

# Universidad de Costa Rica

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

*PROYECTO DE GRADUACIÓN SOMETIDO A CONSIDERACIÓN DE LA  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA COMO REQUISITO FINAL PARA  
OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA*

---

## Proyecto final de graduación

*EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES PRESENTES EN LAS CÁSCARAS DE  
LA NARANJA (CITRUS SINENSIS) Y SU CARACTERIZACIÓN  
MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PARA SU USO  
COMO ANTIOXIDANTES.*

---

Luis Diego Ramos Castro

*San José, 2023.*



**Extracción de flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja  
(*Citrus sinensis*) y su caracterización mediante Resonancia Magnética  
Nuclear para su uso como antioxidantes.**

Informe del proyecto de graduación presentado ante la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de Costa Rica como requisito final para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química.

**Sustentante:**

Luis Diego Ramos Castro.

**Tribunal examinador:**

---

Ing<sup>a</sup>. Paula Solano Sánchez, M.Sc.  
Docente  
Escuela Ingeniería Química, UCR

Presidenta del tribunal

---

Quím<sup>o</sup>. Renato Murillo Masis, Ph.D.  
Docente  
Escuela Química, UCR

Director del proyecto

---

Ing<sup>a</sup>. Juliana Da Luz Castro, Licda.  
Docente  
Escuela Ingeniería Química, UCR

Miembro asesor

---

Ing. Allan Mora Vindas, Lic.  
Docente  
Escuela Ingeniería Química, UCR

Miembro asesor

---

Ing. René Mora Casal, Ph.D.  
Docente  
Escuela Ingeniería Química, UCR

Miembro invitado



# DEDICATORIA

A Dios primeramente por brindarme la oportunidad de terminar la etapa universitaria.

A mi mamá, Marcela Castro, por darme la vida y ser mi mayor ejemplo desde que nací, por enseñarme a superarme cada día más y a disfrutar la vida a pesar de los obstáculos que se presentan cotidianamente.

A mi papá, Wilman Marzo, por ser un apoyo incondicional desde mi niñez.

A mi hermana, Mariela Marzo por enseñarme a ser mejor persona día a día y desarrollar en mí la paciencia y el trabajo en equipo.

A mi abuela, Ana Lucía Morgan, por estar siempre presente y disponible para mí desde el primer día de mi vida, por ser la guía y fortaleza para mi mamá y mi persona en todo momento.

Finalmente a mis tías, Ailyn Castro y Paola Castro, por su apoyo incondicional en mi formación académica y personal.



# AGRADECIMIENTOS

Primeramente deseo agradecer a Dios por ser mi guía en todo momento y permitirme culminar esta etapa de mi vida.

A mi núcleo familiar: papás, hermana, tías, tíos y abuela por ser personas de bien, humildes y trabajadoras que me enseñaron a realizar todas las cosas de corazón y que el esfuerzo por conseguir lo que uno anhela trae sus recompensas.

A Hannia López, por ser mi compañera de carrera incondicional y siempre estar presente en los momentos donde más la necesité.

A Renato Murillo, mi director del proyecto final de graduación quien con total confianza y disposición me ofreció su laboratorio y todos los materiales necesarios para el desarrollo de dicho proyecto. Además de brindarme su conocimiento, guía, paciencia y motivación para culminar con esta etapa de mi vida estudiantil.

A los profesores Mirtha Navarro (Laboratorio BioDess), Juliana DaLuz y Allan Mora por sus valiosos aportes a lo largo del proyecto y su disposición a colaborar en cualquier momento.

A mis compañeros de estudio y generación, por compartir conmigo durante varios años y hacer más amena la carga universitaria en los finales de semestre.

Finalmente a la Escuela de Química, por brindarme el uso de sus instalaciones para el desarrollo del proyecto y a la Escuela de Ingeniería Química por su ayuda y cooperación a lo largo de toda mi carrera universitaria.





## RESUMEN

El objetivo principal de este proyecto fue evaluar las condiciones de extracción vía ultrasonido de polifenoles presentes en las cáscaras de la naranja (*Citrus sinensis*) mediante la caracterización con resonancia magnética nuclear (RMN) para su uso como antioxidantes. Se dió énfasis en las cáscaras de la naranja debido a que es la fruta con mayor producción y consumo per cápita a nivel mundial, además de las ya reconocidas propiedades beneficiosas para la salud que posee como por ejemplo: antiinflamatorio, antirombótico, antimicrobiano, antialérgico, cardio protector, vasodilatador, entre otros.

Para el cumplimiento de dicho objetivo se realizó una optimización por metodología de superficie de respuesta (MSR) de las condiciones de extracción para la obtención de los compuestos fenólicos presentes en dichas cáscaras mediante el método de Folin-Ciocalteu. Se aplicó un diseño central compuesto giratorio (DCC) para determinar el efecto que tienen: la temperatura del baño ultrasónico (30 a 60) °C, concentración de etanol (80 a 90) %v/v y el ratio solvente/sólido (10 a 20) mL/g. Los resultados mostraron que solamente el término cuadrático de la temperatura es significativo para la obtención de los compuestos fenólicos, pues su valor-p fue 0.017, menor a la significancia utilizando un 95% de confianza.

Por otra parte las condiciones óptimas de extracción resultaron ser las siguientes: concentración de etanol de 76.59 %v/v, temperatura del baño ultrasónico de 34.55 °C y un ratio solvente/sólido de 15.42 mL/g. Bajo dichas condiciones optimizadas se obtuvo una cantidad total de polifenoles presentes en los extractos de 67.25 mg GAE/g de muestra mediante el método de Folin-Ciocalteu, el cual resultó muy cercano al valor predicho teóricamente por el modelo de 65.55 mg GAE/g de muestra. Además para dichas condiciones de trabajo se determinó la capacidad antioxidante mediante la prueba DPPH con un resultado de 422.25 mg de extracto/L.

Con los resultados obtenidos se logró identificar mediante resonancia magnética nuclear la presencia de distintos flavonoides en las extracciones realizadas a las cáscaras de la naranja vía ultrasónica, como por ejemplo: la Sinensetina con alto grado de pureza y Tangeretina. Se recomienda realizar un nuevo diseño de superficie de respuesta utilizando como punto central los factores que generan la mejor combinación dentro del rango analizado para identificar un óptimo de operabilidad.



# ÍNDICE

	<i>Página</i>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>vii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivo general . . . . .	3
1.2 Objetivos específicos . . . . .	3
<b>FUNDAMENTO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
2.1 Cultivo de naranja: . . . . .	5
2.2 Características morfológicas de la naranja: . . . . .	6
2.3 Sustancias de interés en frutos cítricos: . . . . .	7
2.4 Métodos de extracción: . . . . .	10
2.4.1 Soxhlet: . . . . .	11
2.4.2 Asistido supercrítico: . . . . .	12
2.4.3 Asistido ultrasonido: . . . . .	13
2.4.4 Asistido microondas: . . . . .	14
2.5 Identificación y caracterización de flavonoides: . . . . .	15
2.5.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN): . . . . .	15
2.5.2 Cromatografía Capa Fina (CCF): . . . . .	17
2.6 Capacidad antioxidante y cantidad total de polifenoles: . . . . .	18
2.7 Diseño de experimentos: Metodología Superficie de Respuesta (MSR)	20
<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	<b>23</b>
3.1 Recolección y pretratamiento del material vegetal . . . . .	24
3.2 Análisis preliminares para la extracción asistida ultrasonido . . . . .	25
3.3 Obtención de los extractos fenólicos mediante extracción asistida por ultrasonido . . . . .	30

3.4	Caracterización de los flavonoides presentes en los extractos de las cáscaras de la naranja mediante resonancia magnética nuclear y cromatografía de capa fina . . . . .	33
3.5	Cuantificación de flavonoides totales . . . . .	35
3.6	Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH de los flavonoides extraídos vía ultrasónica . . . . .	36
<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>		<b>39</b>
4.1	Obtención de los extractos de las cáscaras de la naranja vía ultrasónica	39
4.2	Elucidación y cuantificación del contenido de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de las cáscaras de naranja mediante Resonancia Magnética Nuclear y Cromatografía de Capa Fina . . . .	50
4.3	Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante ultrasonido de las cáscaras de la naranja por el método DPPH . . . . .	63
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>		<b>67</b>
<b>NOMENCLATURA</b>		<b>69</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>71</b>
<b>APÉNDICES</b>		<b>77</b>
A	DATOS EXPERIMENTALES . . . . .	77
B	RESULTADOS INTERMEDIOS . . . . .	80
C	MUESTRA DE CÁLCULO . . . . .	81
<b>ANEXOS</b>		<b>83</b>



# ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 2.1</b>	Sustituyentes de los principales flavonoides presentes en los frutos cítricos (Damián <i>et al.</i> , 2016). . . . .	9
<b>Cuadro 3.1</b>	Equipos necesarios para la extracción y caracterización de los principales flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja.	23
<b>Cuadro 3.2</b>	Materiales y reactivos necesarios para la extracción y caracterización de los principales flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja. . . . .	24
<b>Cuadro 3.3</b>	Condiciones de operación para las primeras extracciones preliminares vía ultrasonido de flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja de acuerdo a los datos de solubilidad de los flavonoides. . . . .	26
<b>Cuadro 3.4</b>	Disolventes utilizados para las pruebas de cromatografía de capa fina ascendente. . . . .	27
<b>Cuadro 3.5</b>	Disolventes utilizados para cromatografía de columna. . .	29
<b>Cuadro 3.6</b>	Condiciones de operación para las extracciones de polifenoles vía ultrasonido. . . . .	31
<b>Cuadro 4.1</b>	Diseño central compuesto con la cantidad total de compuestos fenólicos obtenidos mediante el método Folin-Ciocalteu como variable de respuesta para las extracciones realizadas a las cáscaras de la naranja. . . . .	40
<b>Cuadro 4.2</b>	Polifenoles totales obtenidos mediante el método de Folin-Ciocalteu para los puntos óptimos del diseño de experimentos. . .	49
<b>Cuadro 4.3</b>	Cuantificación de quercetina/quercitrina obtenida mediante resonancia magnética nuclear en 100.3440 gramos de cáscaras.	61
<b>Cuadro 4.4</b>	Capacidad antioxidante de los extractos para los puntos óptimos del diseño de experimentos mediante el método DPPH. . .	64
<b>Cuadro A.1</b>	Masa de cáscaras utilizadas y del extracto seco obtenido en la extracción de flavonoides vía ultrasonido para el diseño de experimentos. . . . .	77

<b>Cuadro A.2</b>	Masa de cáscaras utilizadas y del extracto seco obtenido en la extracción de flavonoides vía ultrasonido para las repeticiones del punto óptimo del diseño de experimentos. . . . .	77
<b>Cuadro A.3</b>	Volumen de la disolución y etanol 95% para las extracciones ultrasónicas de acuerdo a la concentración requerida. . . . .	78
<b>Cuadro A.4</b>	Volumen de la disolución y etanol 95% para las extracciones ultrasónicas del punto óptimo del diseño de experimentos. . . . .	78
<b>Cuadro A.5</b>	Masas de quinina utilizadas para la cuantificación de quercetina mediante resonancia magnética nuclear. . . . .	78
<b>Cuadro A.6</b>	Detalle del diseño de experimentos para la extracción de flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja. . . . .	79
<b>Cuadro B.1</b>	Polifenoles totales obtenidos mediante el método de Folin-Ciocalteu para las extracciones realizadas. . . . .	80
<b>Cuadro B.2</b>	Polifenoles totales obtenidos mediante el método de Folin-Ciocalteu para los puntos óptimos del diseño de experimentos. . . . .	80
<b>Cuadro B.3</b>	Capacidad antioxidante de los extractos para los puntos óptimos del diseño de experimentos mediante el método DPPH. . . . .	81
<b>Cuadro B.4</b>	Cuantificación de quercetina obtenida mediante resonancia magnética nuclear en 100.3440 gramos de cáscaras secas. . . . .	81

