 9. Preparación del material vegetal a partir de residuos de cáscaras de mandarina.



Mandarinas en estado fresco para consumo recolectadas del área metropolitana de Bucaramanga



Residuos de la mandarina empleados para el desarrollo de esta investigación



Secado de las cáscaras empleando un horno GEMMY 888



Desengrase de cáscara de mandarina empleando un equipo Soxhlet



Triturado de las cáscaras secas

FUENTE: Autora

3.2.2 Determinación del porcentaje de humedad relativa del material vegetal

El porcentaje de humedad, se determinó por el método gravimétrico (diferencia de peso). Para esto, se pesó la cáscara en estado fresco en una balanza analítica; luego de secar las cáscaras por 24 h a 60°C, se pesó nuevamente y el porcentaje se determinó por diferencia de peso empleando la siguiente ecuación:

Ecuación 1.
$$\frac{\text{Peso de la cáscara fresca (g)} - \text{Peso de la cáscara seca (g)}}{\text{Peso de la cáscara fresca (g)}} * 100$$

3.2.3 Extracción asistida por ultrasonido.

Como método de obtención de las muestras a estudiar se empleó la extracción asistida por ultrasonido (US), para lo cual se utilizó un equipo de ultrasonido, el cual operó a una frecuencia de 48 kHz, con una potencia de 335 W, a una temperatura aproximada de 70 °C,²¹ (Figura 10). Se pesaron 50 g de material vegetal (cáscara de mandarina seca y desengrasada), se le adicionaron 250 mL de etanol industrial y se sonicó durante 1 h. Este procedimiento se realizó cuatro veces para cada uno de los cinco extractos. Luego, la muestra se filtró y el extracto se concentró por medio de una destilación rotativa a presión, empleando un rotoevaporador acoplado a una bomba de vacío.

Figura 10. Ultrasonido empleado para la extracción, disponible en el Laboratorio de Investigaciones de Química Ambiental de la Universidad Santo Tomás, Bucaramanga.



FUENTE: Autora

Una vez obtenido el extracto, se determinó el porcentaje de rendimiento de la extracción aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 2.
$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto seco}}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

Los extractos se envasaron en frascos ámbar y se refrigeraron hasta su uso. Se obtuvieron cinco extractos etanólicos.

3.3 PRUEBAS COLORIMÉTRICAS

Se realizaron las pruebas colorimétricas correspondientes para determinar la presencia de flavonoides y taninos.

PRUEBA DE SHINODA: se tuvo en cuenta la metodología propuesta por Vinod K. y colaboradores (2010)¹²¹. Se tomaron 4 mg de extracto y se disolvieron en 1 mL de etanol al 95%; se le adicionaron virutas de magnesio y gotas de ácido clorhídrico concentrado. La aparición de un color naranja, rojo, rasado o violeta indica que la prueba es positiva.

PRUEBA DE TANINOS: se tuvo en cuenta la metodología empleada por Mamta (2012)¹²². Se tomaron 3,5 mg de extracto y se disolvieron en 1 mL de etanol; luego, se le adicionaron unas gotas de la solución tricloruro de hierro al 5%. La aparición de un color negro o negro-azulado indica un resultado positivo.

3.4 CUANTIFICACIÓN POLIFENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CÁSCARAS DE MANDARINA

3.4.1 Cuantificación de polifenoles totales:

Para determinar el contenido de polifenoles totales en los extractos de cáscara de mandarina, se empleó la metodología propuesta por Özcan en el 2006.¹²³

Se preparó una solución de ácido gálico ($C_7H_6O_5$) a una concentración de 5 000 ppm. Luego, se preparó una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 10% (P/V).

Preparación de la curva de calibración: se prepararon patrones de 50 a 500 ppm de la solución de ácido gálico. Se le adicionó una alícuota de 6,5 mL de agua desionizada y 500 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu se agitó con vortex y se dejó reposar durante 8 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se le adicionaron 3 mL del carbonato de sodio, se agitó nuevamente con vortex y se dejó en baño maría durante 30 minutos a una temperatura de 30°C.

Preparación de las muestras: Los extractos se prepararon a una concentración de 55 000 ppm. Se tomaron 20 μ L de esta solución en tubos de ensayo y se realizó el mismo procedimiento para los patrones de la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico / g de extracto seco.

Para cada una de las muestras este procedimiento se realizó por sextuplicado y los valores presentados corresponden a la media $\pm$ desviación estándar.

3.4.2 Cuantificación de flavonoides totales

Para determinar el contenido de flavonoides totales se empleó la metodología propuesta por Chang y colaboradores en el 2002.¹²⁴

Se preparó un patrón de quercetina a una concentración de 1 000 ppm; posteriormente se preparó una solución de acetato de potasio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) 1 M y una solución de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10%.

Preparación de la curva de calibración: Se prepararon patrones de 20 a 100 ppm en tubos de ensayo; se le adicionaron 1,5 mL de etanol al 95%, luego se le añadieron 100 μL de la solución de cloruro de aluminio al 10% y 100 μL de acetato de potasio, se agitó con vortex y posteriormente se le adicionaron 2,8 mL de agua desionizada. Se agitó con vortex nuevamente y se dejó en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente.

Preparación de las muestras: Los extractos se prepararon a una concentración de 19 000 ppm; se tomaron 500 μL de cada muestra y se realizó el mismo procedimiento para los patrones. Los resultados se expresan como mg de quercetina / g de extracto seco.

Para cada una de las muestras este procedimiento se realizó por sextuplicado y los valores presentados corresponden a la media $\pm$ desviación estándar.

Para la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides, se empleó un espectrofotómetro UV-Vis (Figura 11). La absorbancia para polifenoles totales se leyó a una longitud de onda de 765 nm y, para flavonoides totales la absorbancia se midió a 415 nm.

Figura 11. Espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453, disponible en el Laboratorio de Investigaciones de Química Ambiental de la Universidad Santo Tomás, Bucaramanga.



FUENTE: Autora

3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CÁSCARAS DE MANDARINA POR EL MÉTODO DE CATIÓN RADICAL ABTS⁺.

Se empleó la metodología descrita por Re y colaboradores en 1999⁶¹ con las modificaciones propuestas por Muñoz y colaboradores en el 2010.¹²⁵

El catión radical ABTS, se preparó empleando persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) a 660 ppm, y ABTS a 2800 ppm en agua destilada. La solución se dejó en reacción durante 18 horas, en ausencia de luz y a temperatura ambiente. Se tomó una alícuota de la solución ABTS⁺ y se diluyó en etanol hasta obtener un valor de absorbancia cercano a 0,75.

Las soluciones stock de las muestras a evaluar (extractos) se prepararon pesando entre 2 y 5 mg, se diluyeron en forma seriada en microplacas de 96 pocillos hasta que, después de introducir alícuotas de 10 μ L de estas soluciones a la solución ABTS⁺ (200 μ L), se produjeron inhibiciones entre el 2 y 9 % de la absorbancia del blanco.

Las mediciones de absorbancia se realizaron en un lector de microplacas a 734 nm (Equipo UV-vis BMF FLUOstar OPTIMA, disponible en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad del Norte, Barranquilla), leyéndose 1 min después de la mezcla inicial y luego a los 30 min. La respuesta-concentración de las sustancias, como porcentaje de la absorbancia del catión-radical ABTS⁺ sin inhibir se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 3. } Inh. A_{734} (\%) = \left(\frac{A_B - A_M}{A_B} \right) \times 100$$

Dónde:

A_B = Promedio de la absorbancia de todos los blancos

A_M = Absorbancia transcurridos 30 minutos de la adición del ABTS a la muestra

El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó y se graficó como una función de la muestra problema, con los datos de la sustancia de referencia (Trolox[®]). Para cada sustancia se determinó la Actividad Antioxidante Total, TAA (Ecuación 4). Se realizaron blancos de disolvente en cada placa. Se utilizó como compuesto “control” la vitamina E (α -Tocoferol). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

$$\text{Ecuación 4. } TAA = \frac{mmol Trolox}{Kg Muestra}$$

3.6 OBTENCIÓN DE LA HESPERIDINA A PARTIR DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CÁSCARA DE MANDARINA

Después de obtener los extractos etanólicos, se procedió a precipitar la hesperidina presente en los mismos.

Se tomó 1 g de extracto y se le adicionaron 4 mL de ácido acético¹²⁶ previamente calentado, se llevó a ultrasonido a una temperatura de 50 °C hasta que se disolvió completamente. Se dejó reposar por 4 h aproximadamente hasta observar la presencia de una sustancia sólida de color amarillo. La muestra se centrifugó empleando una centrífuga con el fin de separar el sólido, el ácido se descartó y se realizaron 2 lavados más. Para eliminar los restos de ácido, el sólido se lavó con acetona, previamente calentada, se sonicó hasta disolver completamente y luego se centrifugó, obteniendo un sólido de color amarillo pálido.

3.7 CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA HESPERIDINA OBTENIDA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS.

La hesperidina obtenida a partir de los extractos etanólicos de la cáscara de mandarina fue caracterizada por técnicas físicas: p.f, *Rf* y espectroquímicas: IR, RMN (¹H, ¹³C).

3.7.1 Técnicas fisicoquímicas

Para determinar los puntos de fusión se empleó un fusiómetro Bibby scientific (disponible en el Laboratorio de Investigaciones y Ciencias Básicas de la Universidad Santo Tomás, Bucaramanga). Los *Rf* se calcularon mediante la técnica de cromatografía en capa fina, se emplearon placas de silica gel 60 con indicador F₂₅₄, sobre soporte de aluminio, revelándose por exposición a la luz UV en un Equipo Camag UV Cabinet 4 (disponible en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad del Norte, Barranquilla) ($\lambda=366$ nm).

3.7.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)

La hesperidina presente en los extractos etanólicos se cuantificó empleando un cromatógrafo líquido de alta eficiencia Ultimate 3000 (Thermo Dionex, Inc.) equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD-UV/Vis) y software Chromeleon 7 (7229.0003 Revision 1,0, Thermo Fisher Scientific, Inc) y Workstation Open (CM7 Bundle WSO). La columna empleada fue Capcell-Pack C₁₈ UG120 (250 mm x 4,6 mm ID x 5 μ m - Shiseido Co.) Este equipo se encuentra disponible en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad del Norte, Barranquilla.

Para la elución se utilizó una fase móvil A (metanol) y una fase móvil B (ácido fosfórico 0,25%). Se inyectó 15 µL de muestra en un sistema de gradiente de elución (Anexo 1)

3.7.3 Difracción de rayos X.

La muestra seleccionada de hesperidina aislada y el patrón de hesperidina fue montado en un portamuestra de polimetilmetacrilato (PMMA) mediante la técnica de llenado frontal.

El respectivo análisis se realizó en un difractómetro de polvo marca BRUKER modelo D8 ADVANCE con Geometría DaVinci (disponible en el Parque Tecnológico Guatiguará, sede UIS Piedecuesta), bajo las siguientes condiciones:

Voltaje	40(kV)
Corriente	40(mA)
Rendija de Divergencia	0,6mm
Rendijas Soller Primario	2,5°
Muestreo	0,01526° 2theta
Rango de Medición	4-50° 2theta
Radiación	CuKα1
Filtro	Níquel
Uso de Anti-dispersor de Aire	No
Detector	Lineal LynxEye
Tipo de barrido	A pasos
Tiempo de muestreo	2 segundos

3.7.4 Espectroscopía infrarroja.

Los espectros de infrarrojo se llevaron a cabo en el espectrofotómetro infrarrojo IR Shimadzu, modelo IRA Affinity-1 con transformada de Fourier (disponible en el Laboratorio de Investigaciones y Ciencias Básicas de la Universidad Santo Tomás, Bucaramanga). Las bandas de absorción más características se encuentran expresadas en cm^{-1}

3.7.5 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

Se empleó un espectrómetro Bruker AMX-400 (disponible en el Parque Tecnológico Guatiguará, sede UIS Piedecuesta), utilizando dimetil sulfóxido deuterado (DMSO- D_6) como disolvente. Los espectros se procesaron en el programa Mestrec.

Los valores de los desplazamientos químicos (δ) están expresados en ppm y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz.

Las abreviaturas utilizadas para indicar la multiplicidad de las señales son las siguientes: s = singlete, brs = singlete ancho, d = doblete, t = triplete, dq = doblete de cuartete, m = multiplete, dd = doblete de dobletes, dddd = doble doblete de doblete de dobletes, dq = doble cuartete, quin = quinteto, sext = sexteto, sep = septeto, oct = octeto.

3.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA HESPERIDINA AISLADA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CÁSCARA DE MANDARINA POR EL MÉTODO DE CATIÓN RADICAL ABTS⁺.

Se trabajó la misma metodología descrita en la sección 3.5 del texto.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La búsqueda de compuestos bioactivos ha tomado gran fuerza entre los científicos. La extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos presentes en subproductos de la industria alimentaria, como lo son las cáscaras de mandarina, tienen un fuerte potencial industrial en cuanto a la eficiencia y al cuidado del medio ambiente para el desarrollo de extractos ricos en antioxidantes naturales, los cuales pueden ser destinados a sustituir los antioxidantes sintéticos.⁸⁹

Debido a la importancia de la hesperidina para la industria farmacéutica y alimentaria, se han realizado varios esfuerzos por su extracción y purificación, lo que va ligado a la búsqueda de procedimientos de extracción.¹³ Este proyecto propone caracterizar empleando distintas técnicas cromatográficas y aislar la hesperidina a partir de extractos etanólicos de cáscaras de mandarina por medio del ultrasonido.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo.

4.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD RELATIVA DEL MATERIAL VEGETAL

Para determinar el porcentaje (%) de humedad relativa en las cáscaras de mandarina, se empleó el método gravimétrico teniendo en cuenta la ecuación 1.

En la Tabla 4 se puede observar que la cáscara de mandarina tiene un $65 \pm 2,02$ % de humedad en promedio para 10 frutos seleccionados.

Tabla 3. Porcentaje de humedad relativa presente en la cáscara de mandarina

Peso (g)		% Humedad
Cáscara fresca	Cáscara seca	
$18,90 \pm 2,43$	$6,64 \pm 1,10$	$65,03 \pm 2,02$

4.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE CÁSCARA DE MANDARINA

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) es una de las técnicas más empleadas no solo para las extracciones sólido-líquido, sino también para tratamientos de aguas residuales, secado y sonoquímica.¹²⁷ Su eficacia se debe a la acción de las burbujas de cavitación generadas durante la sonicación, cuando estas burbujas colapsan alteran la pared de la célula vegetal aumentando la liberación de compuestos extraíbles.¹²⁸ No obstante, es importante tener en cuenta las condiciones óptimas de temperatura, tiempo y potencia ya que un aumento de estos factores puede degradar algunos de los compuestos fenólicos.⁹

Para la extracción se emplearon 200 g de cáscara de mandarina seca y etanol industrial como disolvente, se realizaron 5 extractos, los resultados se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje (%) de rendimiento de los extractos etanólicos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido.

Extracto	Material vegetal (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)
1	200,0	14,0641	7,03
2		16,9306	8,47
3		12,8993	6,45
4		12,9219	6,46
5		15,3203	7,66

El rendimiento de la extracción siempre dependerá de factores como la masa y el tamaño en que se encuentran distribuidas las partículas sólidas, la agitación, el tiempo de contacto, la temperatura, el ultrasonido (potencia y frecuencia), la masa del volumen sólido / disolvente.¹²⁷

Al emplear cáscara de mandarina seca, se obtiene un mejor rendimiento en comparación con la cáscara fresca, ya que la seca tiene más porosidad y la tasa de disolvente puede ser mayor.⁹⁷

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la Tabla 4, se tiene que, por cada 200 g de cáscara de mandarina seca, se obtuvieron en promedio $14,43 \pm 1,7$ g de extracto con un rendimiento de $7,21 \pm 1,2$ %. En general, este rendimiento es considerado alto en comparación con los otros métodos de extracción, microondas y Soxhlet realizados anteriormente por Vargas en el 2013,¹²⁹ donde empleó cáscaras de mandarina seca.

4.3 PRUEBAS COLORIMÉTRICAS

Se realizaron las pruebas químicas preliminares para estimar de manera cualitativa la presencia o ausencia de flavonoides y taninos, los resultados se observan en la Figura 12.

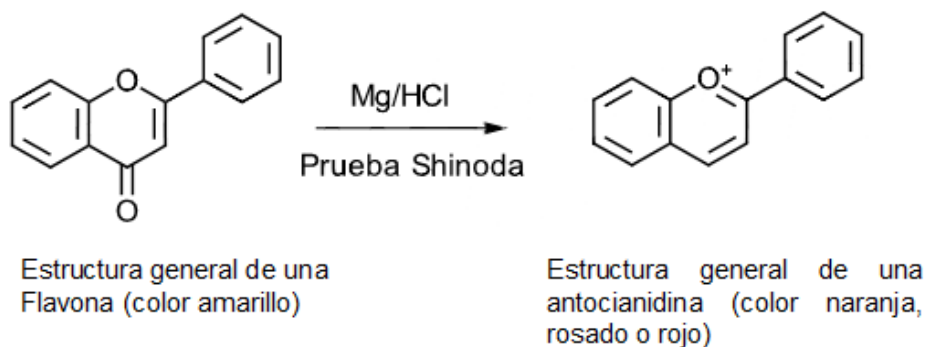
Figura 12. Resultados de las pruebas colorimétricas de Shinoda y de taninos realizada en los extractos.



FUENTE: Autora

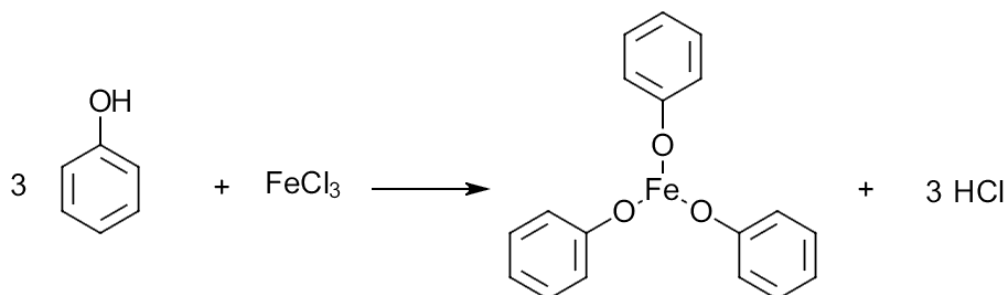
El color naranja en la prueba de Shinoda (Figura 12), pudo identificar la presencia de flavonoides en los extractos etanólicos de la cáscara de mandarina, esto se debe a que los flavonoides con núcleo benzopirona como las flavonas, flavonoles y flavanonas, generan una coloración rojiza cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de ácido clorhídrico concentrado (Esquema 5).¹¹

Esquema 5. Reacción general de la prueba Shinoda.¹³⁰



La prueba con tricloruro de hierro para determinar taninos, generó un resultado positivo (Figura 12); químicamente los taninos son polímeros de los polifenoles con 1 a 2 % de hidróxidos fenólicos libres y, precipitan en presencia de cloruro férrico, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro formando el complejo que se puede observar en un cambio de color (Esquema 6), generalmente oscuro.¹⁰³

Esquema 6. Reacción del fenol con cloruro férrico.



4.4 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CÁSCARAS DE MANDARINA

Una vez obtenido un resultado positivo en las pruebas colorimétricas para determinar la presencia de compuestos fenólicos en los extractos de cáscara de mandarina, se continuó a cuantificar estos compuestos empleando el reactivo Folin-Ciocalteu para fenoles y el tricloruro de aluminio (AlCl_3) para flavonoides.

En la Tabla 5 se pueden observar las absorbancias de las concentraciones de ácido gálico preparadas para obtener la curva de calibración correspondiente al método de Folin-Ciocalteu.