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b>	Exportación de concentrado, jugo de naranja y naranjas en Costa Rica para el período del 2000-2020 (Elaboración propia con datos de FAO, 2022). . . . .	6
<b>Figura 2.2</b>	Composición morfológica de la naranja (Tarazona, 2016) .	7
<b>Figura 2.3</b>	Estructura general de los flavonoides (Damián <i>et al.</i> , 2016)	8
<b>Figura 2.4</b>	Montaje del equipo para extracción Soxhlet (Franco, 2019).	11
<b>Figura 2.5</b>	Sistema de extracción con fluidos supercríticos (Esquivel y Vargas, 2007) . . . . .	12
<b>Figura 2.6</b>	Colapso de la burbuja de cavitación y liberación del contenido de interés presente en la planta del proceso mediante extracción con ultrasonido (González, 2021) . . . . .	13
<b>Figura 2.7</b>	Sistema de extracción utilizando microondas (Urango <i>et al.</i> , 2018) . . . . .	14
<b>Figura 2.8</b>	Espectro <sup>1</sup> H-RMN 400 MHz, en DMSO-d <sub>6</sub> del extraco TESMN1. Fuente: obtención propia. . . . .	16
<b>Figura 2.9</b>	Cromatogramas de flavonoides en gel de sílice y placas de gel sílice a 254 nm (Urška <i>et al.</i> , 2018) . . . . .	18
<b>Figura 2.10</b>	Reducción del radical DPPH en presencia de un antioxidante (Franco, 2019) . . . . .	19
<b>Figura 2.11</b>	Estructura de un diseño central compuesto con tres factores (Romo <i>et al.</i> , 2008) . . . . .	20
<b>Figura 3.1</b>	Apariencia de las cáscaras de naranja almacenadas para la extracción. . . . .	25
<b>Figura 3.2</b>	Cromatografía de columna realizada a las extracciones . .	28
<b>Figura 3.3</b>	Filtraciones por gravedad para los lavados previos realizados a las extracciones ultrasónicas. . . . .	32
<b>Figura 3.4</b>	Balones aforados para la cuantificación mediante resonancia magnética nuclear. . . . .	35



<b>Figura 3.5</b>	Viales preparados para la cuantificación de flavonoides presentes en los extractos mediante Folin-Ciocalteu. . . . .	36
<b>Figura 4.1</b>	Resumen del modelo diseño central compuesto para las extracciones de polifenoles en las cáscaras de la naranja. . . . .	42
<b>Figura 4.2</b>	Tabla del análisis de varianza para las extracciones de polifenoles en las cáscaras de la naranja. . . . .	43
<b>Figura 4.3</b>	Pareto de los efectos estandarizados para las extracciones de polifenoles en las cáscaras de la naranja. . . . .	44
<b>Figura 4.4</b>	Gráfica de residuos para la extracción asistida ultrasonido de polifenoles presentes en las cáscaras de la naranja. . . . .	44
<b>Figura 4.5</b>	Gráficas de superficies de respuesta para la cantidad total de polifenoles en extractos de cáscaras de la naranja. . . . .	46
<b>Figura 4.6</b>	Gráficas de contornos para la cantidad total de polifenoles en extractos de cáscaras de la naranja. . . . .	46
<b>Figura 4.7</b>	Gráfica de efectos principales para la cantidad total de polifenoles en extractos de cáscaras de naranja. . . . .	48
<b>Figura 4.8</b>	Predicción de las condiciones óptimas para la cantidad total de polifenoles en extractos de cáscaras de naranja. . . . .	48
<b>Figura 4.9</b>	Patrón de acoplamiento para el anillo aromático con tres sustituyentes . . . . .	51
<b>Figura 4.10</b>	Espectro 1H-RMN 400 MHz, en CDCl <sub>3</sub> del compuesto PLMN03-2 . . . . .	51
<b>Figura 4.11</b>	Ampliación del espectro 1H-RMN 400 MHz, en CDCl <sub>3</sub> del compuesto PLMN03-2 . . . . .	52
<b>Figura 4.12</b>	Fragmento del espectro HSQC de PLMN03-2 en CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz . . . . .	52
<b>Figura 4.13</b>	Cambios químicos del 13C del anillo aromático derivados del espectro HSQC en CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz . . . . .	53
<b>Figura 4.14</b>	Fragmento del espectro HMBC de PLMN03-2 en CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz . . . . .	53

<b>Figura 4.15</b>	Fragmento estructural típico de los flavonoides obtenido del espectro HMBC de PLMN03-2 en CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz . . . . .	54
<b>Figura 4.16</b>	Fragmento estructural obtenido del espectro HMBC de PLMN03-2 en CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz . . . . .	54
<b>Figura 4.17</b>	Sistema estructural característico de un flavonoide . . . . .	54
<b>Figura 4.18</b>	Flavonoide presente en el extracto PLMN03-2 . . . . .	55
<b>Figura 4.19</b>	Espectro 1H-RMN 400 MHz, en CDCl <sub>3</sub> del compuesto PLMN03-3 . . . . .	56
<b>Figura 4.20</b>	Ampliación del espectro 1H-RMN 400 MHz, en CDCl <sub>3</sub> del compuesto PLMN03-3 . . . . .	56
<b>Figura 4.21</b>	Fragmento del espectro H,H-COSY de PLMN03-3 en CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz . . . . .	57
<b>Figura 4.22</b>	Fragmento del espectro HSQC de PLMN03-3 en CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz . . . . .	57
<b>Figura 4.23</b>	Fragmento estructural típico de los flavonoides obtenido del espectro HMBC de PLMN03-3 en CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz . . . . .	58
<b>Figura 4.24</b>	Fragmento del espectro HMBC de PLMN03-3 en CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz . . . . .	58
<b>Figura 4.25</b>	Fragmento estructural obtenido del espectro HMBC de PLMN03-3 en CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz . . . . .	59
<b>Figura 4.26</b>	Flavonoide presente en el extracto PLMN03-3 . . . . .	59
<b>Figura 4.27</b>	Estructura química de la quinina. . . . .	60
<b>Figura 4.28</b>	Estructura química de la quercetina. . . . .	61
<b>Figura 4.29</b>	Fragmento del espectro 1H-RMN 400 MHz, en DMSO-d <sub>6</sub> del extracto SMN01. . . . .	62
<b>Figura 4.30</b>	Cromatograma de polifenoles en gel de sílice revelados bajo lámpara ultravioleta a 254 nm. . . . .	63
<b>Figura 5.1</b>	Sistema de extracción utilizado para la obtención de compuestos fenólicos de las cáscaras de la naranja vía ultrasonido. . . . .	83
<b>Figura 5.2</b>	Sistema de filtración para las extracciones ultrasónicas de compuestos polifenólicos. . . . .	83

<b>Figura 5.3</b>	Extractos concentrados de las cáscaras de naranja. . . . .	84
<b>Figura 5.4</b>	Viales con los extractos de las cáscaras de naranja con concentración conocida para las pruebas de Folin- Ciocalteu y DPPH.	84
<b>Figura 5.5</b>	Sistema de cromatografía capa fina ascendente en gel de sílice.	85
<b>Figura 5.6</b>	Cromatograma de polifenoles en gel de sílice revelados bajo lámpara ultravioleta a 254 nm. . . . .	85
<b>Figura 5.7</b>	Cromatograma de polifenoles revelado con vanilina. . . . .	86
<b>Figura 5.8</b>	Fragmento de los espectros $^1\text{H}$ -RMN de las extracciones realizadas para todo el diseño de experimentos en DMSO- $d_6$ , 400 MHz . . . . .	86
<b>Figura 5.9</b>	Fragmento de los espectros $^1\text{H}$ -RMN de las extracciones en las condiciones óptimas determinadas por el modelo estadístico en DMSO- $d_6$ , 400 MHz . . . . .	87
<b>Figura 5.10</b>	Fragmento del espectro $^1\text{H}$ -RMN 400 MHz, en DMSO- $d_6$ del extracto SMN01 para la segunda cuantificación. . . . .	88
<b>Figura 5.11</b>	Fragmento del espectro $^1\text{H}$ -RMN 400 MHz, en DMSO- $d_6$ del extracto SMN01 para la tercera cuantificación. . . . .	88



# INTRODUCCIÓN

Actualmente el manejo de los desechos sólidos desde que inicia su recolección hasta que se da la disposición final de los mismos, es un tema de importancia mundial debido al sostenido incremento de estos por parte de los procesos industriales, el acelerado aumento demográfico y la concentración poblacional en áreas urbanas, sumando a esto un modelo económico consumista por parte de los ciudadanos. Es por esto que resulta fundamental tratar de disminuir el impacto ambiental que se genera por el mal manejo de los desechos sólidos, enfocándose este proyecto específicamente en los residuos del sector industrial en el área de los cítricos específicamente en la naranja, ya que en el país hay sembradas aproximadamente 27 000 hectáreas, de las cuales el 90% de la producción se destina como fruta para el procesamiento industrial lo que genera un aproximado de 130 000 toneladas de desechos sólidos por año, mientras que solamente el 10% restante se comercializa como producto fresco en los distintos mercados a lo largo del país. Se estima que la producción mundial de naranjas frescas para el año 2005 según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) por sus siglas en inglés era de aproximadamente 59.9 millones de toneladas métricas (MAG, 2012).

En el país se originó la Ley para la Gestión Integral de Residuos (Ley No. 8839) donde se obliga a los distintos gobiernos locales a lo largo del país a velar por el manejo responsable de los residuos producidos en su localidad, en concordancia con las políticas y planes nacionales. En el país el incremento de la contaminación ambiental por parte de residuos sólidos se debe a que a pesar de que existe la Ley No. 8839, se presenta la ausencia de un modelo integral de desarrollo urbano que promueva una gestión integral para los residuos sólidos (Herrera *et al.*, 2016).

Por lo mencionado anteriormente, es que resulta importante dar el correspondiente manejo a los residuos sólidos para convertir dicha materia de desecho en productos con un alto valor agregado, beneficiando en este caso a los consumidores al ser productos extraídos naturalmente y a los productores industriales debido a que generan utilidades provenientes de sus desechos. En la actualidad, la mayoría de los desechos

sólidos orgánicos son utilizados como alimento para animales o abono, sin embargo, dichas prácticas no toman ventaja de la composición química que estos poseen. Tal es el caso del procesamiento de cítricos, ya que una vez que se extrae el jugo queda aproximadamente un 50% de la masa total del fruto como desecho (cáscara, semillas, bagazo) donde algunas de estas partes son ricas en flavonoides. Los flavonoides son sustancias que se han estudiado a lo largo de los años, los cuales poseen diversas características que los hacen de especial interés: la actividad farmacológica que provoca una disminución de la fragilidad capilar y previene la formación de varicosidades mejorando así la circulación periférica de las personas, también han sido utilizados para el tratamiento de enfermedades como la parodontosis, sumando a esto la demostrada capacidad que poseen los compuestos polifenólicos para secuestrar radicales libres, aportando así actividad antioxidante mayor que la que se puede producir in vitro de vitaminas E y C. Esta última característica hace que dichas sustancias sean capaces de prevenir la formación de placas de aterosclerosis, lo cual disminuye el riesgo de la arterioesclerosis e infarto del miocardio. Por último, otras propiedades no menos importantes de los flavonoides es la capacidad que poseen para modificar el sabor y color de distintos compuestos usados en los alimentos, mientras que en el área cosmética funcionan para disminuir la hiperpigmentación de la piel y poseen una actividad desodorante (Cartaya y Reynaldo, 2001).

Sobre esta misma línea y en cuanto a fines nutricionales, estudios han demostrado que las personas están dispuestas a aceptar alimentos ricos en flavonoides debido a los múltiples beneficios que presentan. Se estima que una persona adulta en Europa gasta aproximadamente 454.7 euros anuales en flavonoides presentes en fármacos cardiovasculares, sin embargo, los mismos han sido cuestionados a lo largo de los años por posibles efectos adversos sobre la salud de quienes los consumen de manera frecuente (Damián *et al.*, 2016).

En dicho proyecto el aporte que puede generar un ingeniero químico es bastante robusto, debido a que en la actualidad se estudian distintos métodos para la extracción y purificación de flavonoides a partir de frutos cítricos, donde el profesional en esta rama domina dichas operaciones unitarias, además es capaz de determinar las

condiciones óptimas de operación que maximicen la extracción, así como también el identificar la viabilidad económica para producir a escala piloto e industrial y por último, el ya mencionado con anterioridad, un adecuado uso y manejo de los desechos sólidos son áreas de potencial desarrollo para un profesional en ingeniería química.

Los objetivos del presente proyecto se detallan a continuación:

### **1.1 Objetivo general**

Evaluar las condiciones de extracción de flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja (*Citrus sinensis*) mediante la caracterización con RMN para su uso como antioxidantes.

### **1.2 Objetivos específicos**

1. Obtener los principales flavonoides de las cáscaras de la naranja mediante una extracción sólido-líquido ultrasónica.
2. Caracterizar los flavonoides extraídos de las cáscaras de la naranja mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cromatografía de Capa Fina (CCF).
3. Determinar la capacidad antioxidante de los flavonoides extraídos.





# FUNDAMENTO TEÓRICO

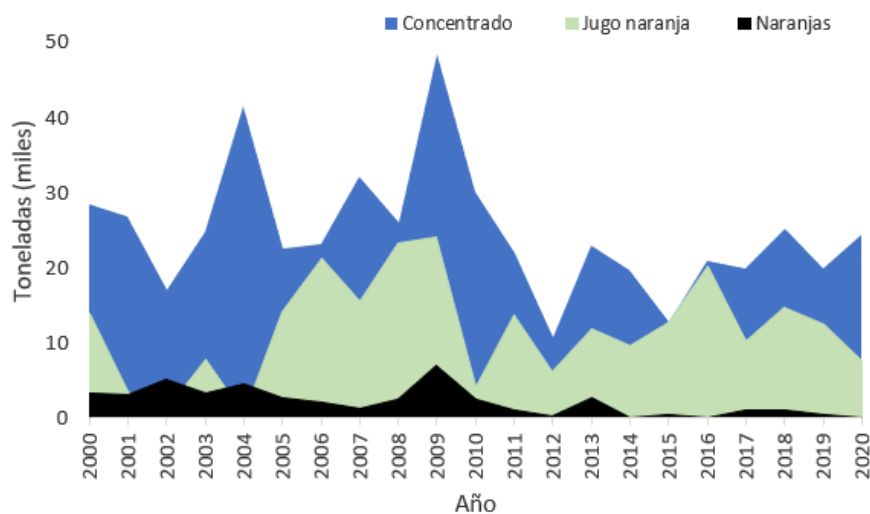
## 2.1 Cultivo de naranja:

La naranja es la fruta con mayor producción y consumo per cápita a nivel mundial, donde de las distintas variedades de naranjas dulces la *Citrus sinensis* es la más importante a nivel comercial (Toledo, 2009). En Costa Rica las zonas donde se concentran la mayoría de sembradíos de cítricos son en la zona norte que comprende San Carlos, Los Chiles y Upala, y la zona de La Cruz Guanacaste, estas dos zonas representan el 75% del área total sembrada, mientras que el restante 25% se distribuye entre la zona Central Sur, Central Occidente y Central Oriental. Este porcentaje está relacionado con la presencia de dos grandes industrias en dichas zonas del país que utilizan los cítricos como materia prima, tal es el caso de Ticofrut y Del Oro (MAG, 2012).

El sistema agrícola convencional productivista conocido comúnmente como modelo agrícola industrial, es aquel que se caracteriza por preferir los monocultivos y la producción a gran escala utilizando bastante tecnología y gran uso de capital con el fin de orientarse en el mercado nacional y global gracias a la liberalización del comercio agrícola y las políticas de seguridad alimentaria basadas en el comercio internacional. En el país, el mismo tuvo una expansión a partir de los años setenta del siglo XX gracias al financiamiento del proyecto denominado Corena 032, el cual pretendía darle una cobertura al suelo nacional con especies frutales, el mayor éxito de dicho proyecto se vio reflejado hasta el año 1985 cuando los precios del café cayeron abruptamente y se desestimuló la producción del mismo en América Central (Arias *et al.*, 2018).

En este mismo período de tiempo se presentó un crecimiento en la producción de naranjas en el país debido a que el consumo de productos cítricos aumento por la gran divulgación de sus propiedades beneficiosas para la salud. Aprovechándose de este incremento llegaron al país distintas compañías como la fabricante de jugo Del Oro (de capital inglés) y Ticofrut, donde entre estas dos organizaciones han abarcado el 70% de la producción nacional.

A pesar de que el cultivo de naranja dulce *Citrus sinensis* se encuentra en consolidación en Costa Rica, el mismo se ha convertido en una actividad de gran importancia socioeconómica gracias a la gran cantidad de empleos que genera para las personas de las localidades aledañas a las plantas extractoras de jugo, debido a que ha alcanzado un rápido desarrollo para la comercialización principalmente de concentrado, como se puede observar en la Figura 2.1 (Araya, 2001).



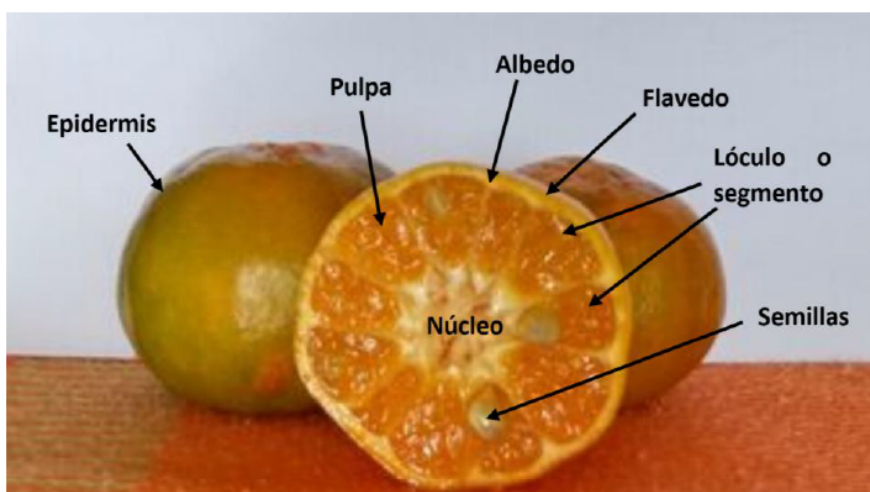
**Figura 2.1.** Exportación de concentrado, jugo de naranja y naranjas en Costa Rica para el período del 2000-2020 (Elaboración propia con datos de FAO, 2022).

## 2.2 Características morfológicas de la naranja:

El naranjo es un árbol que generalmente oscila entre los (6 a 10) m de altura, del cuál se obtiene la naranja dulce. El tronco de dicho árbol es relativamente corto con algunas espinas presentes en el mismo y ramas poco robustas, las hojas poseen una forma elíptica mientras que las flores son de una tonalidad blanca con varios pétalos (comúnmente cinco) donde aquellos árboles con brotes de flores son los que mejores frutos brindan (Acebedo, 2018).

Por su parte la naranja se compone principalmente de tres partes las cuales son el exocarpo, epicarpio o flavedo que corresponde a la parte más externa de la fruta, la cual puede ser de color verde o amarillo-naranja. Esta sección funciona como

epidermis protegiendo el fruto del exterior, además contiene vesículas con aceites esenciales donde se destacan el limoneno, beta-pineno, citronelal, entre otros. En segundo lugar está el mesocarpo o albedo en la parte interior de la fruta, la cual envuelve al endocarpio y tiene una textura pomposa de color blanco, esta, en conjunto con el flavedo, forma lo que comúnmente se conoce como cáscara del fruto. Por último se encuentra el endocarpio que corresponde a la parte comestible del fruto la cual se encuentra dividida por lo general en once gajos carnosos, acá es donde se encuentran las semillas tal y como se observa en la Figura 2.2 (Tarazona, 2016)



**Figura 2.2.** Composición morfológica de la naranja (Tarazona, 2016)

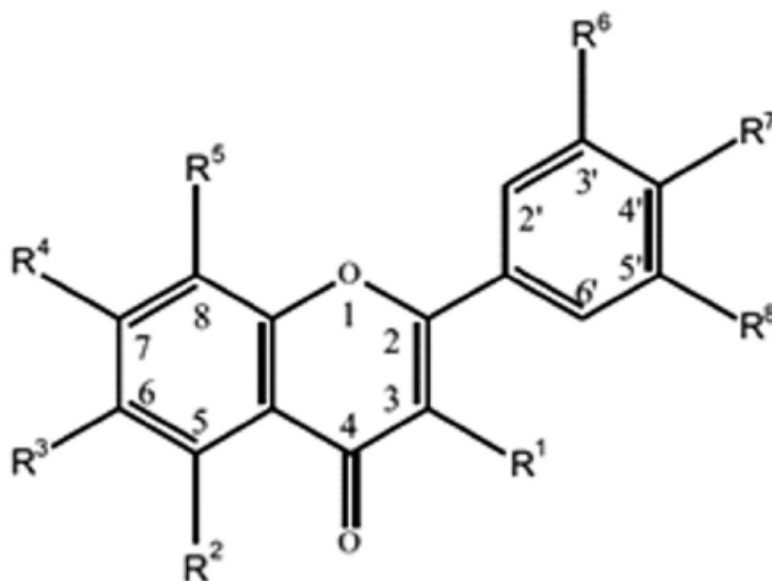
Algunas características específicas de la naranja *Citrus sinensis* son las siguientes: es de suave corteza, cuando el fruto se encuentra maduro su color externo es naranja, posee una pulpa jugosa de sabor dulce y presenta semillas blancas pequeñas y arrugadas (Tarazona, 2016).

### 2.3 Sustancias de interés en frutos cítricos:

Una de las sustancias de mayor interés presentes en los frutos cítricos son los flavonoides, estos son un grupo muy amplio de compuestos químicos pertenecientes a los polifenoles donde su estructura se caracteriza por ser benceno- $\gamma$ -pirano (Cartaya y Reynaldo, 2001).

Son buenos para el desarrollo y funcionamiento idóneo de las plantas ya que atraen animales en la oviposición, son agentes protectores contra la luz UV, entre otras. Además de presentar propiedades relacionadas a la salud humana como antialergénicos, antiinflamatorios, antimicrobiano, antioxidante, anti trombótico, cardio protectores y vasodilatadores (Kumar *et al.*, 2021).