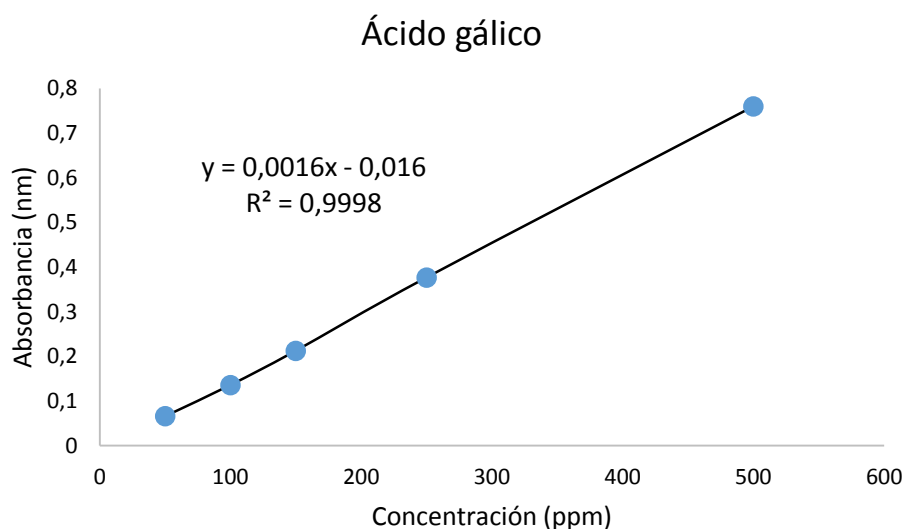
Tabla 5. Absorbancias obtenidas de las concentraciones de ácido gálico (AG) para determinar el contenido de polifenoles totales.

Concentraciones de AG (ppm)	Absorbancia a 765 nm*
50	0,0658 ± 0,00100
100	0,1358 ± 0,00030
150	0,2126 ± 0,00080
250	0,3768 ± 0,00076
500	0,7600 ± 0,00133

*Cada valor representa la media de 6 repeticiones ± la desviación estándar

En la Figura 13 se observa la curva de calibración del AG empleada para determinar el contenido de compuestos fenólicos presentes en la cáscara de mandarina.

Figura 13. Curva de calibración del ácido gálico



Por otro lado, el contenido de flavonoides se determinó mediante el método colorimétrico de $AlCl_3$, empleando la quercetina como patrón. Los resultados de las absorbancias a diferentes concentraciones de quercetina se encuentran en la Tabla 6.

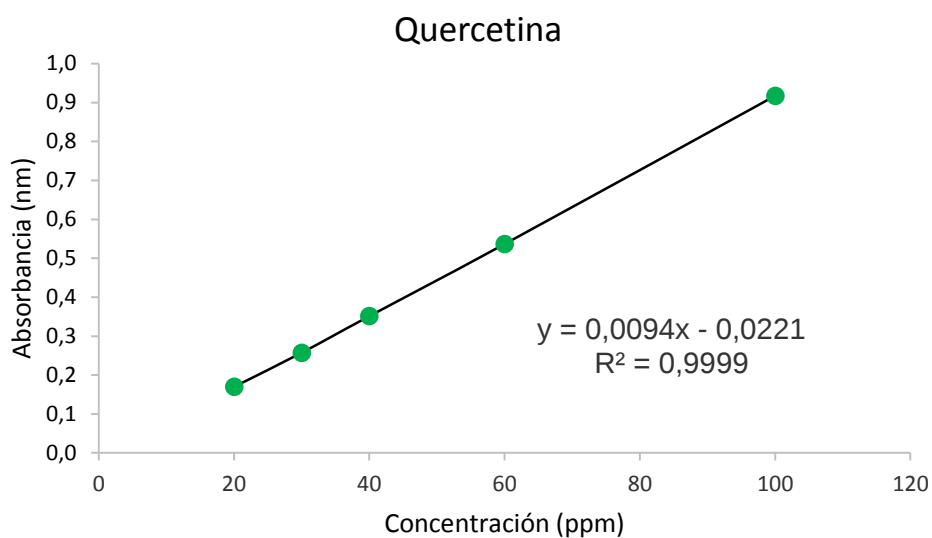
Tabla 6. Absorbancias obtenidas de las concentraciones de quercetina para determinar el contenido de flavonoides totales

Concentraciones de quercetina (ppm)	Absorbancia a 415 nm*
20	0,1697 ± 0,00039
30	0,2537 ± 0,00107
40	0,3511 ± 0,00098
60	0,5364 ± 0,00128
100	0,9171 ± 0,00132

*Cada valor representa la media de 6 repeticiones ± la desviación estándar

Con los resultados obtenidos en la Tabla 6, se realizó la respectiva curva de calibración (Figura 14).

Figura 14. Curva de calibración de la quercetina.



Una vez obtenida la ecuación de la curva de calibración, se determinó el contenido de polifenoles (Tabla 7) y flavonoides (Tabla 8) presentes en los extractos.

Tabla 7. Contenido de polifenoles totales presentes en los extractos etanólicos.

Extracto	Polifenoles totales		
	Concentración ppm (a*)	Abs. a 275 nm*	mg de AG/g de extracto seco
1	146,6	0,2148 ± 0,00097	18,74
2	155,0	0,2320 ± 0,00072	24,66
3	185,4	0,2806 ± 0,00043	21,66
4	190,8	0,2892 ± 0,00091	22,62
5	169,0	0,2545 ± 0,00230	23,50

Nota: AG: ácido gálico, *cada valor representa la media de 6 repeticiones ± la desviación estándar. Abs: absorbancia. a*: concentración determinada con la ecuación de la recta y la absorbancia de las muestras.

Tabla 8. Contenido de polifenoles totales presentes en los extractos etanólicos.

Extracto	Flavonoides totales		
	Concentración ppm (a*)	Abs. A 415 nm*	mg de quercetina/g de extracto seco
1	55,4	0,4982 ± 0,00332	0,41
2	56,1	0,5053 ± 0,00107	0,50
3	60,7	0,5483 ± 0,00169	0,41
4	61,3	0,5543 ± 0,00321	0,42
5	58,6	0,5290 ± 0,00247	0,47

Nota: *cada valor representa la media de 6 repeticiones ± la desviación estándar. Abs: absorbancia. a*: concentración determinada con la ecuación de la recta y la absorbancia de las muestras.

Londoño y colaboradores, 2010,⁹⁷ reportaron 66,4 mg AG/ g extracto en la cáscara de mandarina seca, empleando el ultrasonido como método de extracción y, agua en proporción 1:10 (g/ mL) como disolvente, este contenido es mayor al observado en el presente trabajo (18,74 – 24,66 mg AG / g extracto), no obstante, las condiciones de extracción fueron diferentes, emplearon un tiempo más corto (30 min) y temperatura más baja (40 °C). Esto indica que el tiempo, la temperatura y el tipo de disolvente empleado son variables que afectan la obtención de compuestos.

Al analizar la relación del contenido de flavonoides totales / polifenoles totales, se puede observar que los flavonoides representan el 2 % del contenido total de polifenoles presentes en los extractos; lo que indica que la mayor parte de compuestos fenólicos no solo corresponden a los flavonoides, sino también, según la literatura debido a su diversidad estructural¹³¹ se puede contar con la presencia de ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, taninos hidrolizables y condensados, lignanos, ligninas, entre otros.¹³²

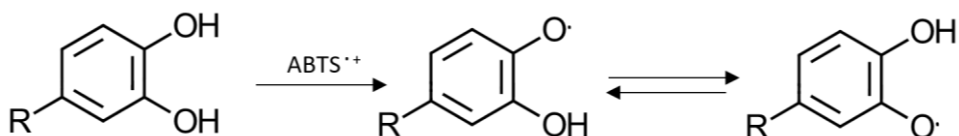
4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CÁSCARAS DE MANDARINA POR EL MÉTODO DE CATIÓN RADICAL ABTS⁺.

Existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vivo* o *in vitro*, siendo esta última, la técnica más aplicada para medir la capacidad antioxidante total de un compuesto, o un extracto obtenido a partir de un alimento, para lo cual se emplean especies cromógenas de naturaleza radical, las cuales al reaccionar en presencia de un compuesto antioxidante se decolora de manera proporcional a la concentración del mismo.¹³³

En una mezcla, la capacidad antioxidante, no solo se manifiesta por la contribución de cada uno de los componentes, sino también por el microambiente en la que se encuentra el compuesto de interés. Los métodos para determinar la capacidad antioxidante en los cuales se emplean compuesto cromógenos son ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP.

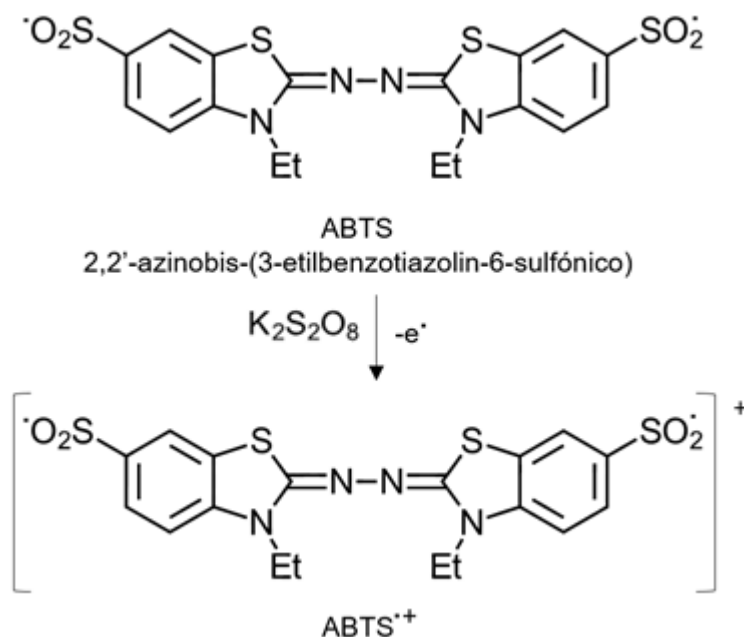
En este caso, el método seleccionado para determinar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de las cáscaras de la mandarina y de la hesperidina fue el ABTS (Esquema 7), con el cual se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica. Este método de radical ABTS⁺, es uno de los más aplicados, por su elevada sensibilidad, practicidad, rapidez y estabilidad.

Esquema 7. Reacción del catión radical ABTS^{•+} con compuestos fenólicos.⁶¹



Para generar el catión radical del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+}), se le adicionó persulfato de potasio (K₂S₂O₈) a una solución acuosa de ABTS (Esquema 8), esta se dejó reaccionar durante 18 horas en ausencia de luz y a temperatura ambiente formando un color verde-azulado. Los antioxidantes decoloran la solución, presentando tres valores de absorbancia máximos: 645, 734 y 815 nm. Las lecturas se realizaron a 734 nm.

Esquema 8. Formación del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$.¹³⁴



La respuesta-concentración de las sustancias, como porcentaje de la absorbancia del catión-radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, sin inhibir se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Inh. } A_{734} (\%) = \left(\frac{A_B - A_M}{A_B} \right) \times 100$$

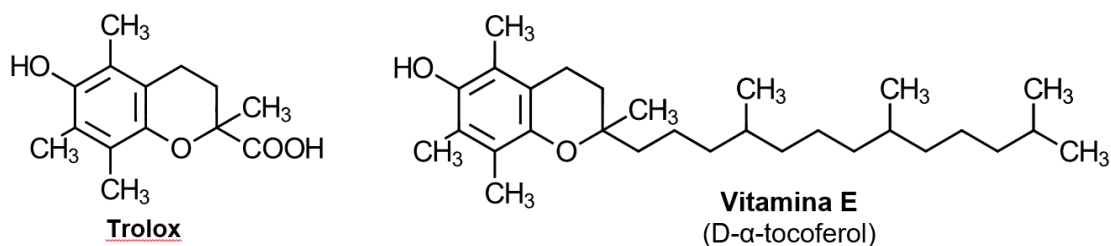
Dónde:

A_B = Promedio de la absorbancia de todos los blancos

A_M = Absorbancia transcurridos 30 minutos de la adición del ABTS a la muestra

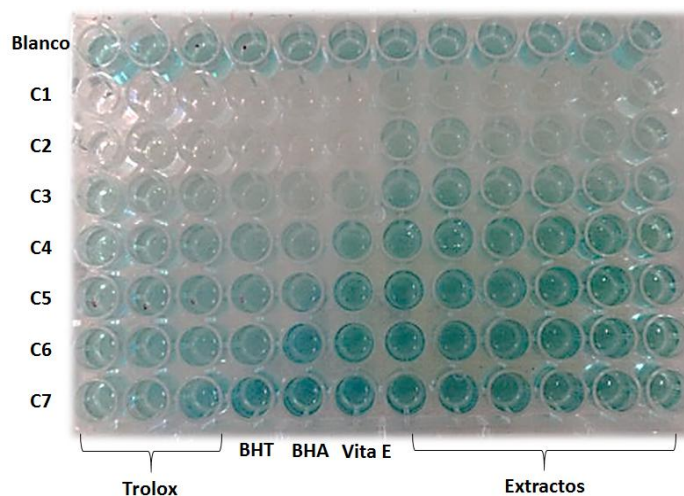
Se determinaron los valores de actividad para los “controles”, los cuales están reportados en la literatura. Se determinó el TAA para el BHT, el BHA (Figura 4) y la vitamina E (Figura 15) empleando el Trolox como referencia (Figura 15). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Figura 15. Estructura química del Trolox y de la vitamina E.¹³⁵



Inicialmente, se obtuvieron las curvas % de inhibición vs concentración para el Trolox y los antioxidantes; todos los extractos, incluido los patrones (Trolox, BHT, BHA y Vitamina E) y el blanco (20 μ L EtOH + 200 μ L ABTS) se organizaron en una micro placa de 96 pocillos (Figura 16)

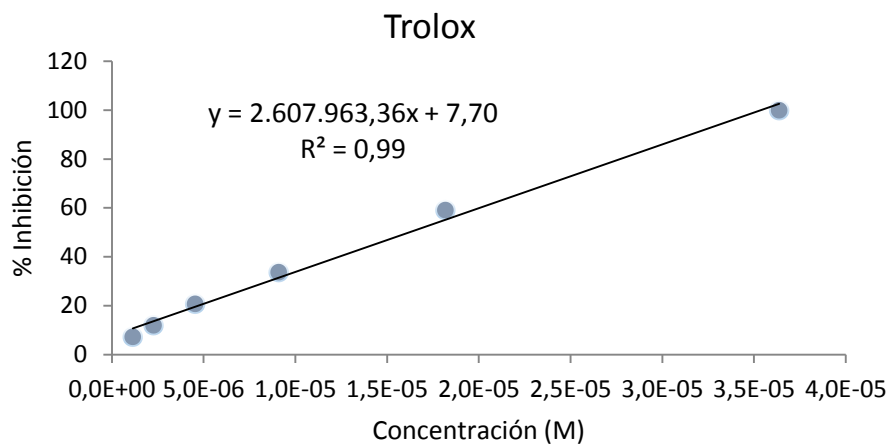
Figura 16. Microplaca donde se analizaron los seis extractos, los controles, el Trolox y una fila de blanco.



FUENTE: Autora

La primera curva que se realizó fue la del Trolox, ya que la pendiente es necesaria para calcular los valores de TAA para los antioxidantes comerciales y los de investigación. En la Figura 17 se puede observar la gráfica obtenida para una de las réplicas del Trolox y su respectiva pendiente.

Figura 17. Gráfica del efecto de concentración del Trolox vs % de inhibición del ABTS⁺ con absorbancias medidas a los 30 minutos de reacción.



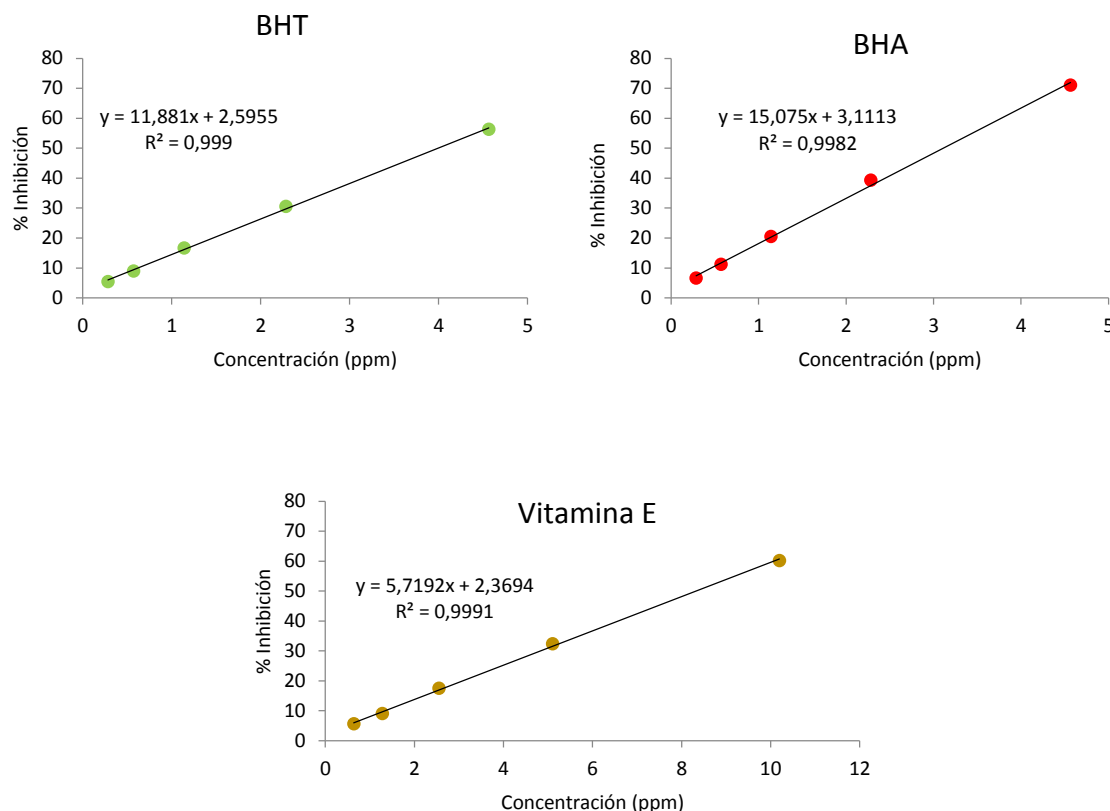
Compuesto	Concentración (M)	SD*	CV (%)
Trolox	0,019876	1,08E-04	0,54

*SD: Desviación estándar relativa para n = 3 réplicas.

FUENTE: Autora

Después de calcular la pendiente para el Trolox, se realizó el mismo procedimiento para el BHT, el BHA y la Vitamina E; en la Figura 18 se pueden observar las gráficas correspondientes para estos compuestos.

Figura 18. Gráficas del efecto de inhibición del ABTS⁺ por el BHT, BHA y la vitamina E, como % de inhibición vs concentración (ppm).



FUENTE: Autora

Con los valores de las pendientes de cada compuesto (Figura 18) y del Trolox (Figura 17), se calculó el valor del TAA (Ecuación 4) para los compuestos de referencia. En la Tabla 9 se encuentran los resultados obtenidos.

Tabla 9. Valores de TAA de las sustancias “control” obtenidos en el laboratorio y los encontrados en la literatura.

Compuesto	Concentración (ppm)	TAA $\pm$ SD*	CV %
BHT	200	5171,4 $\pm$ 295,1	5,7
BHA	200	6936,5 $\pm$ 543,7	7,8
VITAMINA E	450	2504,0 $\pm$ 137,9	5,5

*SD: Desviación estándar relativa para n = 3 réplicas

El TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox) emplea los moles de las sustancias a evaluar, los extractos no son compuestos puros, por tanto no se puede determinar su molaridad; los estándares aunque son sustancias puras, se

expresaron en partes por millón (ppm) para comparar con los resultados de los extractos.

A continuación, se realizaron las pruebas correspondientes para los extractos etanólicos, se calculó su valor TAA. Las gráficas se pueden observar en la Figura 19 y sus valores en la Tabla 10.