La mayoría de los flavonoides están constituidos por tres anillos, donde dos de ellos son aromáticos conectados entre sí por un tercer anillo de pirano. Dichos compuestos cuentan con la presencia característica de varios grupos hidroxilo en alguna de las posiciones R\* que se muestran en la Figura 2.3 (Damián *et al.*, 2016). Sin embargo, la estructura base de los flavonoides puede sufrir de muchas modificaciones o adiciones de grupos funcionales por lo que se consideran que son una familia muy diversa, sin dejar de lado que todos estos se engloban dentro de sustancias polifenólicas (Herrera, 2011).



**Figura 2.3.** Estructura general de los flavonoides (Damián *et al.*, 2016)

Ahora bien, una vez que el jugo es extraído de la fruta en las industrias procesadoras, se genera como desecho aproximadamente un 50% del peso total de la misma encontrando en este porcentaje al exocarpo y mesocarpo junto con las semillas y la pulpa. Dichos residuos son ricos en limoneno y sustancias con un valor agregado im-

portante como por ejemplo: agua, pectina, azúcares solubles, alcoholes, biosolventes y los flavonoides, lo que hace que dicha sustancia sea una fuente con alto interés de explotación (Belleste *et al.*, 2018).

Los flavonoides que han logrado ser extraídos de algunos cítricos han mostrado características importantes como lo son poseer la capacidad para inhibir el crecimiento celular de un conjunto amplio de microorganismos infecciosos, lo que los cataloga como posibles agentes antivirales, antifúngicos, antibacteriales y excelentes antioxidantes. Gracias a la diversidad de actividades biológicas, como se mencionó previamente, es que los flavonoides son sustancias con una aplicación amplia en industria farmacéutica, cosmética, alimentaria y agrícola. Los principales flavonoides que se pueden encontrar son: hesperetina, hesperidina, luteolina, naringenina, narirutina, neoesperidina, nobiletina y tangeretina, los cuales se encuentran en el Cuadro 2.1 indicando los grupos sustituyentes que se presentan en la estructura general presentada en la Figura 2.3 (Damián *et al.*, 2016).

**Cuadro 2.1.** Sustituyentes de los principales flavonoides presentes en los frutos cítricos (Damián *et al.*, 2016).

	$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^4$	$R^5$	$R^6$	$R^7$	$R^8$
<b>Flavononas</b>								
Hesperidina	H	OH	H	O-rt	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Naringin	H	OH	H	O-nh	H	H	OH	H
Neoesperidina	H	OH	H	O-nh	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Narirutina	H	OH	H	O-rt	H	H	OH	H
<b>Flavonas</b>								
Hesperetina	H	OH	H	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Naringenina	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H
<b>Flavonas aglicoladas</b>								
Luteolina	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H
<b>Polimetoxi flavonas</b>								
Nobiletina	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
Tangeretina	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H

Dónde: rt:rutinasa, nh:neoesperidosa

## 2.4 Métodos de extracción:

Para la obtención de los flavonoides presentes en las cáscaras de los frutos cítricos se realiza una extracción sólido-líquido, conocida también como lixiviación. Dicha operación unitaria consiste en eliminar un soluto sólido de una matriz sólida con ayuda de un solvente donde se disuelva el soluto de interés (Wankat, 2008).

Existen algunos factores que afectan la velocidad y rendimiento de la extracción sólido-líquido, dentro de los cuales se encuentran los siguientes (Ullauri, 2010):

**Tamaño de las partículas:** Cuando los sólidos poseen un tamaño pequeño, el área interfacial de contacto sólido-líquido, es mayor ya que la distancia de difusión del soluto en el interior del sólido es más pequeña por lo que se da una alta transferencia de masa.

**Solvente:** El solvente líquido utilizado debe ser selectivo, con una viscosidad baja, efectivo, no tóxico y económico para generar con ello mayores rendimientos a bajo costo. Es importante mencionar que en la extracción con solventes no se destruye las sustancias, simplemente se separan concentrándose en su seno para posteriormente concentrarlas y eventualmente separarlas con alguna otra técnica experimental.

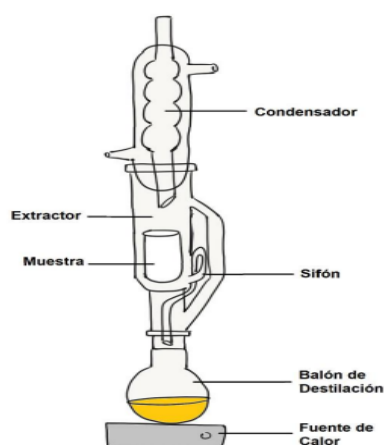
**Temperatura:** Un aumento en la temperatura influye de manera positiva en la solubilidad del sólido en el líquido, incrementando así la velocidad de extracción, sin embargo para extracciones de solutos orgánicos se debe tener cuidado de que un aumento en esta no genere una modificación en la estructura molecular del sólido.

**Agitación:** Una agitación constante en el solvente incrementa la difusión de la masa en el líquido, aumentado así la transferencia de masa, además se evita la sedimentación en caso de tener partículas finas.

En el caso de los polifenoles los métodos más utilizados de extracción son Soxhlet, asistido microondas, asistido ultrasonido y asistido super crítico (Tarazona, 2016), los cuales se detallan a continuación.

### 2.4.1 Soxhlet:

Es de las técnicas más convencionales empleando solventes de mediana y baja polaridad para lograr extraer de una manera adecuada los polifenoles. Su funcionamiento permite agotar en una gran parte la muestra que se está extrayendo, dejando así libre de analitos a la biomasa final; esto sucede gracias al reflujo constante de solvente dentro del equipo. Dicho proceso de extracción sólido-líquido es semi continuo en el que el funcionamiento del mismo consiste en que el solvente cae continuamente en forma de gotas sobre un papel filtro que contiene la muestra sólida a la que se le desean extraer las sustancias de interés, las cuales se irán solubilizando lentamente en el solvente tal y como se muestra en la Figura 2.4 (Franco, 2019).



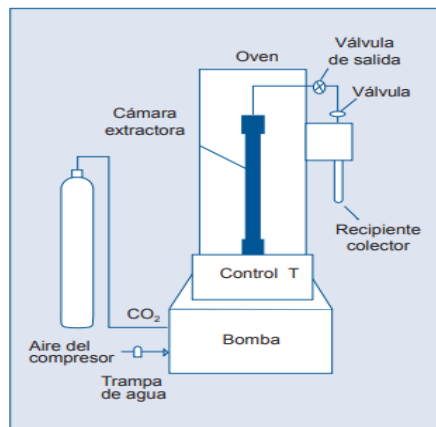
**Figura 2.4.** Montaje del equipo para extracción Soxhlet (Franco, 2019).

Dentro de las ventajas de dicho método destacan que no se requiere de una filtración posterior, la instrumentación es sencilla, es de fácil montaje y manipulación y se favorece la solubilidad del analito gracias al constante contacto entre solvente fresco y la matriz sólida. Mientras que las desventajas que posee son los largos tiempos de extracción y una posible descomposición térmica de los compuestos objetivos ya que la extracción ocurre cerca del punto de ebullición del solvente por un largo período de tiempo (Franco, 2019).

### 2.4.2 Asistido supercrítico:

Un fluido supercrítico es una sustancia que ha sido llevada a condiciones de presión y temperatura superiores a su temperatura y presión crítica. El proceso de extracción utilizando estos tipos de fluidos ocurre usualmente poniendo en contacto un lecho fijo de sólido que contiene la sustancia de interés a extraer con un flujo vertical de disolvente en estado supercrítico. Acá el solvente es saturado gradualmente con el soluto extraído donde de esta manera se presenta la transferencia de masa de la fase sólida hacia la fase fluida.

La extracción del soluto se compone de varias etapas: transporte del fluido supercrítico a la superficie externa de la matriz sólida ubicada en la cámara extractora, penetración y difusión del fluido en la matriz sólida ubicada en dicha cámara, solubilización del soluto, transporte del soluto a través de la matriz sólida y por último el transporte del soluto de la superficie externa del sólido a la solución con el solvente para ser recolectada en un recipiente tal y como se muestra en la Figura 2.5 (Toledo, 2009).



**Figura 2.5.** Sistema de extracción con fluidos supercríticos (Esquivel y Vargas, 2007)

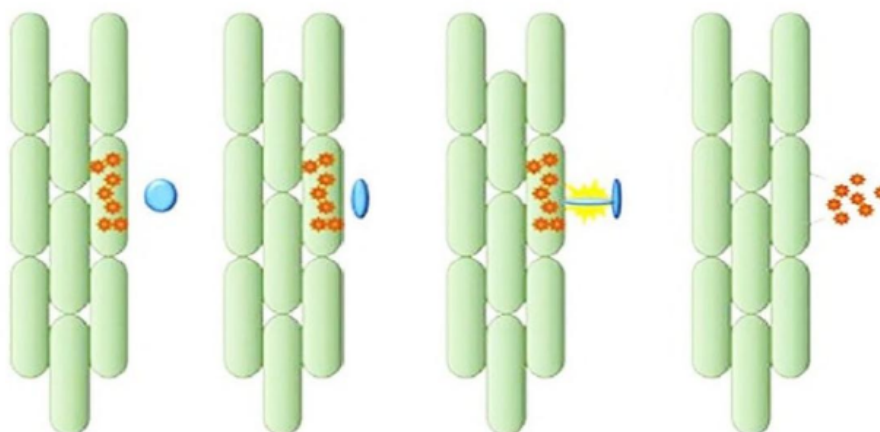
Dentro de las ventajas que posee dicho método se pueden mencionar la disminución de los tiempos de extracción en el laboratorio ya que su coeficiente de difusión es más alto lo que permite una penetración más fácil y rápida a la muestra y su menor viscosidad le permite un desplazamiento más rápido del soluto extraído, el disolvente es fácil de remover, donde el más comúnmente utilizado es el dióxido de carbono que



se encuentra disponible para ser usado, no es tóxico y es económico, mientras, que la principal desventaja es la alta inversión inicial que se debe de realizar (Ramsey, 2012).

### 2.4.3 Asistido ultrasonido:

El funcionamiento de dicho método de extracción consiste en emitir vibraciones mecánicas en frecuencias superiores al rango audible para el oído humano (1 a 16) kHz. Dichas frecuencias son aplicadas en un medio líquido donde se generan ciclos de expansión que forman presiones negativas junto a burbujas que crecen y colapsan dando origen al fenómeno conocido como cavitación. El paso importante en dicha extracción radica en los acontecimientos que ocurren cuando la burbuja formada colapsa en algún momento debido a que no puede absorber la energía del ultrasonido eficientemente, lo que genera una rápida compresión de los gases, que en consecuencia provoca un aumento de temperatura y presión, lo que genera altos impactos en las superficies sólidas del material vegetal, incrementando así la penetración del solvente en la superficie del mismo y la liberación de los productos intracelulares por roturas en las paredes de la célula tal como se muestra en la Figura 2.6.