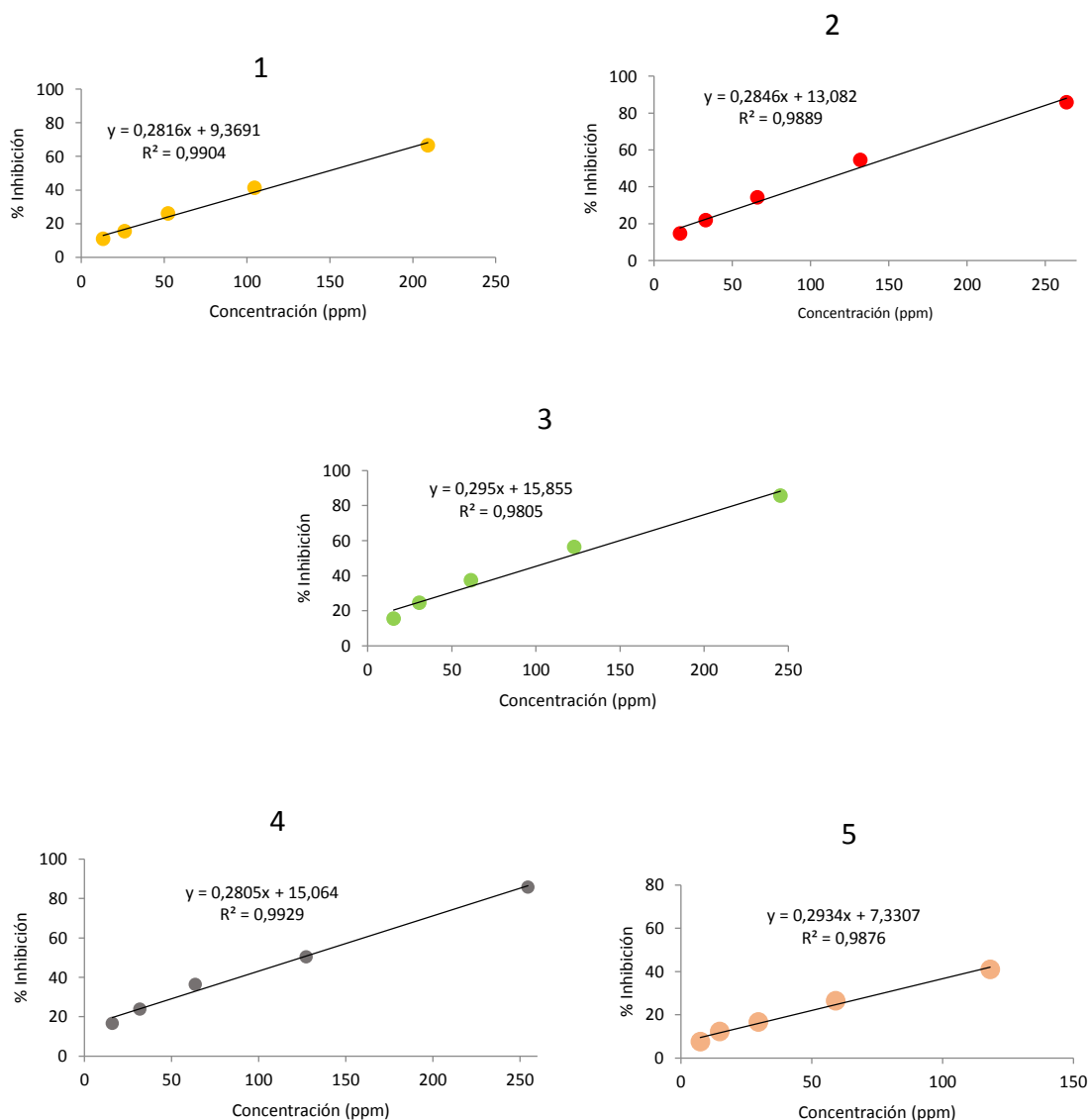
Tabla 10. Valores del TAA para los extractos etanólicos.

Extracto	Concentración (ppm)	TAA (mmol de Trolox / Kg muestra $\pm$ SD*	CV %
1	2300	140,0 $\pm$ 2,6	1,8
2	2900	131,0 $\pm$ 4,1	3,1
3	2700	174,2 $\pm$ 4,7	2,7
4	2800	145,6 $\pm$ 5,4	3,7
5	2600	112,7 $\pm$ 3,1	2,8

*SD: Desviación estándar relativa para n = 3 réplicas

En la Tabla 10 se puede observar que los valores de TAA para los extractos se encuentran en un rango de 112,7 $\pm$ 3,1 a 174,2 $\pm$ 4,7 mmol de Trolox / Kg muestra. Estos valores son inferiores a los obtenidos de los antioxidantes sintéticos empleados en la industria alimentaria (BHA y BHT) y la vitamina E, un antioxidante natural; lo que indica que los extractos etanólicos de cáscara de mandarina seca, tienen una actividad antioxidante moderada en comparación con los compuestos de referencia.

Figura 19. Gráficas del efecto de la inhibición del ABTS⁺ por los extractos etanólicos.



FUENTE: Autora

Aunque se empleó la misma metodología para elaborar los cinco extractos etanólicos a partir de la cáscara de mandarina seca, y el contenido de polifenoles y flavonoides se mantienen en un mismo rango (Tabla 8 y 9), la actividad antioxidante presenta variaciones, lo que puede deberse tanto a la concentración como a la mezcla de múltiples compuestos presentes en los extractos, al emplear residuos de cáscaras de diferentes lugares (plazas de mercado, tiendas, zonas rurales), su

composición química puede cambiar debido a variantes como el tipo de suelo, época climática, estado de madurez y clase del fruto.

4.6 OBTENCIÓN DE LA HESPERIDINA A PARTIR DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CÁSCARA DE MANDARINA

Una forma de obtener la hesperidina (HE) es acidificando el extracto,⁵⁸ ya que un aumento de pH solubiliza a la HE. En este trabajo se empleó ácido acético^{136; 101} para esto se realizó una prueba inicial tomando una muestra del extracto y se diluyó con ácido acético al 10 %. El resultado se puede observar en la Figura 20.

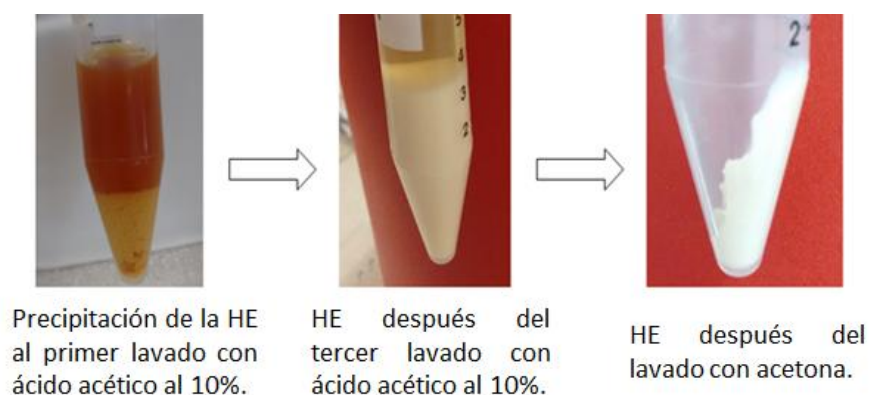
Figura 20. Prueba de precipitación de la hesperidina con ácido acético al 10 %



FUENTE: Autora

Una vez observado el precipitado blanco en la prueba, se tomó 1 g de extracto y se le adicionaron 4 mL de ácido acético al 10% previamente calentado para facilitar su disolución, se llevó a ultrasonido a una temperatura de 50 °C hasta disolver completamente. La hesperidina se precipitó formando un sólido amarillo pálido; la muestra se centrifugó con el fin de separar el sólido de la parte acuosa, esta última se descartó y se realizaron tres lavados más. Para purificar y eliminar los restos de ácido, se realizó un lavado con acetona, previamente calentada, se llevó a ultrasonido a temperatura ambiente, hasta disolver completamente y se centrifugó obteniendo un sólido de color blanco; este procedimiento se puede observar en la Figura 21.

Figura 21. Obtención de la hesperidina mediante precipitación ácida.



FUENTE: Autora

Este procedimiento fue realizado para los 5 extractos etanólicos; los resultados se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 11. Obtención del crudo de HE presente en los extractos etanólicos de cáscara de mandarina.

Extracto	Peso de la cáscara seca (g)	Peso del extracto obtenido de la cáscara seca (g)	HE por gramo de extracto (mg)	HE en el extracto obtenido (mg)	HE presente en la cáscara seca (mg)	Rendimiento (%)
1	200,0	14,0641	119,1	1675,03	23820	11,9
2		16,9306	28,5	482,52	5700	2,8
3		12,8993	192,4	2481,83	38480	19,2
4		12,9219	355	4587,27	71000	35,5
5		15,3203	76,4	1170,47	15280	7,6

Los resultados obtenidos en la Tabla 11, muestran amplias variaciones del contenido de HE que van de 5,7 a 71 g / 200 g de cáscara seca, teniendo como promedio 30,86 g de HE / 200 g cáscara. En comparación con estudios presentados en la literatura este valor es significativo, en promedio se obtuvieron 154,28 mg de HE/ g cáscara. Makovsek, 2013,⁹⁹ obtuvo 61,3 mg de HE / g de cáscara de mandarina seca usando acetona al 70 %; Ma y colaboradores, 2008,²¹ extrajeron 57 mg de HE / g cáscara de mandarina seca empleando metanol. Por otro lado, Khan y colaboradores, 2010,⁸⁹ realizaron una mezcla de etanol-agua (4:1, v/v) y obtuvieron 205,2 mg de HE / 100 g de cáscara de naranja fresca (2,05 mg HE / g cáscara); todos emplearon la extracción asistida por ultrasonido. No obstante, también se reporta contenido de HE mediante otras técnicas como microondas (58,6

mg de HE/g cáscara de mandarina seca)⁹⁸ y soxhlet (117 mg HE/ g cáscara de naranja seca)¹³⁷, en ambos casos el disolvente fue etanol.

En la Tabla 12 se observa la relación entre el contenido de polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante total y el contenido de HE presente en los extractos.

Tabla 12. Relación del contenido de polifenoles, flavonoides totales, actividad antioxidante total y la hesperidina.

Extracto	PT (mg AG/ g extracto seco)	FT (mg quercetina/ g extracto seco)	TAA (mmol de Trolox / Kg muestra)	mg de HE/ g de cáscara
1	18,74	0,41	140,0	119,1
2	24,66	0,50	131,0	28,5
3	21,66	0,41	174,2	192,4
4	22,62	0,42	145,6	355
5	23,5	0,47	112,7	76,4

Nota: PT: polifenoles totales, AG: ácido gálico FT: flavonoides totales, TAA: actividad antioxidante total, HE: hesperidina.

Como se observó anteriormente, los extractos 3 y 4 presentan mayor actividad antioxidante, lo que puede ir ligado su alto contenido de HE; no obstante, los extractos 2 y 5 presentan los valores más bajos de TAA y de HE, pero los más altos en polifenoles totales, esto puede indicar que la actividad antioxidante la generan otros flavonoides presentes en los extractos o que hay interferencia de la acción antioxidante por diferentes compuestos pues son los de más bajo contenido de HE. En este punto, se debe tener en cuenta que las cáscaras son residuos que pueden variar su composición química debido a las condiciones geobotánicas, ya que no todas las cáscaras utilizadas en el desarrollo de este trabajo corresponden a la misma especie, ni tienen la misma madurez.

4.7 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA HESPERIDINA OBTENIDA A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CÁSCARA DE MANDARINA SECA

Por medio de las técnicas fisicoquímicas y espectrofotométricas: cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD-UV/Vis), difracción de rayos-X, infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN-¹H; ¹³C); se analizó la hesperidina aislada de los extractos etanólicos de las cáscaras de mandarina.

Se obtuvieron cromatogramas de la hesperidina obtenida experimentalmente y la hesperidina empleada como referencia (SIGMA-ALDRICH ≥80%).

4.7.1 Técnicas fisicoquímicas

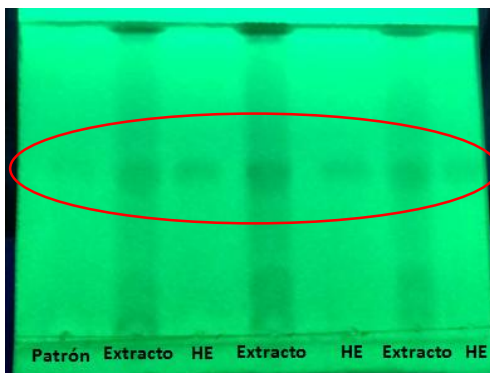
Punto de fusión: se determinó el punto de fusión de la HE empleada como patrón y de la HE experimental aislada de los extractos etanólicos

PUNTO DE FUSIÓN (°C)	
HE PATRÓN	HE experimental
250 – 255	248 – 250

Según la literatura, el punto de fusión de la HE varía en un rango entre 258 y 260 °C y se funde a los 250 °C.⁴³ De acuerdo con los resultados obtenidos el punto de fusión de la HE experimental es menor al presentado en la literatura pero mayor al patrón utilizado.

Cromatografía en capa fina (CCF): este método se llevó a cabo en placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA). Las placas se desarrollaron con acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, etilmetilcetona y agua (50:7:3:30:10) como eluyente y se visualizaron bajo luz UV a 366 nm. En la Figura 22, se pueden observar los compuestos coloreados, donde los tres extractos tomados con la HE aislada coinciden con la HE empleada como referencia.

Figura 22. Placa de sílica gel en el ultravioleta a 366 nm



FUENTE: Autora

Se calculó el R_f con la siguiente ecuación

$$\text{Ecuación 5} \quad R_f = \frac{\text{Distancia recorrida del compuesto (x)}}{\text{Distancia recorrida del eluyente (y)}}$$

El R_f obtenido experimentalmente es de 0,54. Este valor puede cambiar ya que depende tanto de la fase estacionaria como de la fase móvil. Estudios reportan un R_f de 0,96 para flavanonas en sílica gel y mezcla de acetato de etilo,

metiletilacetona, ácido fórmico y agua (50:30:10:10); y un $R_f = 0,41$ para la HE con las condiciones anteriores.¹³⁸

4.7.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)

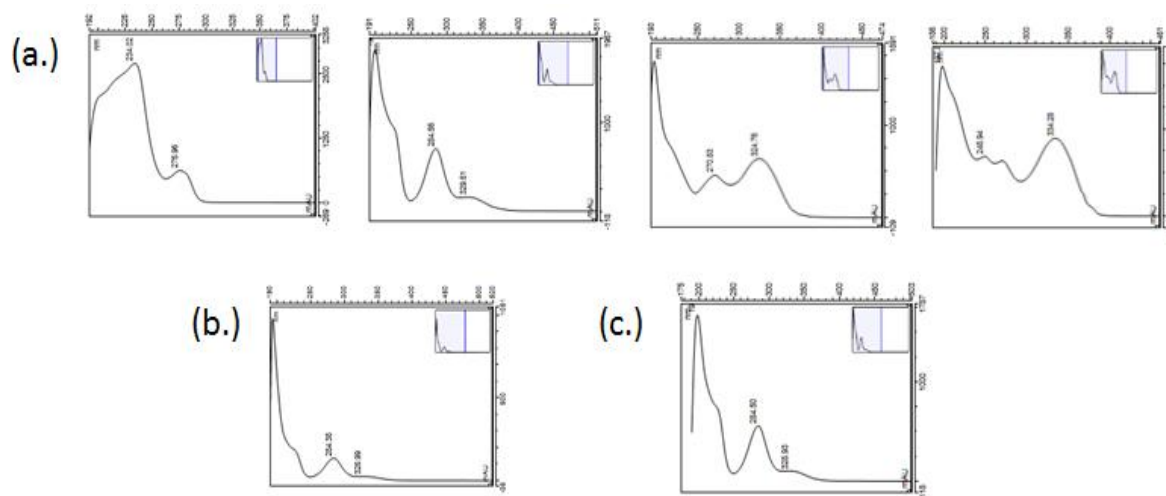
Para el desarrollo de esta técnica, se seleccionó uno de los extractos con su respectiva HE y se caracterizó por HPLC-DAD-UV/Vis, empleando el método descrito en la sección 3.7.2 y los parámetros presentes en la Tabla 13.

Tabla 13. Parámetros cromatográficos de HPLC-DAD-UV/Vis para caracterizar HE

Parámetro	Especificaciones
Fase móvil	Solvente A: metanol Solvente B: ácido fosfórico 0.25%
Gradiente de elución	0–3 min: 80 % B, 3,5 min: 75% B, 4–7 min 70% B, 7,5 min: 65% B, 8–11 min: 60% B, 11,5 min: 55% B, 12–15 min: 50% B, 15,5 min: 45% B, 16–20 min: 40% B, 20,5 min: 35% B, 21–25 min: 30% B, 25,5 min: 25% B, 26–30 min: 20% B, 30,5 min: 15% B, 31–35 min: 10% B, 35,5 min: 5% B, 36 min: 10% B, 41 min: 50% B, 46–50 min: 80% B.
Temperatura	25°C
Flujo (mL/min)	1
Longitud de onda (nm)	250, 285, 320 y 355
Volumen de inyección de la muestra (µL)	15

Se tomaron espectros UV de cuatro componentes separados y encontrados en el perfil cromatográfico por HPLC-DAD del extracto etanólico total de la cáscara de mandarina, también se tomó un espectro UV correspondiente a la HE aislada de este extracto y del estándar de HE, ver Figura 23.

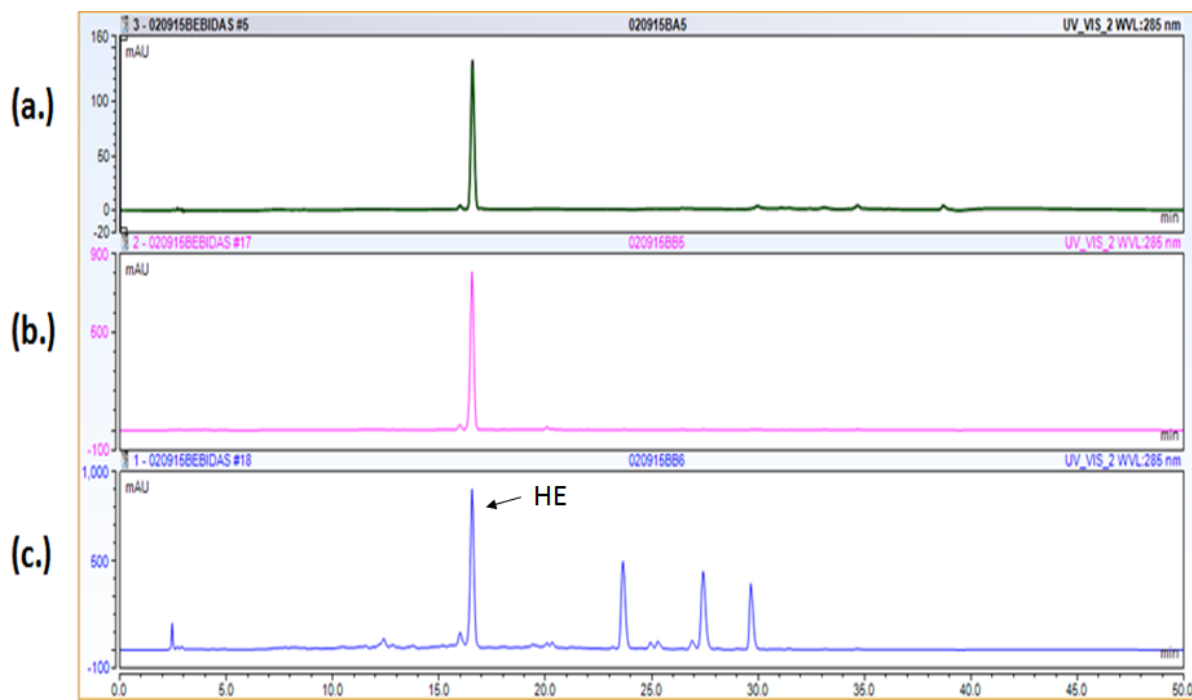
Figura 23. Espectro ultravioleta de (a.) cuatro componentes presentes en los extractos etanólicos, (b.) estándar certificado de la HE y (c.) HE aislada del extracto etanólico total de cáscara de mandarina



Los perfiles cromatográficos del extracto etanólico mostraron máximos de absorción en el rango de 190 – 200 nm y de 200 – 330 nm. En los cromatogramas de la HE aislada y la de referencia se pudo observar similitud, ambos presentan máximos de absorción a los 190, 284 y 326 nm

Se obtuvieron los perfiles cromatográficos por HPLC-DAD del estándar certificado de HE (0,5 mg), de la HE aislada del extracto etanólico de la cáscara de mandarina y del extracto etanólico, ver Figura 24.

Figura 24. Comparación de los perfiles cromatográficos por HPLC-DAD de (a.) estándar certificado de hesperidina (0,5 mg), (b.) la hesperidina aislada del extracto etanólico y (c.) del extracto etanólico.



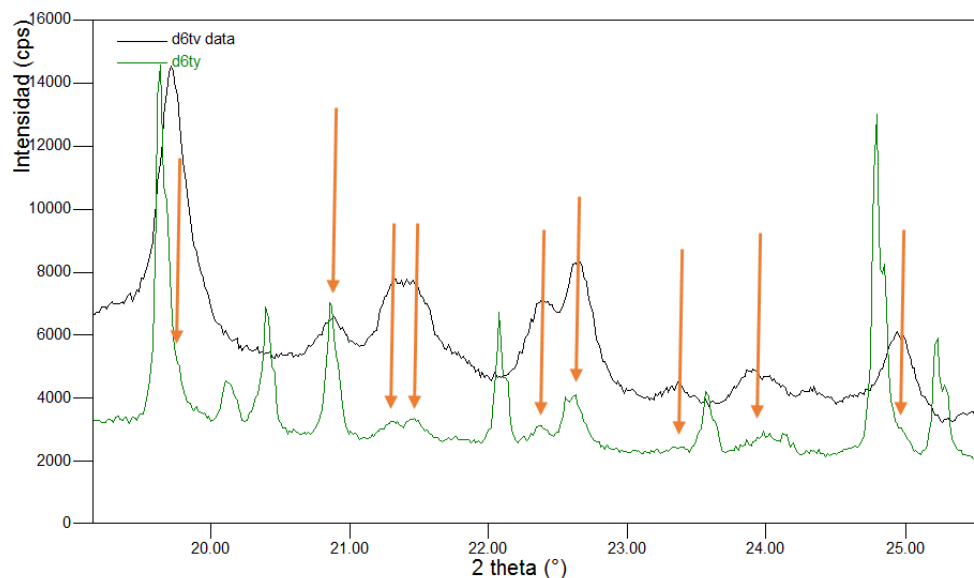
Se identificó la HE presente en el extracto y la aislada, por medio de la comparación de los tiempos de retención de los máximos obtenidos del estándar. Los cromatogramas del estándar y de las muestras, fueron obtenidos bajo las mismas condiciones de temperatura, gradiente y flujo.

El tiempo de retención correspondiente a la HE caracterizada empleando las condiciones cromatográficas descritas en la sección 3.7.3 es de 16,5 min. Por otro lado, en la Figura 24 se pueden observar otros picos en el cromatograma del extracto (c.) en el rango de 23 a 30 min, estos pueden corresponder a otros compuestos fenólicos mayoritarios presentes en las cáscaras de la mandarina.

4.7.3 Difracción de rayos-X

El perfil de difracción de la hesperidina pura (nombrado como d6tv) fue obtenido a partir del compuesto comercial. La superposición realizada con el difractograma conseguido posterior al proceso de la extracción se observa la presencia del compuesto de interés (d6ty), ver Figura 25.

Figura 25. Espectros de difracción de la HE experimental (negro) y la HE de referencia (verde).

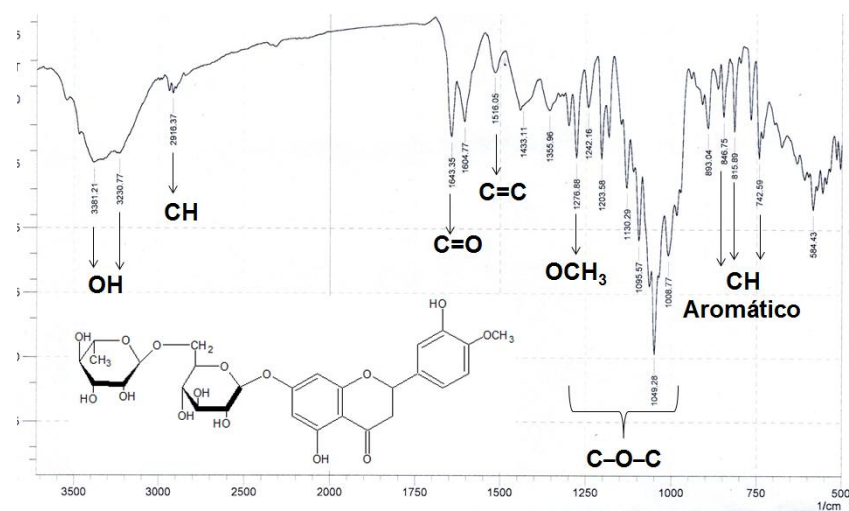


Tal como se aprecia en la Figura 25, las reflexiones señaladas con la flecha naranja evidencian la presencia de la hesperidina en el material analizado, sin embargo, existen otras reflexiones asociadas a la glucosa. Así mismo, se puede decir que en el proceso de extracción se obtuvo la hesperidina, pero no de forma pura, lo cual se confirma por la presencia de máximos de difracción en el perfil que no corresponden con el perfil del compuesto puro.

4.7.2 Análisis de los espectros infrarrojos.

Para caracterizar la hesperidina, se realizó el espectro infrarrojo, tanto de la aislada (Figura 26) como la de referencia (Figura 27). Se pudieron observar las señales correspondientes a los grupos funcionales presentes en esta molécula –OH hidroxilo, C–H alifáticos, C=O cetona, C=C doble enlace olefínico, O–CH₃ metoxi, C–O–C el grupo éter y C–H aromáticos.

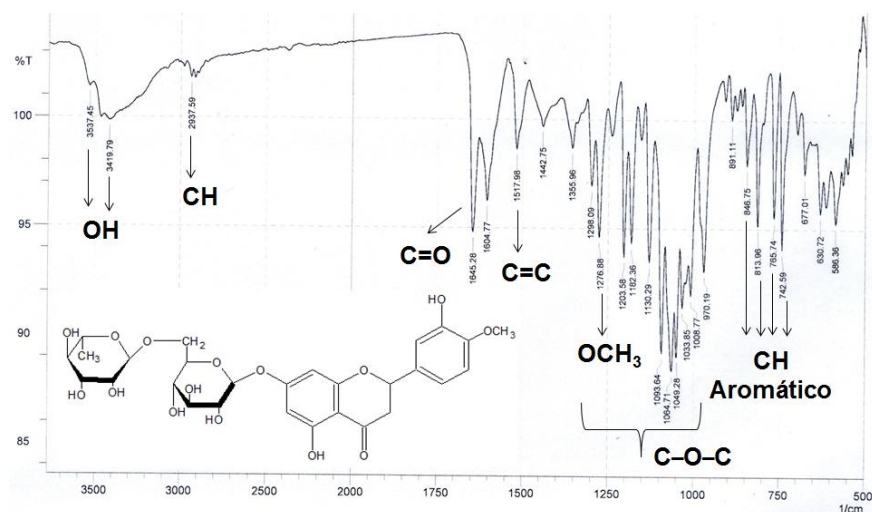
Figura 26. Espectro infrarrojo de la hesperidina aislada de los extractos etanólicos de la cáscara de mandarina



FUENTE: Autora

En el espectro (Figura 26), las señales correspondientes a los grupos funcionales mencionados anteriormente se encontraron entre 3381- 3230 (OH), 2916 (CH alifático), 1643 (C=O), 1516 (C=C), 1276 (OCH₃), 1203-1008 (COC) y 846-742 (CH aromático). En comparación con el espectro infrarrojo del patrón de hesperidina (Figura 27), se pudo observar gran similitud en las señales principales.

Figura 27. Espectro infrarrojo de la hesperidina empleada como referencia.



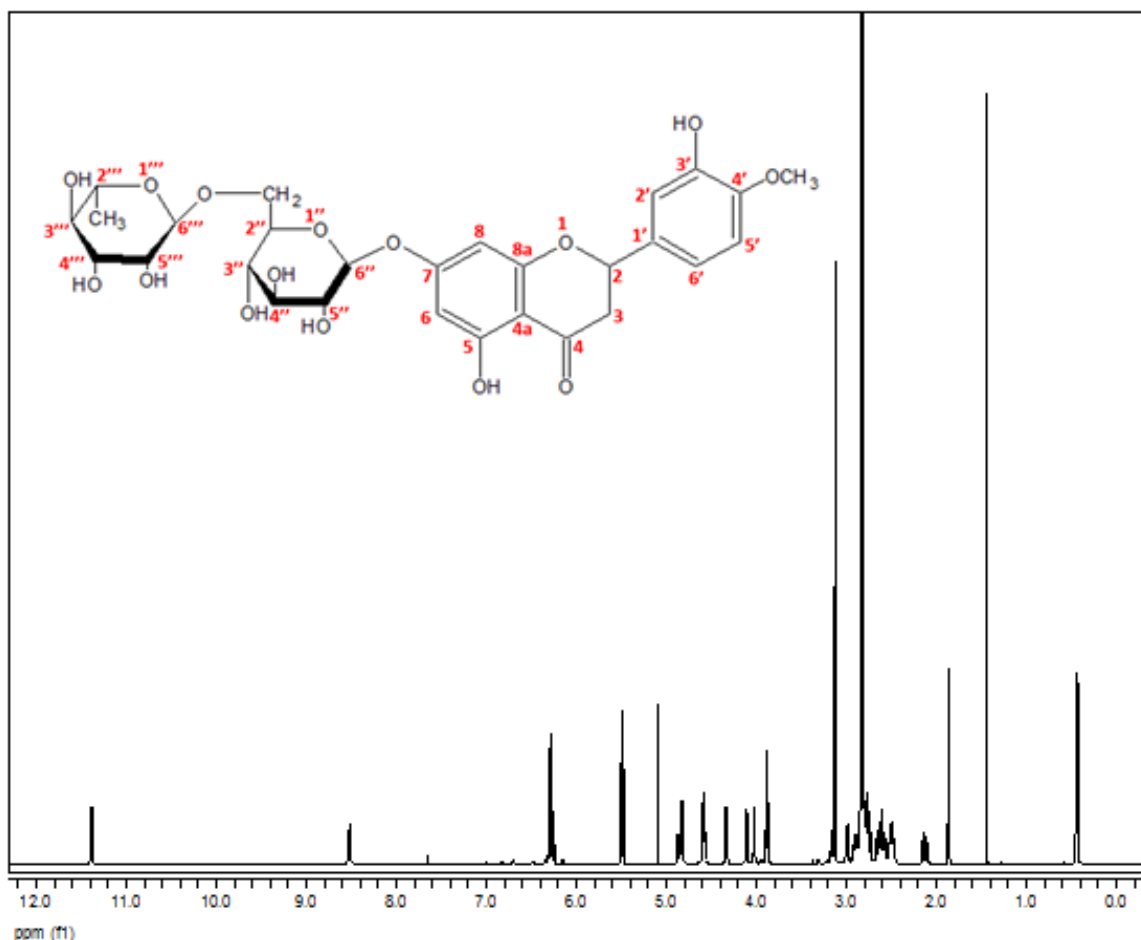
FUENTE: Autora

En este espectro las señales correspondientes a los grupos funcionales se encuentran en 3537 (OH), 2937 (CH alifático), 1645 (C=O), 1517 (C=C), 1276 (OCH₃), 1203-1008 (COC) y 846-742 (CH aromático).

4.3.2 Análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C

El espectro de RMN-¹H de los flavonoides permite reconocer características estructurales importantes. En la Figura 28, se muestra el espectro de protón para la hesperidina usada como referencia.

Figura 28. Espectro RMN-1H del patrón de hesperidina



FUENTE: Autora

La señal más baja de 0,66 ppm corresponde a los protones del carbono 2'''-CH₃ que hace parte del disacárido, estos protones se presentan como doblete con una constante de acoplamiento de 6,2 Hz. Los dos protones del carbono 3 se encuentran en diferentes posiciones, uno ecuatorial (He) a 2,82 ppm y el otro axial (Ha) a 2,85 ppm, ambos se presentan como un triplete con constante $J = 4,8$ y $12,3$ Hz

respectivamente; de 2,93 a 3,14 ppm como un multiplete se encuentran las señales de los protones de los carbonos 3 y 2''-CH₂; a 3,05 ppm aparece la señal de los protones del grupo metoxi como un singlete. En 4,10 ppm como un singlete ancho, está la señal de los protones de los carbonos 3'' y 3''' con la constante $J = 1,1$ Hz; la señal de los hidrógenos de los grupos hidroxilo presentes en los carbonos 4'', 4'', 5'', 5'', 5'', 3'' y 3'' del disacárido se encuentran a 4,11, 4,16, 4,17, 4,27, 4,34 y 4,57 ppm respectivamente como singletes anchos. A 4,25, 4,33, 4,55, 4,80, 4,82 y 5,07 ppm aparecen las señales de los protones del disacárido, los cuales hacen parte de los carbonos 2''' ($J = 4,4$ Hz), 5''' ($J = 5,5$ Hz), 5'' ($J = 7,5$ Hz), 2'' ($J = 5,0$ Hz), 6''' ($J = 5,5$ Hz) y 6'' ($J = 12,3, 3,1$ Hz) respectivamente y se presentan como dobletes, a excepción del protón del carbono 6'' que la señal aparece como un doblete. La constante de acoplamiento $J = 4,9$ Hz pertenece al protón del carbono 2 de la aglicona, la señal se encuentra a 5,04 ppm como un doblete; otros protones que hacen parte de la aglicona hesperetina son los correspondientes a los carbonos 6 y 8 a 5,71 ppm como un doblete y una constante de acoplamiento de $J = 8,8, 2, 3$ Hz. Entre 6,46 y 6,53 aparece un multiplete provocado por los hidrógenos de los carbonos 2', 5' y 6'; los protones del grupo hidroxilo pertenecientes a los carbonos 3' y 5 de la aglicona, resuenan a 8,74 y 11,60 respectivamente como un singlete.

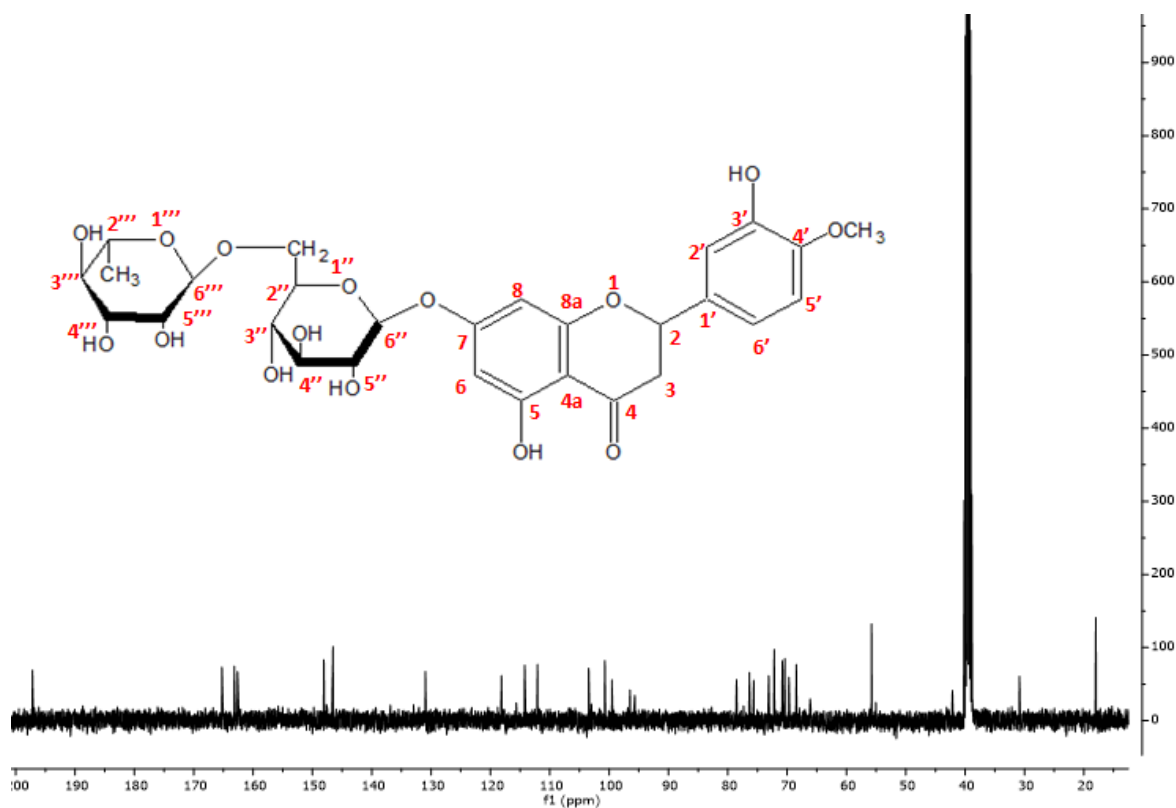
En la Tabla 14 se observa las posiciones de los protones en cada espectro obtenido de la HE empleada como patrón y la aislada de los extractos. Se puede observar que aunque existe similitud en el desplazamiento de las señales de RMN-¹H, las del espectro de la HE de referencia tiene una mejor definición, ya que algunas señales presentes en la HE experimental no tienen un desplazamiento específico sino se encuentran en un determinado rango en forma de multiplete. Por otro lado, en la Figura 28 se pueden observar algunas señales adicionales que corresponden a los solventes utilizados como diclorometano (7,32 ppm), acetona (2,08 ppm), DMSO (2,50 ppm), metanol (3,34 ppm) y agua (4,82 ppm).

Tabla 14. Comparación entre las señales obtenida de los espectros ^1H -RMN de la HE patrón y la HE experimental

Posición	HE patrón	HE experimental
2-H	5,04 ppm; 1H, d, 4,9 Hz	5,03 ppm; 1H, brs, 4,6 Hz
3-H	2,93 – 3,14 ppm; 2H, m	2,97 – 3,13 ppm; 2H, m
3-He	2,82 ppm; 1H, t, 4,8 Hz	2,85; 1H, t, 5,1 Hz
3-Ha	2,85 ppm; 1H, t, 12,3 Hz	2,92 ppm; 1H, t, 10,1 Hz
5-OH	11,60 ppm; 1H, s	11,60 ppm; 1H, s
6-H	5,71 ppm; 2H, dd, 8,8, 2, 3 Hz	5,71 ppm; 2H, dd, 8,4, 2,1 Hz
8-H	5,71 ppm; 2H, dd, 8,8, 2, 3 Hz	5,71 ppm; 2H, dd, 8,4, 2,1 Hz
2'-H	6,46 – 6,53 ppm; 3H, m	6,46 – 6,53 ppm; 3H, m
3'-OH	8,74 ppm; 1H, s	8,73 ppm; 1H, s
4'-OCH ₃	3,05 ppm; 3H, s	3,04 ppm; 3H, s
5'-H	6,46 – 6,53 ppm; 3H, m	6,46 – 6,53 ppm; 3H, m
6'-H	6,46 – 6,53 ppm; 3H, m	6,46 – 6,53 ppm; 3H, m
2''-H	4,80 ppm; 1H, d, 5, 0 Hz	4,75 ppm; 1H, d, 3,6 Hz
2''-CH ₂	2,93 – 3,14 ppm; 2H, m	2,97 – 3,13 ppm; 2H, m
3''-H	4,10 ppm; 2H, brs, 1,1 Hz	4,12 ppm; 2H, s
3''-OH	4,57 ppm; 1H, brs	4,38 – 4,42 ppm; 3H, m
4''-OH	4,16 ppm; 1H, brs	4,14 ppm; 1H, brs
5''-OH	4,27 ppm; 1H, brs	4,24 ppm; 1H, brs
5''-H	4,55 ppm; 1H, d, 7,5 Hz	4,54 ppm; 1H, d, 7,6 Hz
6''-H	5,07 ppm; 1H, dd, 12,3, 3,1 Hz	5,07 ppm; 1H, dd, 12,2, 2,9 Hz
2'''-H	4,25 ppm; 1H, d, 4,4 Hz	-
2'''-CH ₃	0,66 ppm; 3H, d, 6,2 Hz	0,66 ppm; 3H, d, 6,2 Hz
3'''-H	4,10 ppm; 2H, brs, 1,1 Hz	4,12 ppm; 2H, s
3'''-OH	4,34 ppm; 1H, brs	4,38 – 4,42 ppm; 3H, m
4'''-OH	4,11 ppm; 1H, brs	4,09 ppm; 1H, brs
5'''-H	4,33 ppm; 1H, d, 5,5 Hz	4,38 – 4,42 ppm; 3H, m
5'''-OH	4,17 ppm; 1H, brs	4,18 ppm; 1H, brs
6'''-H	4,82 ppm; 1H, d, 5, 5 Hz	4,82 ppm; 1H, d, 4,7 Hz

En la Figura 29 se puede observar el espectro RMN- ^{13}C de la HE de referencia.