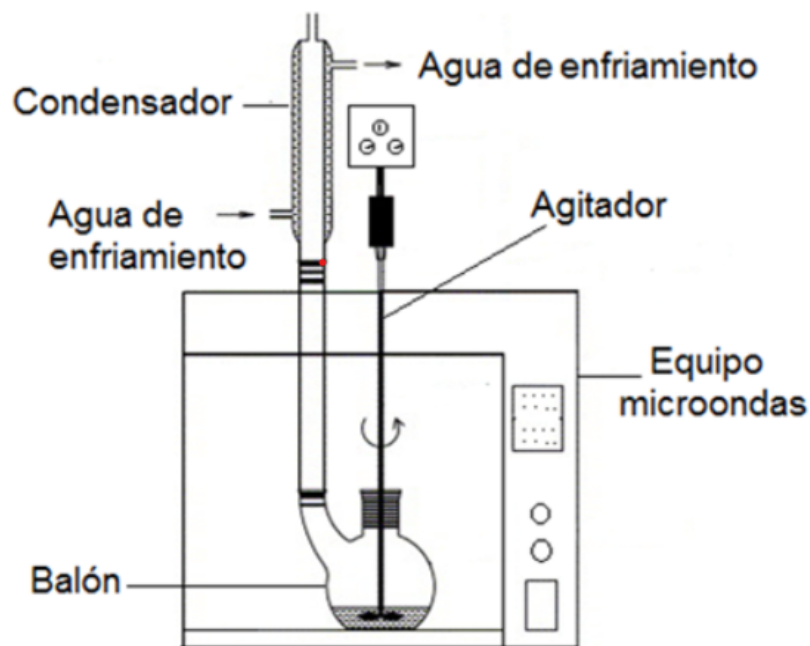
**Figura 2.6.** Colapso de la burbuja de cavitación y liberación del contenido de interés presente en la planta del proceso mediante extracción con ultrasonido (González, 2021)

Dentro de las ventajas que posee dicho método es que es altamente reproducible, los tiempos de extracción son cortos, se requiere poco disolvente, un consumo bajo

de energía y es fácil de manipular el equipo necesario, mientras que las desventajas asociadas son una filtración necesaria posterior a la extracción y el costo inicial del equipo puede ser elevado (Londoño, 2010).

#### 2.4.4 Asistido microondas:

El funcionamiento de la extracción asistida por microondas consiste en la provocación en la rotación molecular y en la movilidad iónica sin afectar la muestra con ayuda de ondas electromagnéticas de bastante alta energía, otro posible escenario es que dicha energía sea absorbida solamente por la matriz lo que ocasiona un calentamiento de la muestra y la posterior liberación de solutos de interés en el solvente frío. El sistema utilizado para dicho tipo de extracción es el que se presenta en la Figura 2.7



**Figura 2.7.** Sistema de extracción utilizando microondas (Urango *et al.*, 2018)

Dentro de las ventajas que dicho método posee se encuentra un bajo consumo de disolvente y energía, los tiempos de extracción son relativamente cortos y se logran altas presiones y temperaturas de trabajo, mientras que las desventajas principales

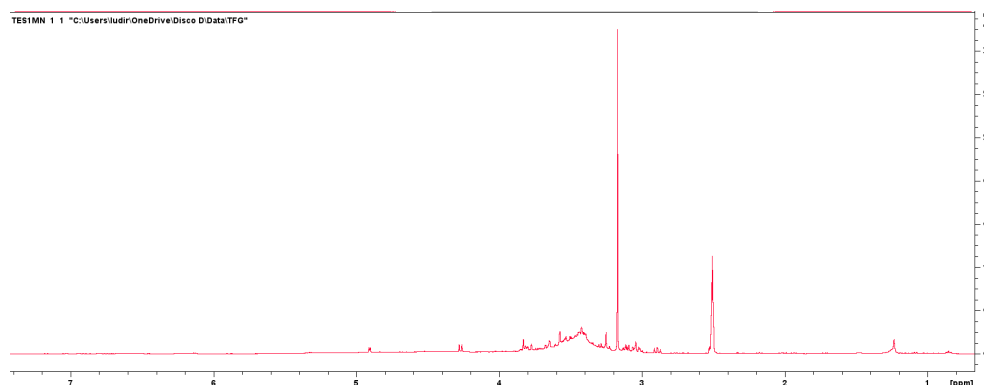
son el costo del equipo y que se requiere de una filtración posterior a la extracción (Tarazona, 2016).

## **2.5 Identificación y caracterización de flavonoides:**

Una vez extraídos los flavonoides, deben ser caracterizados con el fin de determinar su estructura química, pureza y cantidad. Dos de los métodos más utilizados para tal fin son la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Cromatografía de Capa Fina (CCF).

### **2.5.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN):**

Este tipo de espectroscopia es un método analítico bastante conocido y veraz para lograr observar la estructura de moléculas pequeñas y macromoléculas. Dicha técnica utiliza la aplicación de fuertes campos magnéticos y pulsos de radio frecuencia a los núcleos de los átomos. En este caso la absorción de energía de la radiofrecuencia permite que los núcleos pasen de los estados de espín de baja energía a estados de mayor energía, donde se detecta la emisión de radiación durante el proceso de relajación posterior. En dichos espectros el desplazamiento químico y las constantes de acoplamiento brindan información sobre la estructura molecular. Con ayuda de la RMN se puede identificar cualquier tipo de analito siempre y cuando este contenga protones o carbonos tal y como se presenta en la Figura 2.8 , además la integral de los valores en cada señal indican el número de protones y carbonos presentes en la molécula (Jayaprakasha y Patil, 2014).



**Figura 2.8.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN 400 MHz, en  $\text{DMSO-d}_6$  del extracto TESMN1. Fuente: obtención propia.

Por tanto la resonancia magnética nuclear es muy utilizada cuando se quiere conocer la estructura química de algún compuesto polifenólico, caso específico de este proyecto. Como se indicó anteriormente el principio de funcionamiento de dicha metodología se basa en núcleos magnéticamente activos, es decir aquellos que poseen espín, los cuales al ser cargas positivas en rotación generan un campo magnético. En ausencia de un campo magnético externo, los espines nucleares están orientados de manera aleatoria, sin embargo, al aplicar un campo magnético externo, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo en el estado denominado  $\alpha$  de menor energía, mientras que los núcleos con espín negativo se posicionan en la dirección contraria en el campo  $\beta$  (Pavia *et al.*, 2001)

Es habitual que existan más núcleos en el estado  $\alpha$  de menor energía. Es en este punto donde la muestra que está sometida al campo magnético también es irradiada por un pulso breve e intenso, que ocasiona un cambio de espín. En el proceso denominado relajación los núcleos emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia energética entre los estados espín para liberar la energía absorbida. Donde finalmente se obtiene una gráfica de frecuencias frente a intensidad conocido como espectro RMN, el cual varía dependiente del átomo que se esté analizando, los más comunes son el espectro protónico denominado  $^1\text{H}$ -RMN y el del carbono  $^{13}\text{C}$ -RMN, los cuáles miden hidrógenos y carbonos respectivamente (Pavia *et al.*, 2001).

Existen además experimentos particulares que permiten obtener espectros de dos dimensiones, lo que permite observar las conectividades homonucleares o heteronu-

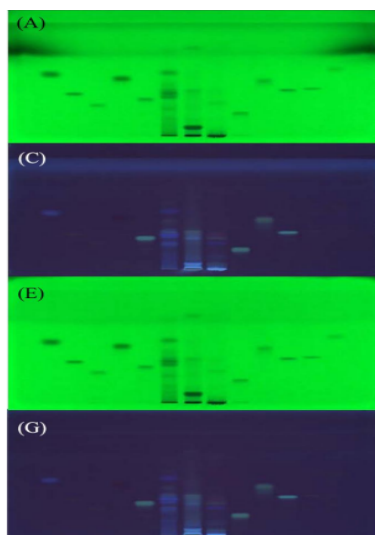
cleares presentes en el mismo. En el caso de los heteronucleares permiten seguir la secuencia de enlaces en compuestos orgánicos, el más utilizado es el que brinda los acoplamientos hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) con carbono ( $^{13}\text{C}$ ) a un enlace de distancia, es de acá donde se origina el experimento de espectroscopía de correlación heteronuclear de un único cuanto identificado como HSQC por sus siglas en inglés. Por otro lado también existe la espectroscopía de correlación heteronuclear de múltiples enlaces denominada HMBC por sus siglas en inglés, la cual permite observar interacciones de hasta tres enlaces o más (Pavia *et al.*, 2001).

### 2.5.2 Cromatografía Capa Fina (CCF):

Para el aislamiento de flavonoides presentes en extractos cítricos se utiliza la cromatografía capa fina la cual es una técnica cromatográfica de separación unidimensional ascendente sobre una capa fina de gel sílice como la fase estacionaria y donde uno de los eluyentes más utilizados es una mezcla de butanol, ácido acético y agua destilada conocida como BAW. La muestra final se visualiza en una cámara de luz ultravioleta con una longitud de onda de 254 nm, logrando así visualizar si los compuestos (que absorben en esa región del UV) han sido separados. Una de las principales ventajas que posee la utilización de cromatografía de capa fina es que es una técnica bastante económica en comparación a otras técnicas de caracterización como por ejemplo cromatografía líquida de alta definición (HPLC) o bien, la misma resonancia magnética nuclear (Tenorio, 2016).

Dicha técnica es una de las más antiguas pero que continua utilizándose para el estudio de polifenoles presentes en extractos naturales o trabajos de fraccionamiento debido a que es rápido, versátil y simple. Otras de las ventajas sumadas a las anteriores es que se pueden ejecutar varias muestras al mismo tiempo, los tiempos de separación de las sustancias de interés son breves y también funciona de buena manera como análisis previo a una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) por lo económicas y rápido que se ejecutan. Los flavonoides se revelan bajo lámparas UV de colores oscuros (negros), amarillo, verde o azul dependiendo de la estructura química, más específicamente, de la conjugación de los

dobles enlaces presentes en la estructura del mismo ya que esto es lo que genera la longitud de onda que va a ser reflejada por el compuesto, estos colores se muestran en la Figura 2.9 (Andersen y Markham, 2006).

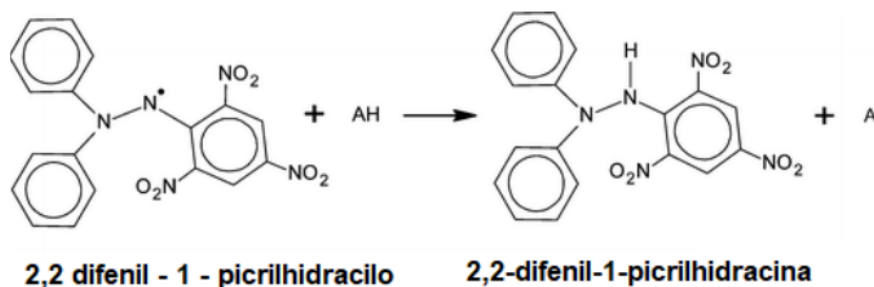


**Figura 2.9.** Cromatogramas de flavonoides en gel de sílice y placas de gel sílice a 254 nm (Urška *et al.*, 2018)

## 2.6 Capacidad antioxidante y cantidad total de polifenoles:

Los compuestos antioxidantes son aquellos que tienen la capacidad de inhibir la oxidación de moléculas y que por consiguiente actúan como protectores de las moléculas biológicas contra especies reactivas de oxígeno o radicales libres, los polifenoles son un ejemplo de este tipo de moléculas.

Para evaluar la actividad antioxidante de los flavonoides se suelen utilizar métodos *in vivo* o *in vitro*, dónde una de las más utilizadas son estas últimas por ser sencillas, rápidas y económicas. Por lo general dichas metodologías se basan en la transferencia de electrones usando como sustratos radicales cromóforos sintéticos, donde el más utilizado es el 2,2 difenil-1-picrihidracilo conocido comúnmente como la prueba antioxidante DPPH. Dicha prueba se basa en la decoloración del radical DPPH de un violeta a amarillo debido a la reducción por parte de la sustancia antioxidante que se está analizando y la transferencia de electrones como se puede observar en la Figura 2.10 (Franco, 2019).