Figura 29. Espectro RMN-13C del patrón de HE

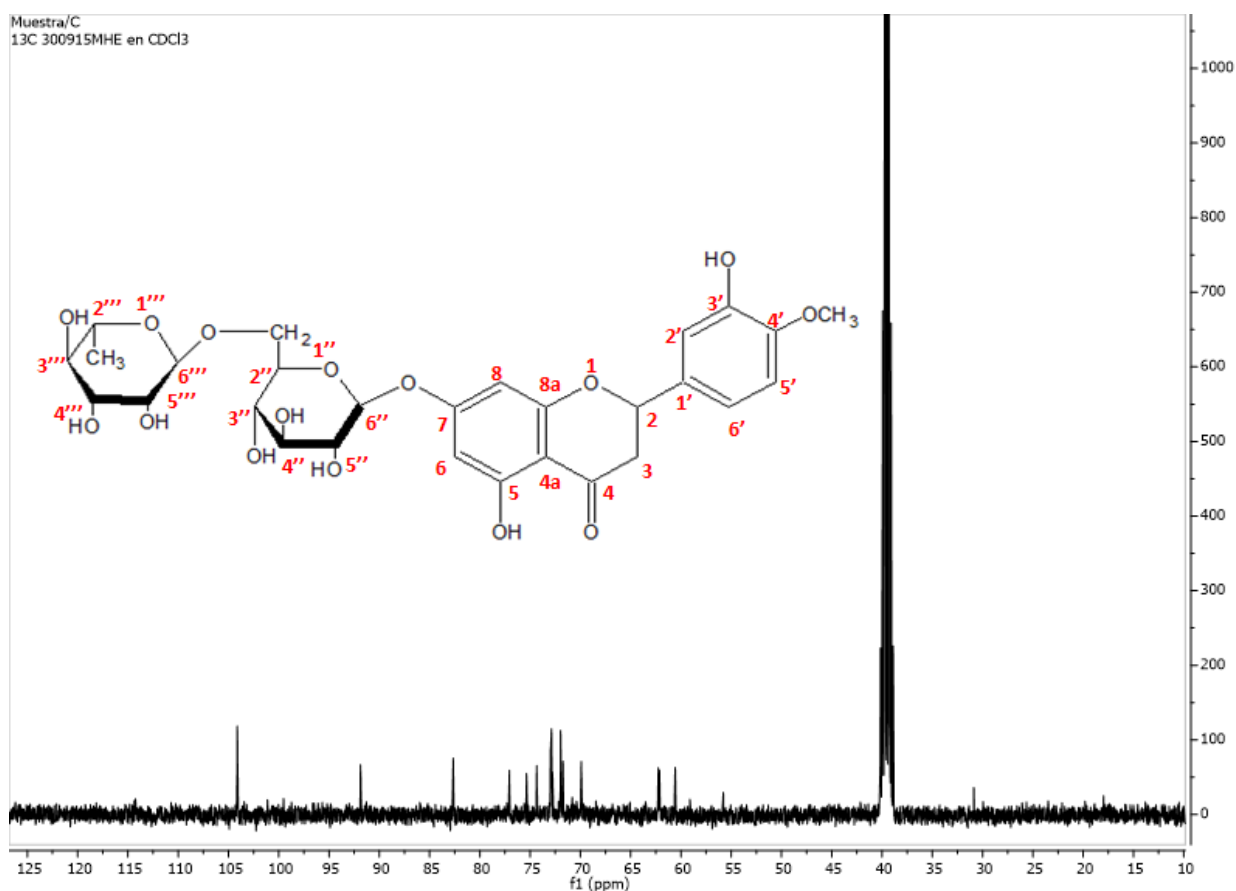


A campos altos resuena la señal del metil -CH₃ en 17.9 ppm y el 3-C en 42,1. Los carbonos del grupo metoxi y etoxi (-OCH₃) (-OCH₂-), están desplazados a 55,7 y 68.4 ppm respectivamente. Los carbonos de la parte glucósida (5'''-C), (4'''-C), (5''-C), (3'''-C), (3''-C), (2'''-C), (4''-C), (6'''-C), (6''-C), (2''-C) se encuentran en 69,6, 70,3, 70,7, 72,1, 73,0, 75,6, 76,3, 78,5, 99,5 y 112,0 ppm respectivamente. Por otro lado, los carbonos de la flavanona (2-C), (8-C), (4_a-C), (6-C), (5'-C), (2'-C), (6'-C), (1'-C), (3'-C), (4'-C), (8_a-C), (5-C), (7-C), (4-C), se desplazan a campos más bajos: 95,6, 96,4, 100,6, 103,4, 114,2, 115,6, 118,1, 130,9, 146,5, 148,0, 162,6, 163,1, 165,2 y 197,1 ppm respectivamente.

Las señales que se encuentran entre 40,1 – 38,8 corresponde al disolvente.

Al comparar este espectro con el de la HE experimental (Figura 30) se puede observar que en este último las señales son de baja intensidad y se pierden con el ruido, además no se pueden observar las señales en campo bajo que corresponden al flavonoide.

Figura 30. Espectro RMN- ^{13}C de HE aislada a partir de los extractos etanólicos de cáscara de mandarina



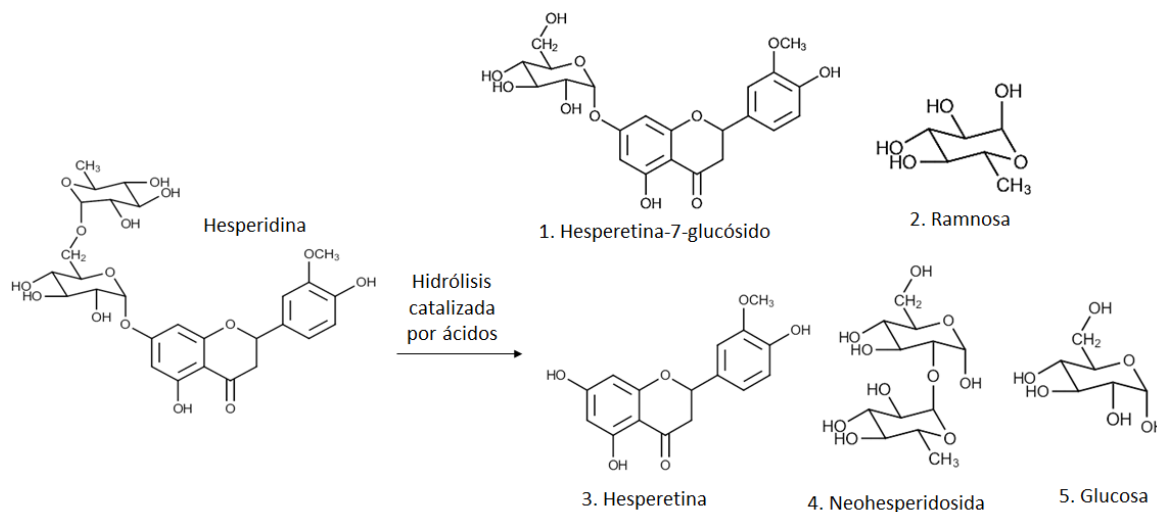
En este espectro las señales más intensas que se pueden observar corresponden a la unidad del disacárido 5''-C, 4''-C, 3''-C, 3''-C, 2''-C, 4''-C, 6''-C las cuales se desplazan a campo bajo: 62,5, 70,2, 72,1, 73,1, 75,7, 77,4 y 83,0 ppm respectivamente. También se puede observar algunas señales de la flavanona como el 2-C que se desplaza a 92,2 ppm y 6-C con desplazamiento de 104,4 ppm.

La baja solubilidad de la HE en agua causa una resistencia inusual a los ácidos,¹³⁹ en este caso precipitó en ácido acético, y se purificó con acetona, siendo insoluble en este último. La temperatura juega un rol importante al momento de obtener la HE, a altas temperaturas ($\geq 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) sobre el residuo se produce la liberación de una mayor cantidad de polifenoles, pudiendo interferir en la recuperación del producto final.¹⁴⁰

El uso de la hidrólisis ácida permite la liberación de los polifenoles ligados a la matriz vegetal, así mismo la depolimerización de compuestos de alto peso molecular a compuestos de estructuras más simples; no obstante también es posible que se origine la degradación de ciertas estructuras polifenólicas.¹⁴¹

Por otro lado, al hidrolizar la HE en medio ácido se pueden obtener cinco productos, entre los cuales hace parte la aglicona hesperetina (Figura 31).

Figura 31. Esquema de hidrólisis de la HE catalizada por ácidos.¹⁴²



4.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA HESPERIDINA AISLADA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CÁSCARA DE MANDARINA POR EL MÉTODO DE CATIÓN RADICAL ABTS⁺.

Para evaluar la actividad antioxidante de la HE aislada de los extractos etanólicos de cáscara de mandarina se empleó la metodología descrita por Re y colaboradores en 1999⁶¹ con las modificaciones propuestas por Muñoz y colaboradores en el 2010¹²⁵ presentada en la sección 3.5 del texto.

En la Tabla 15 se muestran las concentraciones preparadas de la HE aislada correspondiente a cada extracto.

Tabla 15. Concentraciones empleadas para evaluar la capacidad antioxidante por el método ABTS⁺.

HE aislada (extracto)	Concentración (ppm)
1	3 100
2	2 600
3	2 600
4	3 600
5	2 600

Las muestras de HE se diluyeron en forma seriada en microplacas de 96 pocillos y después de introducir alícuotas de 10 μ L de estas soluciones a la solución ABTS⁺ (200 μ L), no se produjo ninguna inhibición visto que no hubo decoloración del radical.

Dicho esto, es importante tener en cuenta las disposiciones estructurales de los flavonoides que conceden la mayor actividad antioxidante, como la sustitución 3' 4' orto dihidroxi en el anillo B, también la disposición de grupos hidroxilos en posición meta en los carbonos 5 y 7 del anillo. No obstante, alteraciones en la disposición de los grupos hidroxilos y la sustitución de grupos hidroxilos por glicosilación disminuye la actividad antioxidante, lo cual es significativo cuando se considera la relación entre la actividad antioxidante de los glicósidos que abundan en la naturaleza y las agliconas.⁴⁰ Por otro lado, la HE forma cristales con glucósidos similares, afectando su baja solubilidad, impidiendo que reaccione con el radical ABTS⁺.

El método de ABTS⁺ tiene baja selectividad, ya que reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado, independientemente de su potencial antioxidante real;¹⁴³ este hecho se puede observar al comparar los resultados obtenidos de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos (Tabla 10) la cual se debe a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y otro tipo de compuestos fenólicos, y la no inhibición de la HE aislada. Por este motivo, existe una amplia variación en las mediciones de capacidad antioxidante, debido a los diferentes estudios donde varían tanto las cantidades de reactivos y muestras como del manejo y medición de las mismas, resultando difícil una comparación de los resultados obtenidos de estas mediciones con otras investigaciones.

5. CONCLUSIONES

- ❖ Por medio de la extracción asistida por ultrasonido (US) se obtuvieron cinco extractos etanólicos a partir de cáscara de mandarina seca con un rendimiento promedio total de $7.21 \pm 1.2 \%$.
- ❖ Se determinó el contenido de flavonoides (0.41 a 0.50 mg de quercetina / g extracto) y polifenoles totales (18.74 a 24.66 mg AG / g) presentes en los extractos etanólicos de la cáscara de la mandarina seca.
- ❖ Se logró aislar en promedio 154.28 mg de hesperidina / g de cáscara de mandarina seca, realizando una precipitación con ácido acético al 10%, este valor es alto comparado con los reportados en la literatura.
- ❖ Empleando las técnicas espectrofotométricas, HPLC-DAD-UV/Vis, infrarrojo, difracción de rayos-X y RMN, se logró caracterizar la hesperidina obtenida a partir de los extractos etanólicos comparando los resultados con un patrón de referencia.
- ❖ Se obtuvo hesperidina a partir de cáscara de mandarina, empleando un método de extracción que requiere bajo consumo de disolvente, energía y temperatura, en tiempos cortos, haciéndolo económico y favorable para el medio ambiente.
- ❖ Se evaluó la capacidad antioxidante total (TAA) de los extractos etanólicos por el método de catión radical ABTS⁺, obteniendo valores en un rango de 112.7 ± 3.1 a 174.2 ± 4.7 mmol de Trolox / Kg muestra. La hesperidina aislada no generó inhibición.
- ❖ El espectro de RMN-¹³C de hesperidina obtenida a partir de los extractos no se pudo evidenciar la estructura completa; sólo pudo observar las señales correspondientes a la fracción glucosídica de la molécula, lo que podría indicar que la hesperidina aislada no presentara inhibición en la prueba del catión radical ABTS⁺.

6. RECOMENDACIONES

- Estudiar métodos de extracción como percolación, microondas y soxhlet para aislar HE de cáscara de mandarina.
- Evaluar la capacidad antioxidante utilizando el ensayo de captación de radicales libres DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), tanto para los extractos etanólicos de cáscara de mandarina como para la HE aislada.
- Emplear muestras de material vegetal diferentes (pulpa, semillas) al de la cáscara para aislar HE, así mismo utilizar frutas como la naranja y la toronja; las cuales se han reportado en la literatura.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Jaramillo Henao, G.; Zapata Márquez, L. M. Aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos en Colombia, Universidad de Antioquia, 2008.
- (2) Aristizabal, C.; SÁCHICA, M. El aprovechamiento de los residuos sólidos domiciliarios no tóxicos en Bogotá D.C., Pontificia Universidad Javeriana, 2001.
- (3) Kris-Etherton, P. M.; Hecker, K. D.; Bonanome, A.; Coval, S. M.; Binkoski, A. E.; Hilpert, K. F.; Griel, A. E.; Etherton, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* **2002**, *113* (9), 71–88.
- (4) Sierra, M. P.; Guzmán, A. M.; Olivares, I. M.; Torres, Y. D.; Hicks, J. J. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.* **2004**, *17* (2), 135–148.
- (5) Vladimir-kneževi, S.; Blažekovi, B. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. In *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*; Rao, V., Ed.; InTech: Rijeka, 2012; pp 155–180.
- (6) Guzman, J. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. *Molecules* **2014**, *19* (12), 19292–19349.
- (7) García-Mateos, R.; Pérez-Leal, R. Fitoalexinas: Mecanismo de defensa de las plantas. *Rev. Chapingo Ser. Ciencias For. y del Ambient.* **2003**, *9*, 5–10.
- (8) William, J.; Buzón, J. A.; Aguas, D.; Molina, E. Reducción de los residuos sólidos orgánicos en Colombia por medio del compostaje liquido. *Ingeniare* **2011**, *11* (11), 37–44.
- (9) Londoño-Londoño, J. A. Aprovechamiento de residuos de la agroindustria de cítricos: extracción y caracterización de flavonoides; Corporación Universitaria Lasallista, 2011; pp 395–416.
- (10) Martínez-Flórez, S. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* **2002**, 271–278.
- (11) Martinez, A. *Flavonoides*; Medellín, 2005.
- (12) Levaj, B. Determination of flavonoids in pulp and peel of mandarin fruits. *Agric.* **2009**, *74* (3), 221–225.
- (13) Mazzaferro, L. S.; Breccia, J. D. Quantification of hesperidin in citrus-based foods using a fungal diglycosidase. *Food Chem.* **2012**, *134* (4), 2338–2344.
- (14) Epam s.a. e.s.p. *Construcción de criterios técnicos para el aprovechamiento y valorización de los residuos sólidos orgánicos con alta tasa de*

biodegradación, plásticos, vidrios, papel y cartón.; Bogotá D.C., 2008.

- (15) (15) Secretaría General de la Alcaldía Mayor de Bogotá D.C. PROYECTO DE ACUERDO 113 DE 2011.
- (16) Martínez, H. J.; Peña, Y.; Espinal G., C. F. *La cadena de cítricos en Colombia: una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005*; 2006.
- (17) Aguilar, P.; Escobar, M.; Passaro, C. Situación actual de la cadena de cítricos en Colombia: limitantes y perspectivas. En *Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización*; Garcés Giraldo, L. F., Ed.; Editorial Artes y Letras S.A.S: Caldas, 2012; pp 7–47.
- (18) Omidbaigi, R.; Nasiri, M. F. Quantitative distribution of hesperidin in citrus species, during fruit maturation and optimal harvest time. *Nat. Prod. Radiance* **2004**, 3 (1), 12–15.
- (19) Braddock, R. J. *Handbook of citrus by products and processing technology*, 1st ed.; John Wiley & Sons, Ltd: New York, 1999.
- (20) Narayana, K. R.; Reddy, M. S.; Chaluvadi, M. R.; Krishna, D. R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* **2001**, 33, 2–16.
- (21) Ma, Y.; Ye, X.; Hao, Y.; Xu, G.; Xu, G.; Liu, D. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrason. Sonochem.* **2008**, 15 (3), 227–232.
- (22) Iglesias Neira, J. Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca, Universidad de Santiago de Compostela, 2009.
- (23) Diaz, E. *Resolución Número 4124 de 1991*; Bogotá D.C., 1990; Vol. 67.
- (24) Liu, Y.; Heying, E.; Tanumihardjo, S. A. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, 11 (6), 530–545.
- (25) Agronet. Red de información y comunicación estratégica del sector agropecuario <http://www.agronet.gov.co>. (Consultada Oct 26, 2016).
- (26) Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. *Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2007-2011 y sus calendarios de siembra y cosechas. Resultados evaluaciones agropecuarias municipales 2011*, Dirección .; JL Impresores LTDA, Ed.; Bogotá D.C., 2012.
- (27) Tripoli, E.; Guardia, M. La; Giammanco, S.; Majo, D. Di; Giammanco, M. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* **2007**, 104 (2), 466–479.

- (28) Ladanyia, M.; Ladaniya, M. *Citrus fruit: biology, technology and evaluation*, 1st ed.; Elsevier: San Diego, 2008.
- (29) Barahona Cockrell, M.; Sancho Barrantes, E. *Cítricos fruticultura especial 1*; Editorial Universidad Estatal a Distancia, Ed.; San José, Costa Rica., 2000.
- (30) Jeong, S.-M.; Kim, S.-Y.; Kim, D.-R.; Jo, S.-C.; Nam, K. C.; Ahn, D. U.; Lee, S.-C. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (11), 3389–3393.
- (31) Laskowki, L.; García, A.; Torres, J. Desarrollo del fruto de citrus sinensis Cv. Salustiana. *Bioagro* **2006**, 18 (1), 15–23.
- (32) Maier, H.-P. *Cítricos ornamentales: jardín en casa*; Editorial hispano europea, s.a., 2003.
- (33) Gobierno del Estado de Chiapas. *Sistema de producción ecológica limón persa (Citrus Aurantifolia L.)*; Palenque, 2006.
- (34) Rincon, A. M.; Vasquez, M. A.; Padilla, F. C. Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (Citrus sinensis), mandarina (Citrus reticulata) y toronja (Citrus paradisi) cultivadas en Venezuela. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2005**, 55 (3), 305–310.
- (35) Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **2011**, 126 (4), 1821–1835.
- (36) Gimeno Creus, E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Farm. y Nutr.* **2004**, 23, 80–84.
- (37) Corradini, E.; Foglia, P.; Giansanti, P.; Gubbiotti, R.; Samperi, R.; Lagana, A. Flavonoids: Chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Nat. Prod. Res.* **2011**, 25 (5), 469–495.
- (38) Marais, J. P. J.; Deavours, B.; Dixon, R. A.; Ferreira, D. The stereochemistry of flavonoids. In *The Science of Flavonoids*; Grotewold, E., Ed.; Springer: Ohio, 2006; pp 1–47.
- (39) Kurzer, M. S. Hormonal effects of soy isoflavones: studies in premenopausal and postmenopausal women. *J. Nutr.* **2000**, 130, 660S – 661S.
- (40) Cartaya, O.; Reynaldo, I. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultiv. Trop.* **2001**, 22 (2), 5–14.
- (41) Naidu, A. S.; Bidlack, W. R.; Crecelius, A. T. Flavonoids. In *Natural Food Antimicrobial Systems*; Naidu, A. S., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 2000; pp 1–24.
- (42) Materska, M. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity - A review. *Polish J. Food Nutr. Sci.* **2008**, 58 (4), 407–413.