**Figura 2.10.** Reducción del radical DPPH en presencia de un antioxidante (Franco, 2019)

Diversos estudios cinéticos han mostrado que la reacción que ocurre en el método con DPPH es de pseudo primer orden que puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia en función del tiempo. Esta medición se puede percibir al observar una primera fase de manera muy rápida seguida de una reacción más lenta que se atribuye al proceso de dimerización de los productos de reacción. Los resultados experimentales de dicha prueba se expresan como el valor de la concentración inhibitoria máxima media ( $IC_{50}$ ) reportada como mg extracto/L. La concentración inhibitoria máxima media es aquella que produce una inhibición del 50% del radical libre DPPH (Salazar, 2019).

La deslocalización del electrón desapareado en la estructura del radical DPPH intensifica el color violeta característico de este, el cual absorbe en metanol utilizando una longitud de onda de 517 nm. En el momento en que la solución de DPPH reacciona con una sustancia que done un átomo de hidrógeno el color violeta intenso se irá desvaneciendo, este cambio de coloración es monitoreado espectrofotométricamente hasta alcanzar un estado estacionario y completar la reacción redox, para finalmente determinar así las propiedades antioxidantes (Tovar, 2013).

En cuánto a la cantidad total de polifenoles presentes en las cáscaras de la naranja, se utiliza el método de Folin-Ciocalteu ya que es un método sencillo, su procedimiento se encuentra estandarizado y por la disponibilidad de los reactivos.

El reactivo de Folin-Ciocalteu utiliza un mecanismo de reacción oxidación/reducción, dónde dicho ensayo mide la capacidad para reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotungstico a un complejo azul el cual es monitoreado espectrofotométrica-

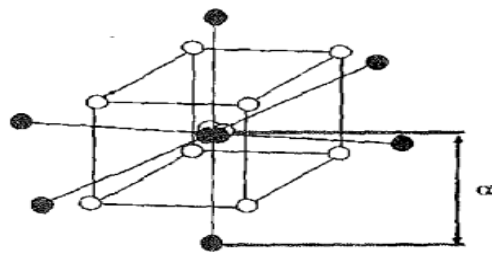
mente a una longitud de onda de 750 nm, este complejo azul formado tiene su máxima absorción dependiendo de la composición fenólica presente en el extracto, dónde, los resultados obtenidos se expresan como miligramos GAE/g muestra (Tovar, 2013).

## 2.7 Diseño de experimentos: Metodología Superficie de Respuesta (MSR)

La metodología de superficie de respuesta es la herramienta de estrategia y análisis que permite solucionar el problema de obtener las condiciones de operación óptimas de un proceso determinado (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

La principal ventaja de dicha metodología como herramienta en el diseño, desarrollo y formulación es que con una mínima cantidad de ensayos se puede cubrir el máximo de interacciones de los componentes para determinar los valores óptimos de un producto de interés (Rodríguez *et al.*, 2011).

Otras de las propiedades que dicha metodología debe satisfacer son las de poder estimar los coeficientes de un modelo cuadrático, poseer un número pequeño de experimentos y la factibilidad de construir diseños secuenciales. Es acá donde el diseño central compuesto (DCC) juega un papel fundamental debido a que se construye a partir de diseños factoriales  $2^k$  que permiten la estimación de efectos e interacciones, además de incluir a un conjunto de puntos en los ejes denominados puntos estrella que son los que permiten estimar los puntos cuadráticos puros tal como se muestra en la Figura 2.11 (Romo *et al.*, 2008).



**Figura 2.11.** Estructura de un diseño central compuesto con tres factores (Romo *et al.*, 2008)



Ante dicha situación, lo que queda por decidir es la distancia que existe entre el origen y la intersección con el eje denotada como  $\alpha$  en la Figura 2.11 donde la misma se calcula con el número de puntos utilizados ( $N$ ) en el diseño como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\alpha = (N)^{1/4} \quad (1)$$



## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El objetivo general de este trabajo es evaluar las condiciones de extracción de los flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja *Citrus sinensis* mediante la caracterización con RMN para su uso como antioxidantes. Para llevar esto a cabo se realizó una extracción sólido-líquido ultrasónica de las cáscaras de la naranja que se recolectaron de un mismo punto de venta. Como parte de la evaluación de las condiciones de extracción se realizó un diseño de experimentos de metodología de superficie de respuesta (MSR) utilizando un diseño específico conocido como central compuesto (DCC) analizado por medio del software estadístico MINITAB.

La parte experimental se realizó en la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica, en el laboratorio de investigación 232 del director del proyecto PhD. Renato Murillo Masis. Los equipos y reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto de graduación fueron proporcionados por este laboratorio, los mismos se encuentran en los Cuadros 3.1 y 3.2

**Cuadro 3.1.** Equipos necesarios para la extracción y caracterización de los principales flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja.

Equipo o material	Modelo	Rango de trabajo	Unidad
Baño ultrasónico	BRANSON 5510	42	kHz
Procesador de alimentos	Oster	N/A	N/A
Plantilla	IKA CMAG	0 a 500	°C
Lámpara ultravioleta	UVGL-58	254 a 366	nm
Balanza analítica	Adventurer OHAUS	0 a 300	g
Rotavapor	BUCHI R-210	N/A	N/A
Equipo RMN	Bruker Ascend	400	MHz
Espectofotómetro	Labomed	190 a 1100	nm
Estufa	Memmert	30 a 200	°C
Refrigeradora	Frigidaire	N/A	N/A

**Cuadro 3.2.** Materiales y reactivos necesarios para la extracción y caracterización de los principales flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja.

<b>Reactivo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Grado</b>
Etanol	Universidad Costa Rica	N/A
Éter etílico	Merck	Analítico
Diclorometano	Fisher	Analítico
Metanol	Merck	Analítico
Ácido acético	Fermont	Analítico
Vanilina	Sigma-Aldrich	Analítico
Dimetilsulfóxido deuterado	Sigma-Aldrich	Analítico
Cloroformo deuterado	Sigma-Aldrich	Analítico
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Laboratorio BioDess	N/A
2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo	Laboratorio BioDess	N/A
Placas gel sílice	Merck	Analítico
Papel filtro	Whatman	Analítico
Parafilm	Bemis	N/A
Sílica gel 60	Merck	Analítico
Quinina	Sigma Aldrich	Analítico

### 3.1 Recolección y pretratamiento del material vegetal

Para la extracción de las sustancias de interés presentes en las cáscaras de la naranja primeramente se obtuvieron las naranjas enteras como fruta de un mismo punto de venta, aproximadamente 80 unidades.

Posterior a ello se lavaron con abundante agua y se limpiaron con toallas sin pelusa para eliminar la mayor cantidad de partículas de polvo o cualquier otro contaminante presente en la parte externa de la fruta. Una vez realizado esto se retiró la cáscara de las mismas con un cuchillo para seguidamente con ayuda de un mortero o procesadora de alimentos disminuir el tamaño de estas hasta obtener un tamaño de partículas de aproximadamente 1 cm tal y como se muestra en la Figura 3.1, ya que de acuerdo con Damián *et al.* (2016) se facilita la extracción de los componentes promoviendo el transporte del extracto de la matriz sólida al disolvente.



**Figura 3.1.** Apariencia de las cáscaras de naranja almacenadas para la extracción.

Finalmente se almacenaron las cáscaras morterizadas en el refrigerador en una bolsa con cierre hermético para conservarlas hasta el momento en que se realizó la extracción asistida por ultrasonido.

### **3.2 Análisis preliminares para la extracción asistida ultrasonido**

Antes de iniciar con las corridas experimentales del diseño estadístico propuesto se realizaron varias extracciones ultrasónicas previas para identificar, con ayuda de los espectros  $^1\text{H-RMN}$ ,  $^{13}\text{C-RMN}$  y espectroscopía ultravioleta-visible, la presencia de las sustancias de interés en la materia prima utilizada. Se seleccionó dicho método de extracción ya que según Kumar *et al.* (2021) es un método que posee ventajas sobre los demás como bajo tiempo de extracción, poco requerimiento energético y la calidad de retención del extracto.

Las extracciones que se realizaron primeramente con la materia prima morterizada fueron utilizando las condiciones de operación que se muestran en el Cuadro 3.3 a temperatura ambiente.

**Cuadro 3.3.** Condiciones de operación para las primeras extracciones preliminares vía ultrasonido de flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja de acuerdo a los datos de solubilidad de los flavonoides.

<b>Condición</b>	<b>Magnitud</b>
Disolvente	Etanol 95%
Tiempo	1 h
Masa cáscaras	40.040 g
Volumen disolvente	80 mL
Ratio solvente/sólido	2 mL/g

Finalizada la extracción ultrasónica con las condiciones de operación mostradas en el Cuadro 3.3, se filtró por gravedad con ayuda de un papel filtro analítico Whatman 50, se recogió en un balón de 500 mL para posteriormente concentrar el extracto obtenido con ayuda de un rotavapor Buchi R-210 controlando la caída de presión dentro del equipo para evitar una ebullición agresiva. Una vez que el extracto estaba completamente seco, se redisolvió en una pequeña cantidad de etanol 95% y se tomó una alícuota la cual se transfirió a un balón apearado de 25 mL donde se secó por completo en el mismo rotavapor, para preparar la muestra para resonancia magnética nuclear. La misma se disolvió en aproximadamente 0.5 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>), para posteriormente traspasarla a un tubo especial para RMN 5 mm ID; por último se ingresó al equipo de RMN Bruker Ascend 400 MHz. Seguidamente, se realizaron variaciones a las condiciones de extracción mostradas anteriormente donde se utilizó una mezcla de solventes, específicamente etanol-eter etílico con una proporción 80/20 %v/v y se varió la proporción solvente/sólido a una relación 4:1 mL/g.

Por otro lado, se realizaron lavados a las cáscaras de la naranja morterizadas previo a la extracción en el baño ultrasónico con dos disolventes distintos. Primeramente se realizaron lavados con agua destilada fresca a temperatura ambiente, se utilizó una cantidad de disolvente suficiente para cubrir las cáscaras de naranja, estos lavados se hicieron por duplicado y con un tiempo en el baño ultrasónico de 15 minutos cada uno. Entre cada lavado se realizó una filtración por gravedad con ayuda de un papel filtro analítico Whatman 50. Los segundos lavados que se realizaron son con éter etílico cubriendo por completo las cáscaras de naranjas, los lavados se realizaron

por duplicado con disolvente fresco a temperatura ambiente. Entre cada lavado se realizó una filtración por gravedad con ayuda de un papel filtro analítico Whatman 50, sin embargo, el tiempo de cada lavado en este caso es de 20 minutos.

Agregados los lavados al procedimiento se continua con las extracciones ultrasónicas con las condiciones de operación mostradas en el Cuadro 3.3 y las variaciones mencionadas anteriormente. Con los extractos finales obtenidos en ambos casos se realizan folios de cromatografía de capa fina ascendente (CCF) con distintos disolventes y proporciones tal como se muestra en el Cuadro 3.4.