- (43) Garg, A.; Garg, S.; Zaneveld, L. J.; Singla, a K. Chemistry and Pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother. Res.* **2001**, *15* (8), 655–669.
- (44) Fathiazad, F.; Delazar, A.; Amiri, R.; Sarker, S. D. Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste tobacco leaves. *Pharm. Res.* **2006**, *3*, 222–227.
- (45) Rojas, J. P. Determinación por HPLC de naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina en jugos cítricos y aplicación de naringinasa en el jugo de mandarina, Universidad Industrial de Santander, 2006.
- (46) Onozuka, H.; Nakajima, A.; Matsuzaki, K.; Shin, R.; Ogino, K.; Saigusa, D.; Tetsu, N.; Yokosuka, A.; Sashida, Y.; Mimaki, Y.; et al. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and ab pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *326* (3), 739–744.
- (47) Halliwell, B. Reactive species and antioxidants . redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **2006**, *141* (June), 312–322.
- (48) Agudo Medina, L. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. *Autodidacta* **2002**, *9041*, 27–34.
- (49) Rodríguez Perón, J. M.; Menéndez López, J. R.; Trujillo López, Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo . *Revista Cubana de Medicina Militar* . scielocu 2001, pp 15–20.
- (50) Nordberg, J.; Arnér, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31* (11), 1287–1312.
- (51) Kohen, R.; Nyska, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* **2002**, *30* (6), 620–650.
- (52) Aguilar, E.; Bonilla, P. Actividad antioxidante e inmunológica de flavonoides aislados de hojas de *Smallanthus Sonchifolius* (Yacón). *Cienc. Invest.* **2014**, *12* (1), 15–23.
- (53) Pourmorad, F.; Hosseinimehr, S. J.; Shahabimajd, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected iranian medicinal plants. **2006**, *5* (June), 1142–1145.
- (54) Fejzić, A.; Ćavar, S. Phenolic compounds and antioxidant activity of some citruses. *pmf.unsa.ba* **2014**, 2007–2010.
- (55) Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13* (10), 572–584.

- (56) Fang, Y.-Z.; Yang, S.; Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **2002**, *18* (10), 872–879.
- (57) Kroyer, G.; Hüthmayr, A. *Antioxidant activity and total polyphenols in citrus fruit peels and seeds*; Vienna, 2009.
- (58) Zubrick, J. W. Isolation and characterization of: hesperidin from orange peel. *Org. Chem Lab Surviv. Manual*, 4th Ed. **1997**, 2–6.
- (59) Bouayed, J.; Bohn, T. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2010**, *3* (4), 228–237.
- (60) Zheng, W.; Wang, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (11), 5165–5170.
- (61) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26* (9-10), 1231–1237.
- (62) Santos, J. S. Prueba preliminar para la propuesta del sistema ABTS/ la casa en la evaluación de la actividad antioxidante total en alimentos. *XI Congreso Nacional de México D. F.* 2004.
- (63) Kitts, D. D. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules* **2014**, *19* (11), 19180–19208.
- (64) Katalinic, V.; Milos, M.; Kulisic, T.; Jukic, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* **2006**, *94* (4), 550–557.
- (65) Zulueta, A.; Esteve, M. J.; Frígola, A. ORAC and TEAC Assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* **2009**, *114* (1), 310–316.
- (66) Río, J. T. del. Determinación de La actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera, Universidad Tecnológica de Pereira, 2013.
- (67) Bast, A.; Haenen, G. R. M. M. The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *11* (3-4), 251–258.
- (68) Halliwell, B. The antioxidant paradox. *Lancet* **2000**, *355* (9210), 1179–1180.
- (69) Goliomytis, M.; Orfanou, H. Effect of hesperidin dietary supplementation on hen performance, egg quality and yolk oxidative stability. *Br. Poult. Sci.* **2014**, No. August 2014, 37–41.
- (70) Mauludin, R.; Müller, R. H. Physicochemical properties of hesperidin

nanocrystal. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, 5 (SUPPL 3), 954–960.

- (71) Roohbakhsh, A.; Parhiz, H.; Soltani, F.; Rezaee, R.; Iranshahi, M. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin - A mini-review. *Life Sci.* **2014**.
- (72) Sanfer. Daflon 500M® Diosmina-Hesperidina tabletas. www.sanfer.com (consultada marzo 23, 2015)
- (73) Sigma-Aldrich, Hesperidin 98%. <http://www.sigmaaldrich.com> (consultada noviembre 11, 2015)
- (74) Tamilselvam, K.; Braid, N.; Manivasagam, T.; Essa, M. M.; Prasad, N. R.; Karthikeyan, S.; Thenmozhi, A. J.; Selvaraju, S.; Guillemin, G. J. Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 2013, 102741.
- (75) Menze, E.; Tadros, M.; Abdel-Tawab, A.; Khalifa, A. Potential neuroprotective effects of hesperidin on 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neurotoxicology* **2012**, 33, 1265–1275.
- (76) Gil, G.; Ramirez, D.; Ribera, C. Dementia and Nutrition. Intervention Study in Institutionalized patients with Alzheimer disease. *J. Nutr. Heal.* **2002**, 7 (5), 304–308.
- (77) Marder, M.; Viola, H.; Wasowski, C.; Fernández, S.; Medina, J. H.; Paladini, A. C. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, 75 (3), 537–545.
- (78) Loscalzo, L. M.; Yow, T. T.; Wasowski, C.; Chebib, M.; Marder, M. Hesperidin induces antinociceptive effect in mice and its aglycone, hesperetin, binds to μ -opioid receptor and inhibits GIRK1/2 currents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2011**, 99 (3), 333–341.
- (79) Ikemura, M.; Sasaki, Y.; Giddings, J. C.; Yamamoto, J. Preventive effects of hesperidin, glucosyl hesperidin and naringin on hypertension and cerebral thrombosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Phyther. Res.* **2012**, 26 (9), 1272–1277.
- (80) Donato, F.; de Gomes, M. G.; Goes, A. T. R.; Filho, C. B.; Del Fabbro, L.; Antunes, M. S.; Souza, L. C.; Boeira, S. P.; Jesse, C. R. Hesperidin exerts antidepressant-like effects in acute and chronic treatments in mice: possible role of L-arginine-NO-cGMP pathway and BDNF levels. *Brain Res. Bull.* **2014**, 104, 19–26.
- (81) Rong, Z.; Pan, R.; Xu, Y.; Zhang, C.; Cao, Y.; Liu, D. Hesperidin pretreatment protects hypoxia-ischemic brain injury in neonatal rat. *Neuroscience* **2013**, 255, 292–299.

- (82) Yamamoto, M.; Jokura, H.; Suzuki, A. Effects of continuous ingestion of hesperidin and glucosyl hesperidin on vascular gene expression in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* ... **2013**, 470–473.
- (83) Natarajan, N.; Thamaraiselvan, R.; Lingaiah, H.; Srinivasan, P.; Maruthaveeran Periyasamy, B. Effect of flavonone hesperidin on the apoptosis of human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Biomed. Prev. Nutr.* **2011**, 1 (3), 207–215.
- (84) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.-. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.; Garland Science: New York, 2002.
- (85) Abuelsaad, A. S. A.; Mohamed, I.; Allam, G.; Al-Solumani, A. A. Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic aeromonas hydrophila in a murine model. *Life Sci.* **2013**, 93 (20), 714–722.
- (86) Stalikas, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **2007**, 30 (18), 3268–3295.
- (87) Bimakr, M.; Rahman, R. A.; Taip, F. S.; Ganjloo, A.; Salleh, L. M.; Selamat, J.; Hamid, A.; Zaidul, I. S. M. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha Spicata* L.) leaves. *Food Bioprod. Process.* **2011**, 89 (1), 67–72.
- (88) Rostagno, M. A.; Palma, M.; Barroso, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1012 (2), 119–128.
- (89) Khan, M. K.; Abert-Vian, M.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Dangles, O.; Chemat, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem.* **2010**, 119 (2), 851–858.
- (90) Camel, V. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst* **2001**, 126 (7), 1182–1193.
- (91) Renoe, B. Microwave assisted extraction. *Am. Lab.* **1994**, 34–39.
- (92) Peredo-Luna, H. A.; Palou-García, E.; López-Malo, A. Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Sel. Ing. Aliment.* **2009**, 3, 24–32.
- (93) Ikan, R. *Natural Products: A laboratory guide*, 2nd ed.; Academic Press, Inc.: San Diego, 1991.
- (94) Horowitz, R. M.; Gentili, B. Flavonoids of citrus. IV. Isolation of some aglycones from the lemon (*Citrus limon*). *J. Org. Chem.* **1960**, 25 (12), 2183–2187.
- (95) Sastry, G. P.; Row, L. R. Chemical investigation of citrus mitis blanco—III. *Tetrahedron* **1961**, 15 (1-4), 111–114.

- (96) El-Nawawi, S. A. Extraction of citrus glucosides. *Carbohydr. Polym.* **1995**, 27, 0–3.
- (97) Londoño, J.; Lima, V. R. De; Lara, O.; Gil, A.; Pasa, T. B. C.; Arango, G. J.; Pineda, J. R. R. Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chem.* **2010**, 119 (1), 81–87.
- (98) Inoue, T.; Tsubaki, S.; Ogawa, K.; Onishi, K.; Azuma, J. Isolation of hesperidin from peels of thinned citrus unshiu fruits by microwave-assisted extraction. *Food Chem.* **2010**, 123 (2), 542–547.
- (99) Makovsek, K. Isolation and characterisation of flavonoids from peels, University of Maribor, 2013.
- (100) Karpakavalli, M.; Arth, I.; Seena, K. Microwave assisted isolation of hesperidin, ricinoleic acid and piperic acid. *J. Sci. Res. Pharm.* **2012**, 1 (3), 76–79.
- (101) Lahmer, N.; Belboukhari, N.; Cheriti, A.; Sekkoum, K. Hesperidin and hesperitin preparation and purification from citrus sinensis peels. *Der Pharma Chem.* **2015**, 7 (2), 1–4.
- (102) Özgünay, H.; Sari, Ö.; Tozan, M. *Molecular investigation of valonea tannin*; Bornova-İZMİR, 2007.
- (103) Coy, C.; Parra, J.; Cuca, L. Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie raputia heptaphylla (rutaceae). *Elementos* **2014**, 4, 31–39.
- (104) Díaz, N.; Ruiz, J.; Reyes, E.; Cejudo, A. 8. *Espectrofotetría: espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*; IIB; Montería, 2005.
- (105) Martinez, C. A. Identificación de flavonoides con actividad antioxidante presentes en alchornea coelophylla (euphorbiaceae), Universidad Tecnológica de Pereira, 2014.
- (106) Gruenwedel, D. W.; Whitaker, J. R. *Food Analysis: principles and techniques*, Volumen 4.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1986.
- (107) Striegel, M.; Hill, J. *Thin-layer chromatography for binding media analysis*; The Getty Conservation Institute: Los Angeles, 1997.
- (108) Erazo, E. L. Separación y caracterización de metabolitos secundarios de la hiedra (hedera helix) de Ecuador con fines de aporte a una técnica de identificación, Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, 2013.
- (109) Escobar B., M. Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México. **2010**.
- (110) Stefova, M.; Stafilov, T.; Kulevanova, S. HPLC Analysis of flavonoids. In *Encyclopedia of Chromatography*; J. Cazes, Ed.; Marcel Dekker, Inc.: Skopie,

2003; pp 113–119.

- (111) Chirinos, R.; Betalleluz-Pallardel, I.; Huamán, A.; Arbizu, C.; Pedreschi, R.; Campos, D. HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from andean oca (*oxalis tuberosa* mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chem.* **2009**, *113* (4), 1243–1251.
- (112) Bohm, B. A. *Introduction to flavonoids*, 1st ed.; CRC Press: Vancouver, 1998.
- (113) Neira, A. Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto clorofórmico de la orquídea comestible *Prosthechea* Michuacana, Instituto Politécnico Nacional, 2009.
- (114) Serrano, J. L. *Espectroscopia infrarroja*; Murcia, 2008.
- (115) Pinheiro, P.; Justino, G. Structural analysis of flavonoids and related compounds-a review of spectroscopic applications. In *Phytochemicals – A global perspective of their role in nutrition and health*; Rao, V., Ed.; InTech: Rijeka, 2012; pp 33–50.
- (116) Nicasio Collazo, L. A. *Métodos de difracción de rayos X*; Guanajuato, 2008.
- (117) Andersen, Ø. M.; Markham, K. R. *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, 2006.
- (118) Rolo-Naranjo, A.; Codorniu-Hernández, E.; Ferro, N. Quantum chemical associations ligand–residue: their role to predict flavonoid binding sites in Proteins. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50* (5), 924–933.
- (119) Harper, J.; Doebbler, J. A Combined solid-state NMR and synchrotron X-ray diffraction powder study on the structure of the antioxidant (+)-catechin 4.5-hydrate. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *9* (132), 2928–2937.
- (120) Smith, I. C. P.; Blandford, D. E. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Chem.* **1995**, *12* (67), 509–518.
- (121) Vinod K., S.; Raghuveer, I.; Alok, S.; Himanshu, G. Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the ethanolic extract. *Pharm. Sci. Res.* **2010**, *1* (1), 39–45.
- (122) Mamta, S.; Jyoti, S. Phytochemical screening *acorus calamus* and *lantana camara*. *Pharmacy* **2012**, *3* (5), 324–326.
- (123) Özcan, E. Ultrasound assisted extraction of phenolics from grape pomace, Middle East Technical University, 2006.
- (124) Chang, C.; Yang, M.; Wen, H.; Chern, J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. food drug* **2002**, *10* (3), 178–182.
- (125) Muñoz, A.; Vargas, L.; Stashenko, E.; Kouznetsov, V. Improved Trolox® equivalent antioxidant capacity assay for efficient and fast search of new

- antioxidant agent. *Anal. Chem. Lett.* **2011**, 1 (1), 86–102.
- (126) Dickson, C. *Experiments in pharmaceutical chemistry*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, 2014.
- (127) Romdhane, M. Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chem. Eng. J.* **2002**, 87 (1), 11–19.
- (128) Singanusong, R.; Nipornram, S.; Tochampa, W.; Rattanatraiwong, P. Low Power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (citrus reticulata blanco cv. sainampueng) and lime (citrus aurantifolia) peels and the antioxidant. *Food Anal. Methods* **2014**, 8 (5), 1112–1123.
- (129) Vargas Rueda, S. J. Extracción y análisis de compuestos flavonoides presentes en cáscara de mandarina, Universidad Santo Tomás, 2013.
- (130) Krishnaswamy, N. R. *Chemistry of natural products: A laboratory handbook*, 1st ed.; Universities Press (India) Private Limited: Hyderabad, 2003.
- (131) Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial by-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. *Food Chem.* **2006**, 99 (1), 191–203.
- (132) Naczek, M.; Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41 (5), 1523–1542.
- (133) Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência y Tecnol. Aliment.* **2005**, 25 (4), 726–732.
- (134) Osman, A. M.; Wong, K. K. Y.; Fernyhough, A. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 346 (1), 321–329.
- (135) Juranek, I.; Rackova, L.; Stefek, M. Stobadine – An indole type alternative to the phenolic antioxidant reference Trolox. **2010**.
- (136) Bigoniya, P.; Singh, K. Ulcer protective potential of standardized hesperidin, a citrus flavonoid isolated from citrus sinensis. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2014**, 24 (3), 330–340.
- (137) Aghel, N.; Ramezani, Z.; Beiranvand, S. Hesperidin from *Citrus Sinensis* cultivated in Dezful, Iran. *Pakistan J. Biol. Sci.* **2008**, 11 (20), 2451–2453.
- (138) Conde, E.; Cadahia, E.; Garcia Vallejo, M. C.; Diez, R. Composición polifenólica de madera, corteza y hojas de *eucalyptus camaldulensis*, *e. globulus* y *e. rudis*. *Investig. Agrar. Sist. Recur. For.* **1994**, 5 (2), 333–350.
- (139) Grohmann, K.; Manthey, J. A.; Cameron, R. G. Acid-catalyzed hydrolysis of

- hesperidin at elevated temperatures. *Carbohydr. Res.* **2000**, 328 (2), 141–146.
- (140) Macoritto, A.; Geronazzo, H.; Ellenrieder, G. Obtención de la hesperidina a partir de naranjas de derrame. *Inf. Tecnológica* **2001**, 12 (4), 3–7.
- (141) Arranz Martínez, S. Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación., Universidad de Madrid, 2010.
- (142) Céliz, G.; Rodríguez, J.; Soria, F.; Daz, M. Synthesis of hesperetin 7-O-glucoside from flavonoids extracted from citrus waste using both free and immobilized L-Rhamnosidases. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2015**, 4 (3), 335–341.
- (143) Pérez, V.; Lugo, E.; Gutiérrez, M.; Del Toro, C. Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*citrus limetta risso*) y determinación de su actividad antioxidante. *Rev. Ciencias Biológicas y la Salud* **2013**, XV (3), 18–22.

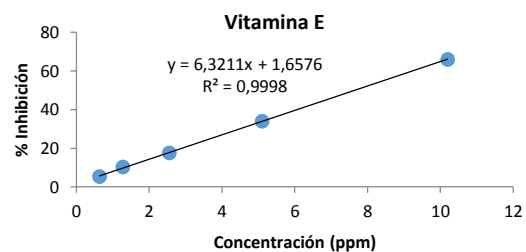
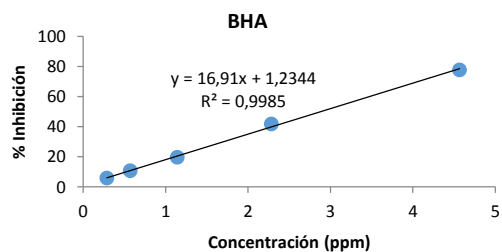
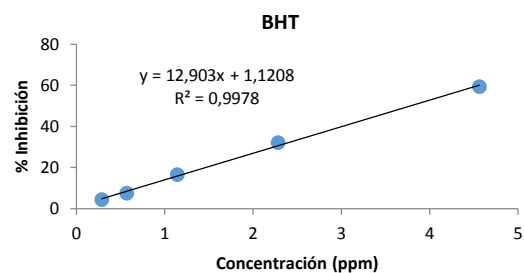
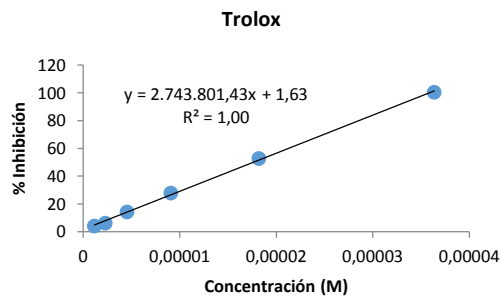
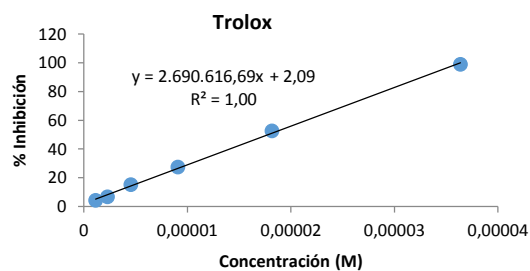
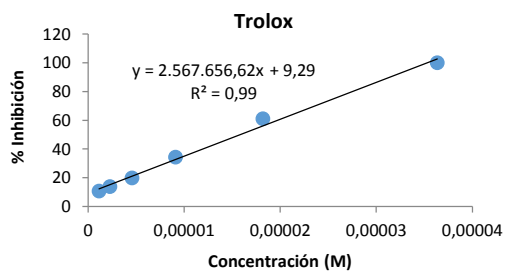
ANEXOS

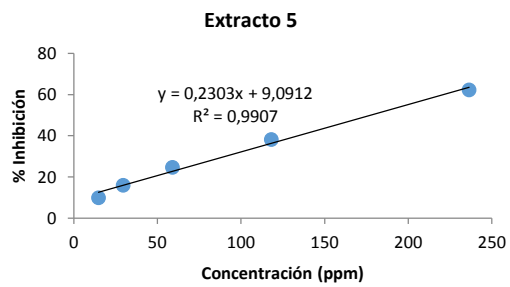
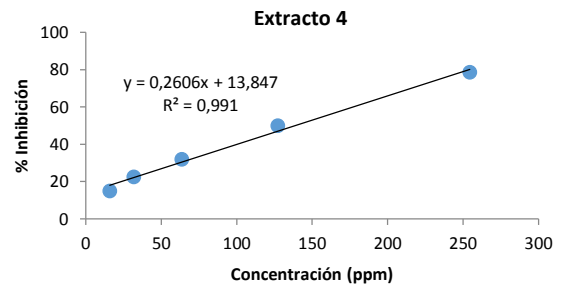
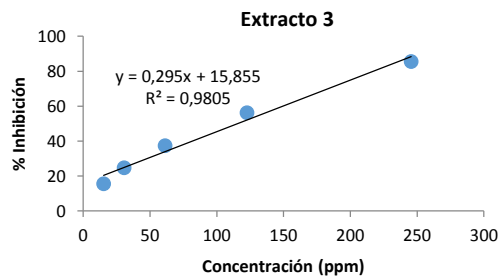
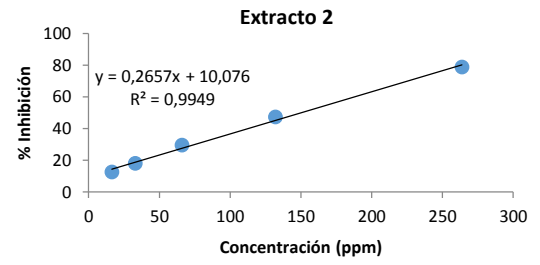
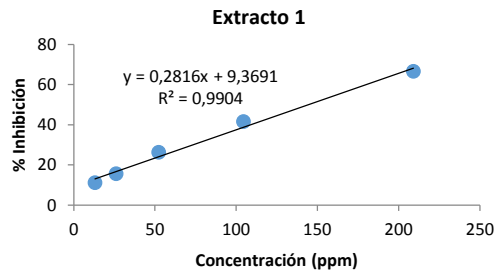
Anexo 1. Sistema de gradiente de elución empleada en HPLC para el análisis de la hesperidina en los extractos etanólicos.

Flujo (mL/min)	Tiempo (min.)	A, %	B, %
1.0	0	20	80
1.0	3	20	80
1.0	3,5	25	75
1.0	4	30	70
1.0	7	30	70
1.0	7,5	35	65
1.0	8	40	60
1.0	11	40	60
1.0	11,5	45	55
1.0	12	50	50
1.0	15	50	50
1.0	15,5	55	45
1.0	16	60	40
1.0	20	60	40
1.0	20,5	65	35
1.0	21	70	30
1.0	25	70	30
1.0	25,5	75	25
1.0	26	80	20
1.0	30	80	20
1.0	30,5	85	15
1.0	31	90	10
1.0	35	90	10
1.0	35,5	95	5
1.0	36	90	10
1.0	41	50	50
1.0	46	20	80
1.0	50	20	80

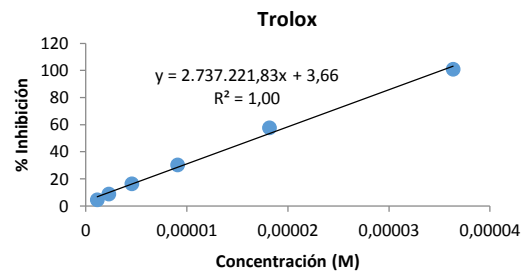
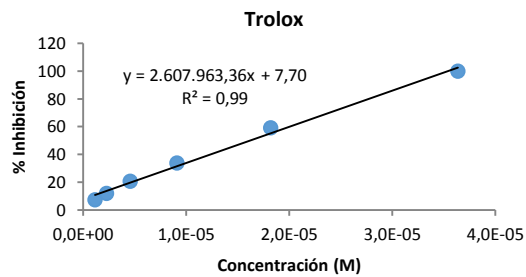
Anexo 2. Gráficas del efecto de la inhibición del ABTS⁺.

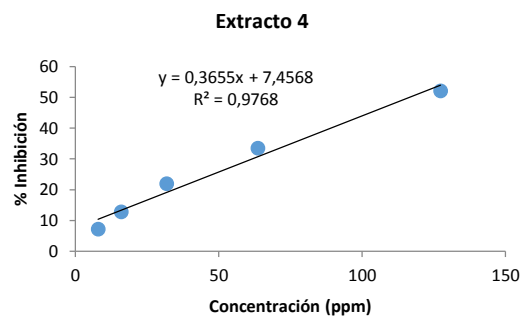
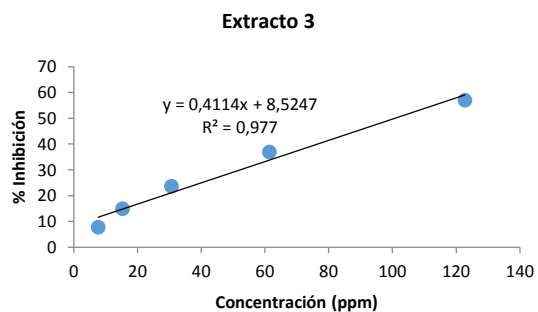
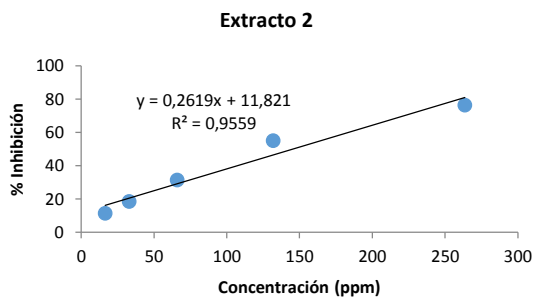
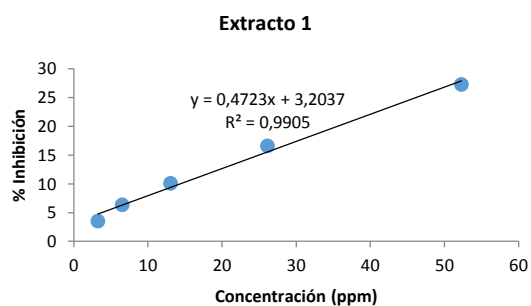
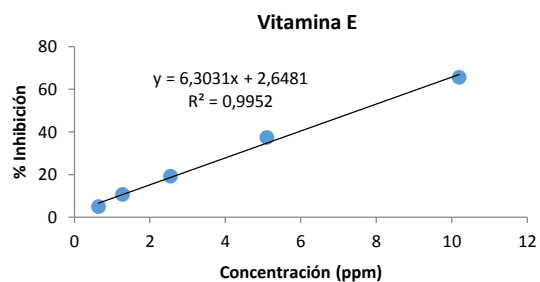
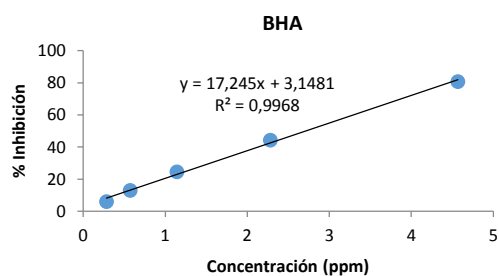
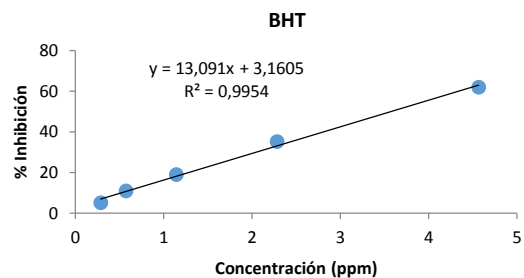
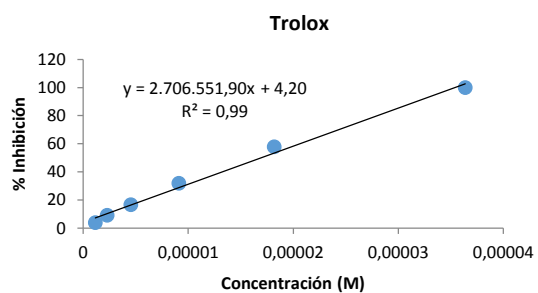
(Réplica 1)

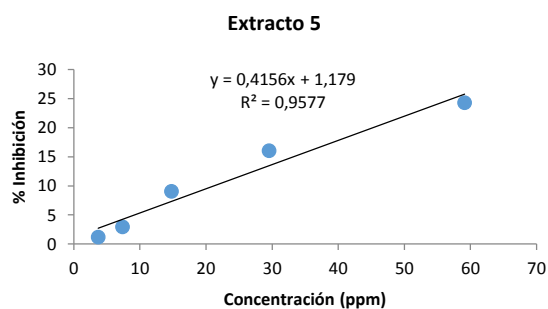




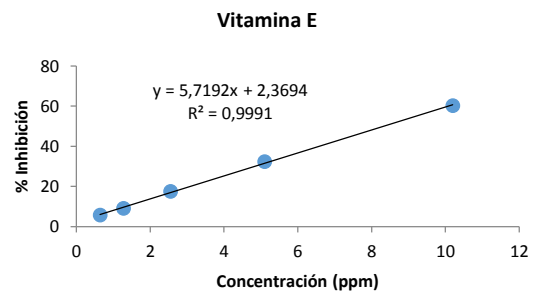
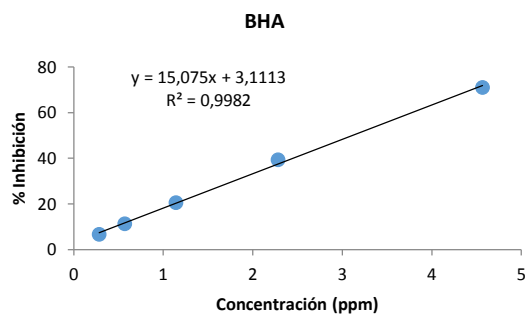
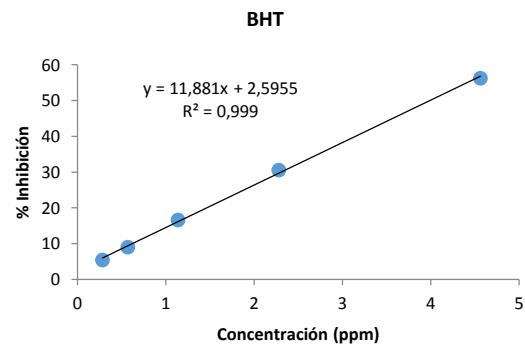
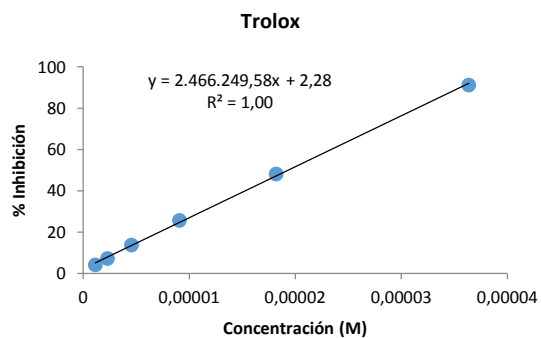
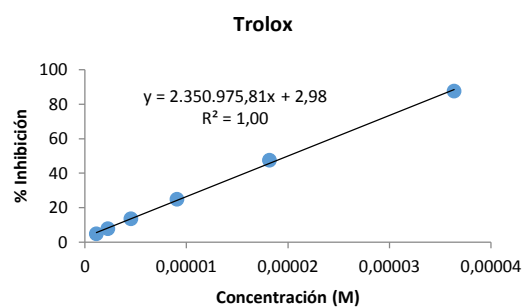
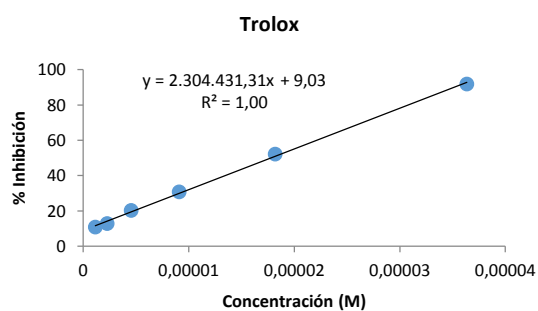
(Réplica 2)

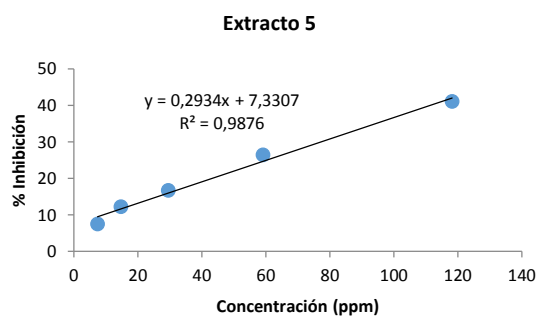
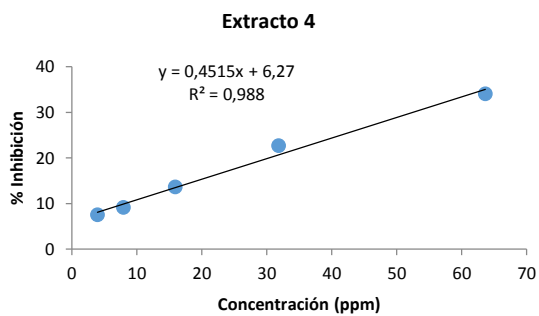
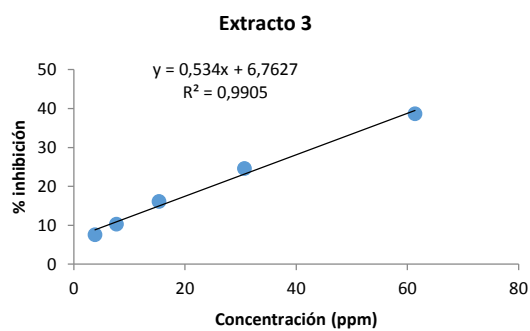
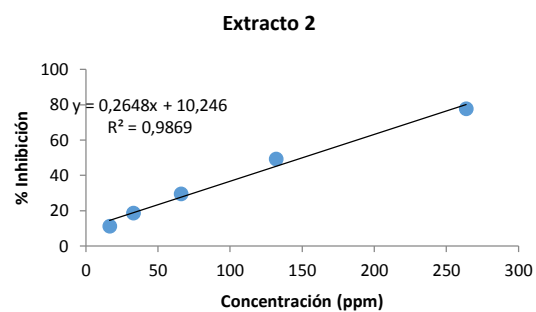
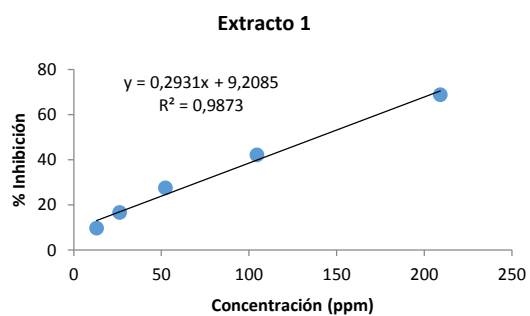




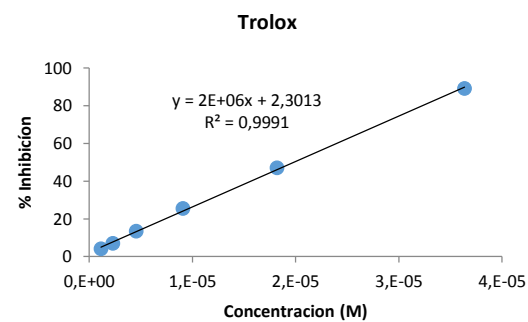
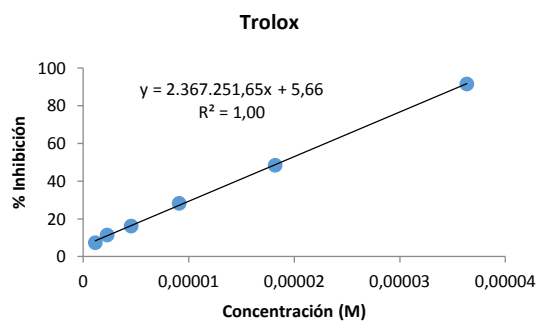


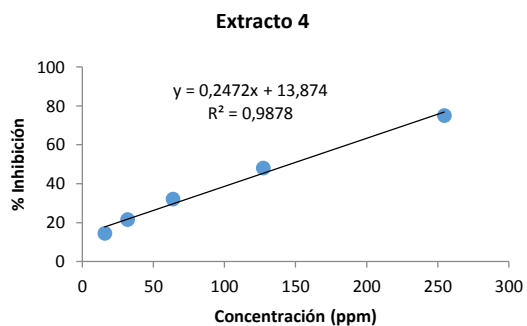
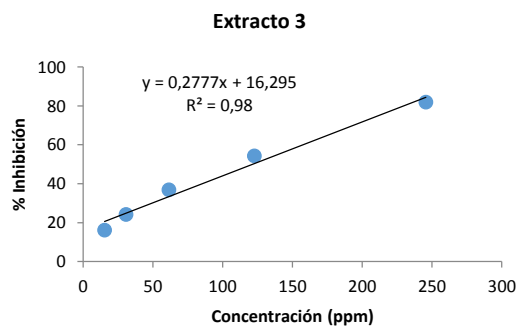
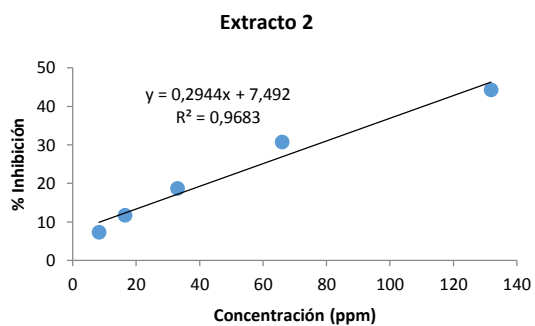
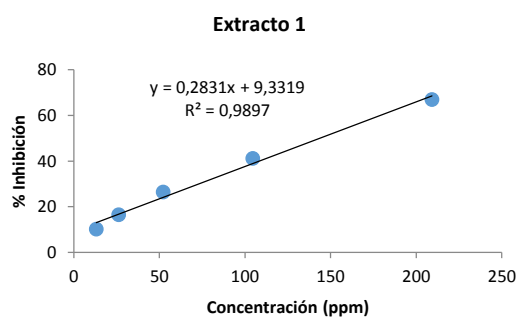
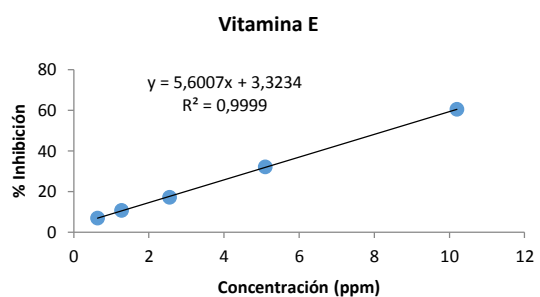
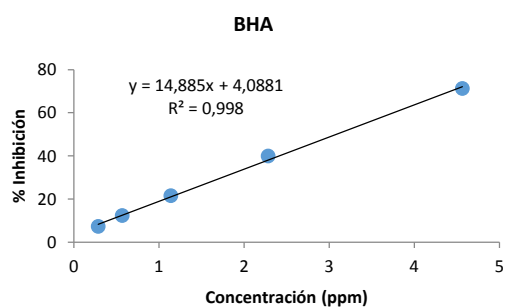
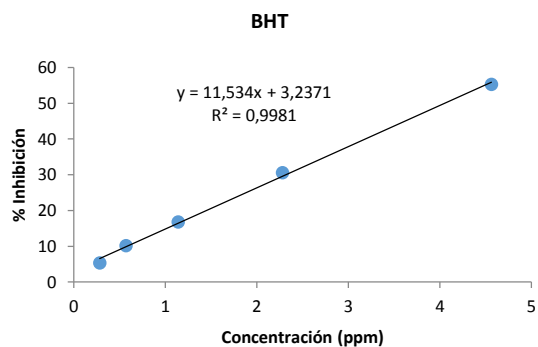
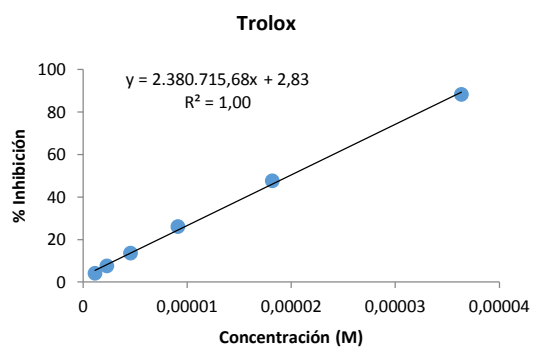
(Réplica 3)