**Cuadro 3.4.** Disolventes utilizados para las pruebas de cromatografía de capa fina ascendente.

Disolvente	Proporción
Metil terbutil éter/metanol	9:1
Metil terbutil éter/metanol	8:2
Metil terbutil éter/metanol	7:3
Metil terbutil éter/metanol	6:4
Metil terbutil éter/etanol	9:1
Diclorometano/metanol	8:2

Dicho sistema consistió en colocar sobre un beaker tapado con un vidrio reloj 10 mL del disolvente o mezcla de disolventes junto a dos gotas de ácido acético glacial en todos los casos e insertar una pequeña placa de sílice donde se colocaron dos gotas de la extracción concentrada en la parte inferior del mismo a 1 cm de su borde. Una vez que la fase móvil llegó al frente del disolvente, esta se sacó del beaker con una pinza por la parte superior y se colocó en la mesa de trabajo durante aproximadamente 5 minutos para que se secara por completo antes de ser revelada en la lámpara ultravioleta con una longitud de onda de 254 nm.

Cuando la placa con la muestra estaba totalmente seca se trasladó a la capilla de extracción de vapores y se roció con vanilina para posteriormente revelarla en una plantilla caliente.

Finalmente, con las extracciones en que se utilizaron las condiciones de operación mostradas en el Cuadro 3.3 se realizó una cromatografía de columna con gel de sílice para obtener las fracciones presentes en las cromatografías de capa fina, dicho sistema se muestra en la Figura 3.2. Este sistema consistió en colocar una base

de algodón al fondo de la columna, agregar sílice hasta unas tres cuartas partes de la misma dándole unos pequeños golpes a la columna para asentar de manera correcta la sílice. Posteriormente, se agregó sílice del mismo grado a un balón de 500 mL el cual contenía la extracción con una cantidad pequeña de disolvente dónde se seco por completo hasta tener una apariencia suelta y fina; esto se agregó a la columna previamente empacada con sílice fresca y se cubre con un algodón para evitar salpicaduras de la muestra cuando se agregó el disolvente de las distintas fracciones por la parte superior.



**Figura 3.2.** Cromatografía de columna realizada a las extracciones

Los disolventes utilizados para la cromatografía se agregan por la parte superior de la columna y se recolectan las fracciones de 250 mL cada una en erlenmeyers debidamente rotulados, se debe estar pendiente de la columna ya que la misma en ningún momento se debe de secar, es decir, siempre debe tener disolvente por encima del algodón colocado en la parte superior. Los disolventes utilizados para las distintas fracciones de la columna se muestran en el Cuadro 3.5



**Cuadro 3.5.** Disolventes utilizados para cromatografía de columna.

<b>Disolvente</b>	<b>Volumen (mL)</b>
Metil terbutil éter	250
Metil terbutil éter/metanol	225/25
Metil terbutil éter/metanol	200/50
Metil terbutil éter/metanol	150/100

Las fracciones con las cuáles se buscó identificar la presencia de flavonoides de interés dependiendo de la polaridad de estos en los disolventes utilizados, fueron recolectadas en erlenmeyers para posteriormente ser traspasadas a balones de 500 mL donde se concentraron con ayuda de un rotavapor Buchi R-210. Con dichas fracciones concentradas se realizaron folios de cromatografía de capa fina ascendente (CCF) utilizando como disolvente una mezcla de diclorometano/metanol en una relación 95/5 con un volumen total de mezcla utilizado igual a 250 mL más unas gotas de ácido acético glacial, se sigue el mismo procedimiento descrito anteriormente para esta técnica.

Posterior a la revelación bajo la lámpara ultravioleta, se cortaron las distintas franjas presentes en el folio que se lograron distinguir y se separaron en erlenmeyers rotulados donde los trozos fueron cubiertos con metil terbutil éter y se dejaron reposando durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se filtraron las fracciones por gravedad con ayuda de un papel analítico Whatman 50 y se recolectaron en balones para secarlas con ayuda de un rotavapor Buchi R-210 y así tener listas las muestras para las mediciones respectivas de resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones (2D).

La última prueba que se realizó con algunas de las extracciones fue la medición de espectros ultravioleta-visible, donde las muestras se trasvasaron a un balón, donde se aforó a 25 mL con metanol. Con las muestras listas, se preparó el equipo y las celdas para iniciar con las lecturas. Las celdas se deben de agarrar por la parte opaca y deben de limpiarse con mucho cuidado, solamente realizando un contacto leve con una toalla de cocina en las paredes de la misma para eliminar el solvente fresco con que se limpiaron. En una celda se colocó solamente solvente para evitar

los efectos de matriz (denominado blanco) y en la otra se colocó la muestra de interés. Se programa el equipo para que realizara un barrido desde una longitud de onda de (190 a 400) nm para obtener el espectro respectivo e identificar el tipo de sustancia. Con esto se buscó la comprobación de una manera rápida, económica y fiable la presencia de los compuestos de interés en los extractos obtenidos previo a realizar los espectros de resonancia magnética nuclear, pues los reactivos empleados en dicha técnica son costosos y muy específicos.

### **3.3 Obtención de los extractos fenólicos mediante extracción asistida por ultrasonido**

Para determinar las condiciones óptimas de extracción de los flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja vía ultrasonido, se utilizó una metodología de superficie de respuesta (MSR) específicamente un diseño central compuesto (DCC) con cuatro repeticiones en el punto central, donde la variable de respuesta de dicho modelo fue la cantidad total de polifenoles presentes en los extractos mediante el método de Folin-Ciocalteu. Las condiciones de operación para las distintas extracciones se encuentran en el Cuadro 3.6.

Como se observa en el Cuadro 3.6 los factores estudiados en dicho modelo estadístico fueron: la concentración de etanol utilizado para la extracción, la temperatura del baño ultrasónico y por último el ratio solvente/sólido. Dichos factores fueron seleccionados debido a que según diversos autores, como por ejemplo: Andres *et al.* (2020) y Tranquilino *et al.* (2020) son importantes para la obtención final de polifenoles en los extractos. De acuerdo con los mismos autores, los valores entre los cuales se variaron dichos factores fueron asignados de la siguiente manera: concentración de etanol de un (80 a 90) % v/v, mientras que la temperatura del baño ultrasónico de (30 a 60) °C para estar así siempre por debajo de la temperatura de ebullición del etanol, que es de aproximadamente 78.4°C y finalmente el ratio solvente/sólido se varió de (10 a 20) mL/g.

**Cuadro 3.6.** Condiciones de operación para las extracciones de polifenoles vía ultrasonido.

Orden estándar corrida	Masa sólido (g)	Concentración etanol (%V/V)	Temperatura (°C)	Ratio solvente/sólido (mL/g)
6	25.0595	90	30	20
12	25.0508	85	70	15
10	25.0193	93	45	15
11	25.0443	85	20	15
16	25.0551	85	45	15
3	25.0783	80	60	10
2	25.0098	90	30	10
4	25.0167	90	60	10
15	25.0528	85	45	15
5	25.0302	80	30	20
17	25.0291	85	45	15
1	25.0512	80	30	10
9	25.0424	77	45	15
13	25.0081	85	45	7
7	25.0257	80	60	20
18	25.0994	85	45	15
8	25.0146	90	60	20
14	25.0069	85	45	23

En cuanto a la masa del sólido la misma se fijó en un valor de 25 g basados en los rangos de trabajo de la proporción solvente/sólido y la capacidad de la cristalería de laboratorio junto al baño ultrasónico.

Una vez definidas las condiciones de extracción, se siguió un procedimiento similar al propuesto por Sharma *et al.* (2018) con algunas modificaciones, el cual se detallan a continuación.

Se inició pesando la masa de las cáscaras de naranja morterizadas en una balanza analítica Adventurer OHAUS, para ingresar las mismas en un erlenmeyer de 500 mL y preparar el sistema de extracción. Una vez colocada la cantidad de cáscaras necesarias se realizaron lavados con 100 mL de éter etílico por 15 minutos en el baño ultrasónico a temperatura ambiente para eliminar la mayor cantidad de grasas posi-

bles en la muestra, donde estos lavados se realizan por duplicado. Entre cada lavado se realiza una filtración por gravedad con ayuda de un papel analítico Whatman 50. Posterior a dichos lavados se continúa con dos lavados más pero en esta ocasión con agua para sustraer la mayor cantidad de azúcares presentes en la muestra, utilizando aproximadamente 75 mL en cada uno de ellos y de igual manera durante 15 minutos, se finalizan filtrando por gravedad con ayuda de un papel filtro Whatman 50, tal y como se muestra en la Figura 3.3



**Figura 3.3.** Filtraciones por gravedad para los lavados previos realizados a las extracciones ultrasónicas.

Una vez terminados ambos lavados por duplicado, se agregó etanol para la extracción ultrasónica de acuerdo a los datos mostrados en el Cuadro 3.6 y se procedió a extraer durante 20 minutos. Finalizado este tiempo de extracción las muestras se filtraron por gravedad con ayuda de un papel filtro Whatman 50 donde se recolectaron en un balón de 500 mL para posteriormente concentrar el extracto obtenido con ayuda de un rotavapor Buchi R-210.

Estos extractos se trasladaron a un balón aperedo de 25 mL y se secaron por completo, para posteriormente redissolverlos en una pequeña cantidad de etanol y ser almacenados en la refrigeradora previo a su caracterización mediante resonancia magnética nuclear y cromatografía de capa fina.

### 3.4 Caracterización de los flavonoides presentes en los extractos de las cáscaras de la naranja mediante resonancia magnética nuclear y cromatografía de capa fina

Para realizar las cromatografías de capa fina ascendente (CCF) se utilizaron los extractos concentrados almacenados en la refrigeradora, donde, se tomaron dos gotas de este con ayuda de una pipeta pasteur y se colocaron en la base de la placa de gel de sílice a una distancia aproximada de 1 cm desde su base, dicha placa se inserta en un beaker al cual se le agregaron 9.7 mL de diclorometano y 0.3 mL de metanol más dos gotas de ácido acético glacial. El sistema se tapó con ayuda de un vidrio reloj y se dejó de correr la fase móvil por la placa hasta que esta llegó al frente de disolvente en la parte superior del folio, se sacó la placa del beaker con una pinza metálica y se coloca sobre la mesa de trabajo durante 5 minutos para que la misma se seque por completo antes de ser revelada en la lámpara ultravioleta con una longitud de onda de 254 nm.

Posterior a revelar en la lámpara ultravioleta, la placa se roció con vanilina en una capilla de extracción de vapores para seguidamente colocarla con ayuda de una pinza sobre una plantilla caliente y revelar la misma.

Con el resto del extracto contenido en el balón apreado de 25 mL se tomó una alícuota y se transfirió a otro balón apreado para secarla por completo con ayuda de un rotavapor Buchi R-210, una vez seco totalmente se procedió a preparar la muestra para resonancia magnética nuclear disolviendo esta en 0.5 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>) y se traspasó con ayuda de una pipeta pasteur a un tubo especial para RMN 5 mm ID tal como lo indica Murillo *et al.* (2017). Para el espectro protónico se midieron 64 pulsos a todas las muestras. Es importante mencionar que se le asigna un código a cada corrida experimental siguiendo el formato que se muestra a continuación para todo el diseño estadístico: TES#MN, esto con el fin de identificar cada una de las muestras y guardar los archivos generados por el equipo de resonancia magnética nuclear.

En cuanto a las muestras para observar los espectros RMN en dos dimensiones (2D),

se siguió el mismo procedimiento de preparación descrito anteriormente solamente que el disolvente utilizado fue cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Para observar los compuestos de una manera clara el espectro H,H-COSY fue medido durante 2 horas, el HSQC durante 10 horas, el HMBC durante 15 horas y el espectro  $^{13}\text{C}$  durante 12 horas. El tiempo asignado a dichas mediciones, asegura que los experimentos de RMN y sus resultados presenten una relación señal de ruido favorable.