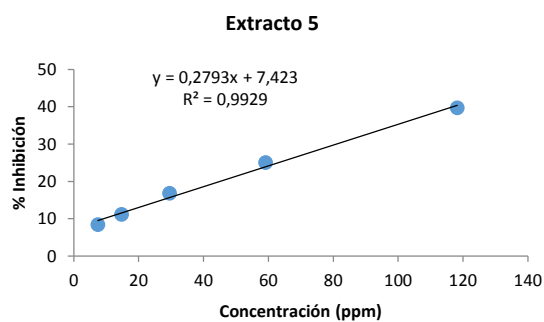




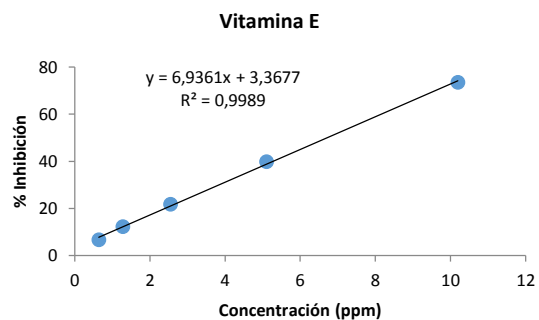
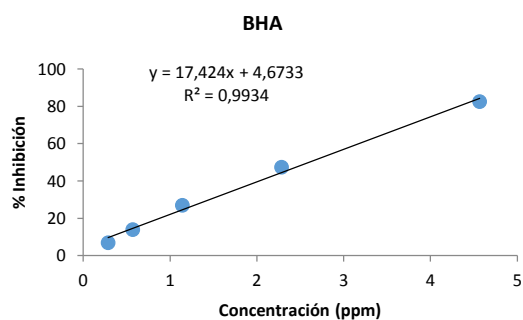
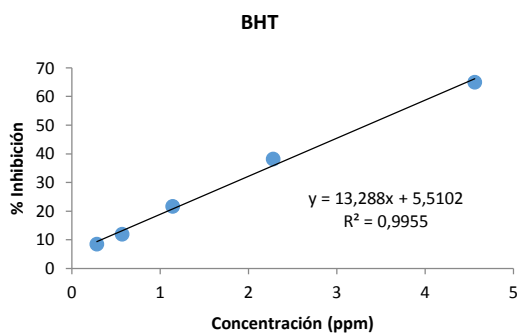
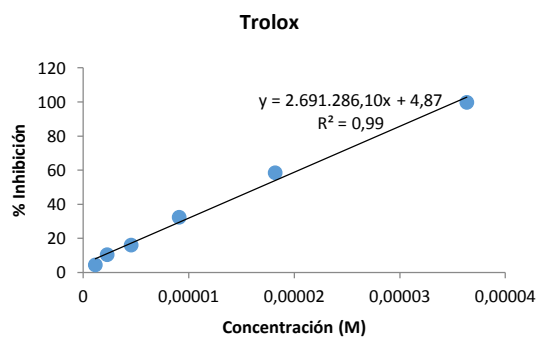
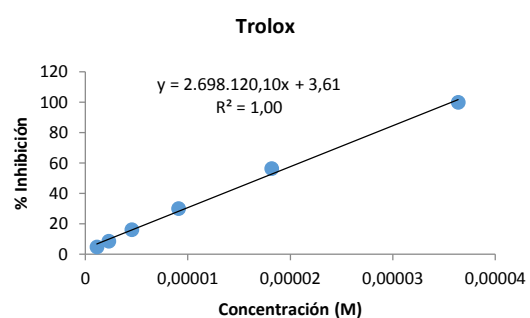
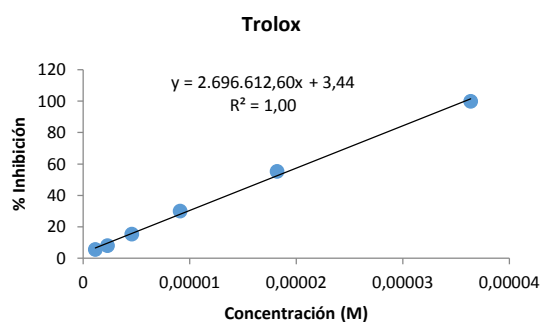
(Réplica 4)

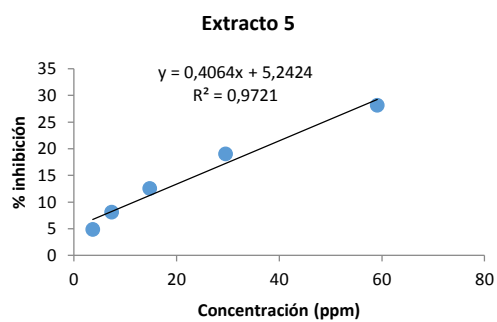
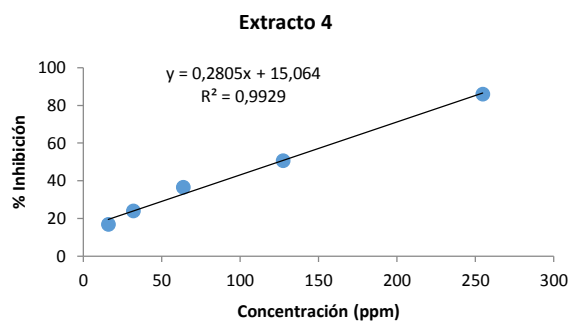
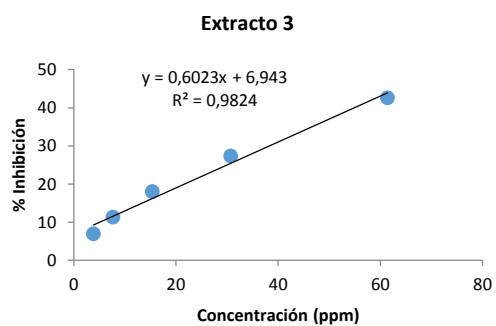
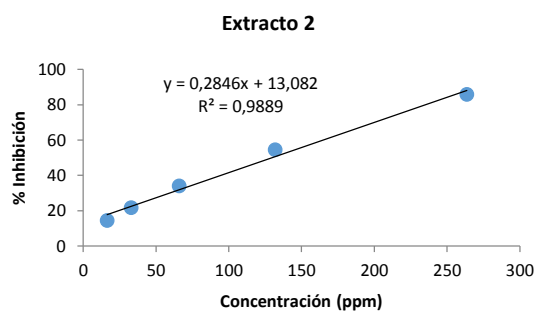
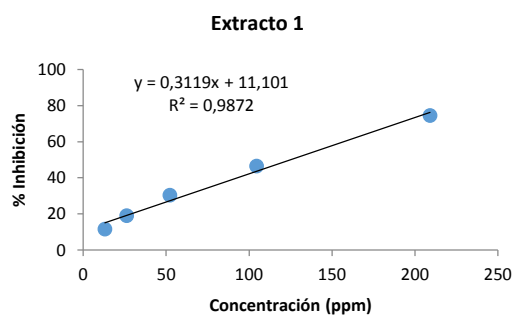






(Réplica 5)





Anexo 3. Metodología aplicada para determinar la actividad antioxidante total (TAA)

Preparación solución ABTS⁺:

Se pesó 3,3 mg de persulfato de potasio, luego se le adicionaron 14 mg de ABTS y se aforó a 5 mL con agua destilada, esta solución se puso en ultrasonido y se dejó reposar por 18 h en ausencia de luz y a una temperatura entre 15 y 20 °C.

Preparación extractos:

Se pesaron entre 2 y 5 mg de cada extracto y se disolvieron en 1 mL de etanol grado analítico

Concentraciones empleadas

	TROLOX	TROLOX	TROLOX	BHT	BHA	VIT E	E1	E2	E3	E4	E5
A	0,0008	0,0008	0,0008	200,8	200,9	448,7	2300	2900	2700	2800	2600
B	0,0004	0,0004	0,0004	100,4	100,45	224,35	1150	1450	1350	1400	1300
C	0,0002	0,0002	0,0002	50,2	50,225	112,17	575	725	675	700	650
D	0,0001	0,0001	0,0001	25,1	25,1125	56,087	287,5	362,5	337,5	350	325
E	0,00005	0,00005	0,00005	12,55	12,55625	28,043	143,75	181,25	168,75	175	162,5
F	0,000025	0,000025	0,000025	6,275	6,278125	14,021	71,875	90,625	84,375	87,5	81,25
G	0,0000125	0,0000125	0,0000125	3,1375	3,139062	7,0109	35,937	45,312	42,187	43,75	40,625

Se preparó una solución de ABTS y etanol para obtener una absorbancia entre 700 y 750 nm, el cual se empleará como blanco.

Lectura de blancos (734 nm)

	TROLOX	TROLOX	TROLOX	BHT	BHA	VIT E	E1	E2	E3	E4	E5
A	0,022	0,024	0,027	0,025	0,033	0,023	0,028	0,027	0,023	0,025	0,024
B	0,026	0,022	0,03	0,023	0,027	0,027	0,025	0,029	0,025	0,025	0,025
C	0,025	0,025	0,03	0,025	0,023	0,023	0,03	0,026	0,025	0,025	0,028
D	0,034	0,024	0,027	0,024	0,024	0,084	0,025	0,026	0,024	0,025	0,027
E	0,025	0,025	0,028	0,027	0,025	0,022	0,022	0,026	0,026	0,026	0,023
F	0,023	0,025	0,03	0,023	0,035	0,024	0,074	0,104	0,028	0,025	0,029
G	0,029	0,029	0,025	0,025	0,024	0,024	0,022	0,023	0,024	0,025	0,028
H	0,025	0,022	0,037	0,03	0,028	0,028	0,023	0,024	0,024	0,038	0,026

Se lee la absorbancia a los 0 minutos

Lectura 0 minutos

	TROLOX	TROLOX	TROLOX	BHT	BHA	VIT E	E1	E2	E3	E4	E5
A	0,637	0,708	0,709	0,713	0,696	0,702	0,708	0,709	0,725	0,721	0,726
B	0,033	0,023	0,032	0,42	0,037	0,026	0,416	0,362	0,342	0,349	0,478
C	0,031	0,041	0,037	0,526	0,052	0,024	0,534	0,51	0,465	0,495	0,566
D	0,327	0,347	0,361	0,599	0,24	0,303	0,603	0,585	0,552	0,594	0,627
E	0,48	0,52	0,522	0,652	0,413	0,488	0,638	0,634	0,611	0,621	0,653
F	0,571	0,608	0,609	0,67	0,58	0,582	0,7	0,719	0,653	0,654	0,679
G	0,632	0,657	0,657	0,693	0,622	0,639	0,686	0,683	0,671	0,673	0,7
H	0,629	0,673	0,682	0,7	0,67	0,671	0,692	0,695	0,685	0,711	0,707

Se realizó una segunda lectura 30 minutos después

Lectura 30 minutos

	TROLOX	TROLOX	TROLOX	BHT	BHA	VIT E	E1	E2	E3	E4	E5
A	0,61	0,69	0,691	0,69	0,675	0,683	0,686	0,68	0,684	0,688	0,688
B	0,033	0,023	0,032	0,032	0,027	0,025	0,245	0,169	0,12	0,167	0,274
C	0,025	0,032	0,027	0,105	0,026	0,024	0,416	0,374	0,313	0,355	0,436
D	0,291	0,337	0,338	0,293	0,171	0,308	0,512	0,491	0,437	0,474	0,524
E	0,459	0,504	0,503	0,475	0,409	0,457	0,579	0,567	0,523	0,538	0,577
F	0,552	0,584	0,595	0,574	0,565	0,568	0,661	0,681	0,585	0,586	0,624
G	0,598	0,644	0,643	0,635	0,613	0,616	0,649	0,653	0,618	0,622	0,651
H	0,614	0,654	0,669	0,661	0,649	0,653	0,663	0,663	0,646	0,663	0,667

El valor de la absorbancia a los 30 min se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$Abs = Abs\ muestra - abs\ blanco$$

Absorbancia 30 minutos

	TROLOX	TROLOX	TROLOX	BHT	BHA	VIT E	E1	E2	E3	E4	E5
A	0,588	0,666	0,664	0,665	0,642	0,66	0,658	0,653	0,661	0,663	0,664
B	0,007	0,001	0,002	0,009	0	-0,002	0,22	0,14	0,095	0,142	0,249
C	0	0,007	-0,003	0,08	0,003	0,001	0,386	0,348	0,288	0,33	0,408
D	0,257	0,313	0,311	0,269	0,147	0,224	0,487	0,465	0,413	0,449	0,497
E	0,434	0,479	0,475	0,448	0,384	0,435	0,557	0,541	0,497	0,512	0,554
F	0,529	0,559	0,565	0,551	0,53	0,544	0,587	0,577	0,557	0,561	0,595
G	0,569	0,615	0,618	0,61	0,589	0,592	0,627	0,63	0,594	0,597	0,623
H	0,589	0,632	0,632	0,631	0,621	0,625	0,64	0,639	0,622	0,625	0,641

El porcentaje de inhibición se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{promedio de abs blancos} - \text{abs muestras}}{\text{promedio de abs blancos}} * 100$$

Porcentaje de inhibición 30 minutos

	TROLOX	TROLOX	TROLOX	BHT	BHA	VIT E	E1	E2	E3	E4	E5
B	98,939	99,848	99,697	98,63	100,000	100,30	66,653	78,779	85,600	78,476	62,257
C	100,000	98,939	100,455	87,87	99,545	99,848	41,491	47,251	56,346	49,979	38,156
D	61,045	52,556	52,859	59,22	77,718	66,047	26,182	29,516	37,398	31,942	24,666
E	34,215	27,394	28,001	32,09	41,794	34,064	15,571	17,996	24,666	22,392	16,026
F	19,815	15,268	14,359	16,48	19,664	17,542	11,024	12,540	15,571	14,965	9,811
G	13,752	6,780	6,325	7,538	10,721	10,266	4,961	4,506	9,963	9,508	5,567
H	10,721	4,203	4,203	4,354	5,870	5,264	2,990	3,142	5,719	5,264	2,839

Se tomaron ocho concentraciones diferentes de cada muestra y se realizó la respectiva curva de concentración vs % inhibición.

Concentraciones en la placa

	TROLOX	TROLOX	TROLOX	BHT	BHA	VIT E	E1	E2	E3	E4	E5
B	7,27E-05	7,27E-05	7,27E-05	1,83E+01	1,83E+01	4,08E+01	2,09E+02	2,64E+02	2,45E+02	2,55E+02	2,36E+02
C	3,64E-05	3,64E-05	3,64E-05	9,13E+00	9,13E+00	2,04E+01	1,05E+02	1,32E+02	1,23E+02	1,27E+02	1,18E+02
D	1,82E-05	1,82E-05	1,82E-05	4,56E+00	4,57E+00	1,02E+01	5,23E+01	6,59E+01	6,14E+01	6,36E+01	5,91E+01
E	9,09E-06	9,09E-06	9,09E-06	2,28E+00	2,28E+00	5,10E+00	2,61E+01	3,30E+01	3,07E+01	3,18E+01	2,95E+01
F	4,55E-06	4,55E-06	4,55E-06	1,14E+00	1,14E+00	2,55E+00	1,31E+01	1,65E+01	1,53E+01	1,59E+01	1,48E+01
G	2,27E-06	2,27E-06	2,27E-06	5,70E-01	5,71E-01	1,27E+00	6,53E+00	8,24E+00	7,67E+00	7,95E+00	7,39E+00
H	1,14E-06	1,14E-06	1,14E-06	2,85E-01	2,85E-01	6,37E-01	3,27E+00	4,12E+00	3,84E+00	3,98E+00	3,69E+00

Con la ecuación de la recta, se determinó el IC₅₀ (concentración de inhibición media) para cada una de las muestras, siendo y= 50; x = IC₅₀.

Para determinar el TAA (actividad antioxidante total) se aplicó la siguiente fórmula:

Trolox (mili moles) = IC₅₀ * 1 000

Trolox (moles) = 0,0198758692480014

Muestras (kg) = IC₅₀ / 1 000 000

TAA = Trolox (moles) / muestras (kg)

Anexo 4. Informe de resultados difracción de rayos-X

 	LABORATORIO DE RAYOS-X		Código: F-LRX-P-04
			Versión: 02
	INFORME DE RESULTADOS DIFRACCIÓN DE RAYOS-X		Página 1 de 2

FECHA	DIA	MES	AÑO	INFORME	INF-505-15-I-DRX
	08	10	2015		

DATOS DEL CLIENTE			
Empresa	Grupo de Investigación en Química Estructural (GIQUE)		
Nombre	Dr. Hernando Camargo García		
Dirección	Km 2 vía refugio Guatiguará sede UIS	Nit o C.C	890.201.213-4
Ciudad	Piedecuesta	Orden de Compra	
e-mail	nandocamargo@gmail.com	Teléfono	6797169

METODOLOGIA DE TRABAJO																									
Preparación de la(s) muestra(s)	El espécimen seleccionado de cada muestra fue montado en un portamuestra de polimetilmetacrilato (PMMA) mediante la técnica de llenado frontal.																								
Medición por Difracción de Rayos-X	Se realizó en un difractómetro de polvo marca BRUKER modelo D8 ADVANCE con Geometría DaVinci bajo las siguientes condiciones: <table> <tr><td>Voltaje</td><td>40(kV)</td></tr> <tr><td>Corriente</td><td>40(mA)</td></tr> <tr><td>Rendija de Divergencia</td><td>0,6mm</td></tr> <tr><td>Rendijas Soller Primario</td><td>2,5°</td></tr> <tr><td>Muestreo</td><td>0,01526° 2theta</td></tr> <tr><td>Rango de Medición</td><td>4-50° 2theta</td></tr> <tr><td>Radiación</td><td>CuKα1</td></tr> <tr><td>Filtro</td><td>Níquel</td></tr> <tr><td>Uso de Anti-dispersor de Aire</td><td>No</td></tr> <tr><td>Detector</td><td>Lineal LynxEye</td></tr> <tr><td>Tipo de barrido</td><td>A pasos</td></tr> <tr><td>Tiempo de muestreo</td><td>2 segundos</td></tr> </table>	Voltaje	40(kV)	Corriente	40(mA)	Rendija de Divergencia	0,6mm	Rendijas Soller Primario	2,5°	Muestreo	0,01526° 2theta	Rango de Medición	4-50° 2theta	Radiación	CuKα1	Filtro	Níquel	Uso de Anti-dispersor de Aire	No	Detector	Lineal LynxEye	Tipo de barrido	A pasos	Tiempo de muestreo	2 segundos
Voltaje	40(kV)																								
Corriente	40(mA)																								
Rendija de Divergencia	0,6mm																								
Rendijas Soller Primario	2,5°																								
Muestreo	0,01526° 2theta																								
Rango de Medición	4-50° 2theta																								
Radiación	CuKα1																								
Filtro	Níquel																								
Uso de Anti-dispersor de Aire	No																								
Detector	Lineal LynxEye																								
Tipo de barrido	A pasos																								
Tiempo de muestreo	2 segundos																								
Tratamiento de la(s) muestra(s)	Químico ☐ Térmico ☐ Ninguno ☒																								

MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS			
Fecha de Medición	02/10/2015	Fecha Análisis de Resultados	---
Tipo de Muestra(s)	Orgánicas	Fecha de Recepción de la(s) Muestra(s)	01/10/2015

		LABORATORIO DE RAYOS-X	Código: F-LRX-P-04
		INFORME DE RESULTADOS DIFRACCIÓN DE RAYOS-X	Versión: 02
			Página 2 de 2

RESULTADOS OBTENIDOS

1. PATRON HESPERIDINA (D6TV)
2. EMH 2/9 (D6TY)

Observaciones:

- Los resultados se relacionan únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).
- Si desea expresar su percepción con respecto al presente servicio o ensayo, hágalo por medio del correo electrónico direccionrx@uis.edu.co o al PBX: 6344000 Ext. 3512.
- No se debe reproducir el informe de ensayo excepto en su totalidad, sin la aprobación escrita del laboratorio.

Elaboró:	Revisó:	Aprobó:
MSc. José Luis Pinto C Profesional Analista PQ. 2009	Qco. Jose Hernando Quintana Mendoza Coordinador de calidad PQ. 3408	Dr. José Antonio Henao M. Director Laboratorio Rayos-X PQ. 0321