Para la cuantificación de la quercetina, se utilizó dicho polifenol debido a la presencia de picos característicos observados en los espectros protónicos de todas las muestras presentes en los extractos además de que según Olufunmilayo *et al.* (2015) es de los compuestos mayoritarios presentes en las cáscaras de la naranja maduras. Se pesaron 100.3440 g en la balanza analítica Adventurer OHAUS para posteriormente realizarle lavados en el baño ultrasónico con 350 mL de éter etílico por duplicado, durante 20 minutos cada uno con el fin de remover la mayor cantidad de grasa posible del extracto. Posterior a los lavados, se extrajo en el baño ultrasónico durante 15 minutos con etanol 95%, dicho extracto se filtró por gravedad con ayuda de un papel filtro Whatman 50 para posteriormente pasarlo a una probeta donde se determinó su volumen exacto.

Seguidamente, se tomaron alícuotas de 50.00 mL con pipetas aforadas para ser trasvasadas a un balón aforado de 100.00 mL, tal y como se muestra en la Figura 3.4 . En un beaker de 50 mL se pesaron en balanza analítica cantidades de quinina de (25 a 35) mg, variando en 5 mg cada medición para disolver en metanol la misma completamente y agregar a cada balón aforado con la alícuota previamente trasvasada. Finalizando el procedimiento, se aforó el balón de 100 mL utilizado. De los balones se tomaron alícuotas de 10 mL con pipetas aforadas para traspasarlas a un balón aforado concentrando el extracto obtenido con ayuda de un rotavapor Buchi R-210. Se preparó la muestra en  $\text{DMSO-d}_6$  para realizarle el espectro de resonancia magnética nuclear y poder cuantificar el mismo.



**Figura 3.4.** Balones aforados para la cuantificación mediante resonancia magnética nuclear.

### 3.5 Cuantificación de flavonoides totales

Para las muestras previamente preparadas y almacenadas en la refrigeradora en pequeños viales con un volumen de 10 mL de etanol y una masa exacta conocida pesada con ayuda de una balanza analítica Adventurer OHAUS, tal como se muestra en la Figura 3.5, se tomaron 0.5 mL de la muestra a una concentración conocida para posteriormente añadirle 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y 10 mL de disolución de carbonato de sodio 7.5% el cuál actúa como un buffer en la reacción para ajustar el pH. La mezcla anterior se diluyó a un balón aforado de 25 mL con agua destilada, y se dejó reposando en oscuridad durante 60 minutos.



**Figura 3.5.** Viales preparados para la cuantificación de flavonoides presentes en los extractos mediante Folin-Ciocalteu.

Posteriormente se midió la absorbancia de dicha mezcla en un espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 750 nm, y se interpoló el resultado obtenido en una curva de calibración previamente elaborada con ácido gálico, dicha curva de calibración se elabora siguiendo el procedimiento descrito por García Martínez *et al.* (2015) partiendo de una disolución madre de ácido gálico con una concentración 100 mg/L, se preparan 9 disoluciones diluidas de 10 mL con concentraciones crecientes del ácido desde 0 mg/L hasta 16 mg/L, variando cada 2 mg/L. Se utiliza ácido gálico debido a que su capacidad antioxidante es bastante conocida y logra formar un complejo bastante coloreado aún en concentraciones relativamente bajas (Tovar, 2013).

Los resultados se expresan como miligramos de ácido gálico equivalente (GAE)/g muestra, dicho resultado es de suma importancia debido a que es la variable respuesta del diseño estadístico seleccionado para determinar las condiciones óptimas de extracción.

### **3.6 Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH de los flavonoides extraídos vía ultrasónica**

De los mismos viales preparados para la prueba anterior, se tomaron 2 mL de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 0.25 mM en metanol y se mezclaron con diferentes alícuotas de la muestra, se diluyó a 5 mL con metanol. Dicha disolución es incubada



en la oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos, para posteriormente medir su absorbancia a 517 nm.

Se calculó el porcentaje de inhibición respecto a un blanco el cuál solamente contenía metanol, y se graficó contra la concentración. El  $IC_{50}$  se calculó como la concentración de la muestra necesaria para obtener un 50% de inhibición al radical utilizado.



# ANÁLISIS DE RESULTADOS

## 4.1 Obtención de los extractos de las cáscaras de la naranja vía ultrasónica

La extracción asistida por ultrasonido es de las más utilizadas gracias a la gran eficacia que posee, esta se debe principalmente a la acción de las burbujas de cavitación que se generan durante la sonificación en el baño ultrasónico, en el momento en que dichas burbujas colapsan con las paredes vegetales de las cáscaras de la naranja alteran la pared de la célula vegetal incrementando la liberación de los compuestos extraíbles (Tarazona, 2016). Es de suma importancia determinar las condiciones óptimas de temperatura del baño ultrasónico, concentración del solvente y ratio solvente/sólido utilizado ya que un incremento en alguna de estas puede generar una degradación de los compuestos de interés. Por el contrario, valores bajos de estos pueden incrementar la presencia de sustancias que no son de interés en los extractos como por ejemplo azúcares o grasas presentes en las cáscaras de la naranja al utilizar concentraciones de solvente bajas lo que se reflejaría en una disminución en el rendimiento de la extracción de los polifenoles.

Con base en lo mencionado anteriormente, son estos factores los que se utilizaron en la metodología de superficie de respuesta, específicamente en el diseño central compuesto donde la variable de respuesta del modelo fue la cantidad total de polifenoles presentes en los extractos, dicha variable se calculó mediante el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados de la cantidad total de polifenoles obtenidos se muestran en el Cuadro 4.1.

**Cuadro 4.1.** Diseño central compuesto con la cantidad total de compuestos fenólicos obtenidos mediante el método Folin-Ciocalteu como variable de respuesta para las extracciones realizadas a las cáscaras de la naranja.

Orden estándar corrida	Concentración etanol (%V/V)	Temperatura (°C)	Ratio solvente/sólido (mL/g)	Polifenoles totales (mg GAE/g muestra)
6	90	30	20	46.58
12	85	70	15	30.32
10	93	45	15	39.57
11	85	20	15	31.34
16	85	45	15	54.64
3	80	60	10	26.95
2	90	30	10	38.60
4	90	60	10	45.21
15	85	45	15	55.14
5	80	30	20	49.26
17	85	45	15	46.78
1	80	30	10	48.76
9	77	45	15	73.84
13	85	45	7	46.55
7	80	60	20	28.17
18	85	45	15	54.79
8	90	60	20	32.38
14	85	45	23	29.66

La selección de dichos factores se debió a que según diversos autores como por ejemplo Andres *et al.* (2020) y Dahmoune *et al.* (2014) son importantes para la obtención final de polifenoles en los extractos. De acuerdo con los mismos autores, los intervalos de variación de dichos factores en el diseño estadístico corresponden a una concentración de disolvente de (80 a 90) %v/v, temperatura del baño ultrasónico de (30 a 60) °C para no sobrepasar en ningún momento la temperatura de ebullición del solvente utilizado (etanol) que es de 78.4 °C y el ratio solvente/sólido de (10 a 20) mL/g. Es de suma importancia no sobrepasar en ningún momento la temperatura de ebullición de dicho solvente, ya que sino este se evaporará y se saldrá del sistema de extracción dejando al mismo sin un medio para que se dé la extracción de los compuestos de interés de la materia sólida, además, de que se puede dar una posible

descomposición térmica de los compuestos de interés. La masa del cáscaras inicial de extracción se fijó en un valor aproximado de 25 g basados en la capacidad de la cristalería de laboratorio junto al baño ultrasónico según la variación del ratio solvente/sólido en cada corrida experimental.

De acuerdo con los resultado mostrados en el Cuadro 4.1 se tiene un promedio de polifenoles totales de 43.25 mg GAE/g muestra, el cual es superior a los valores promedio observados por otros autores como por ejemplo Sok *et al.* (2018) con un valor de 28.03 mg GAE/g muestra, Singh *et al.* (2020) con un valor de 27.58 mg GAE/g muestra y Nishad *et al.* (2019) con un valor de 15.90 mg GAE/g muestra. Las diferencias en la cantidad total de polifenoles obtenidas según Singh *et al.* (2020) puede atribuirse a distintos factores como lo son el secado de la materia prima antes de realizar la extracción, el grado de maduración de la cáscara de la fruta utilizada, la ubicación geográfica del cultivo, el tipo de solvente utilizado y la técnica de extracción empleada, sin embargo, estos dos últimos factores están descartados ya que para todos los casos mencionados el solvente utilizado fue el etanol y el método de extracción fue el asistido ultrasonido.

La optimización del proceso de extracción ultrasónica se realizó aplicando un factorial completo  $2^3$  en un DCC para ajustar a un modelo polinomial de segundo orden con las 18 corridas experimentales que se desarrollaron y estudiar así los efectos lineales y de interacción, los efectos cuadráticos o de curvatura propia. El modelo de segundo orden obtenido se presenta a continuación, dónde: C es concentración de etanol (% v/v), T es temperatura del baño ultrasónico (°C), s/s es el ratio solvente/sólido (mL/g) y Pt son los polifenoles totales (mg GAE/g muestra):

$$Pt = 455 - 9.6C - 1.49T + 10.5s/s + 0.040C * C - 0.0362T * T - 0.223s/s * s/s + 0.0589C * T - 0.033C * s/s - 0.0335T * s/s \quad (1)$$

Con el modelo de segundo orden presentado anteriormente se observa que el mismo posee un buen ajuste para los datos experimentales pues el valor del coeficiente

de determinación ( $R^2$ ) obtenido es de 71.48 % tal y como se muestra en la Figura 4.1, y de acuerdo con Gutiérrez y De la Vara (2008) para estos diseños estadísticos un valor superior al 70% es recomendado utilizarlo y su calidad de predicción es aceptable. Por su parte  $R^2_{ajustado}$  lo que nos indica es la variabilidad en la cantidad total de polifenoles extraídos, este valor al no ser tan elevado significa que los factores estudiados (temperatura del baño ultrasónico, concentración de etanol y ratio solvente/sólido) y sus interacciones no son responsables en gran medida de las variaciones obtenidas en la variable respuesta.

## Resumen del modelo

		R-cuad.	R-cuad.
	S	R-cuad. (ajustado)	(pred)
	9.59967	71.48%	39.39% 0.00%

**Figura 4.1.** Resumen del modelo diseño central compuesto para las extracciones de polifenoles en las cáscaras de la naranja.

Al determinar un correcto ajuste del modelo a los datos experimentales, lo siguiente es identificar aquellos factores que son significativos con un 95% de confianza, es decir, todos aquellos que posean un valor-p menor a 0.05 y son pues los que generan cambios en la variable de respuesta. Dicho análisis de varianza se muestra en la Figura 4.2.

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	1847.70	205.299	2.23	0.137
Lineal	3	441.12	147.042	1.60	0.265
Cn ETOH (%V/V)	1	168.74	168.742	1.83	0.213
Temperatura (°C)	1	199.56	199.563	2.17	0.179
Ratio Solvente/Sólido (mL/g)	1	72.82	72.820	0.79	0.400
Cuadrado	3	1194.87	398.291	4.32	0.043
Cn ETOH (%V/V)*Cn ETOH (%V/V)	1	12.49	12.486	0.14	0.722
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	1	841.15	841.151	9.13	0.017
Ratio Solvente/Sólido (mL/g)*Ratio Solvente/Sólido (mL/g)	1	394.21	394.211	4.28	0.072
Interacción de 2 factores	3	211.70	70.565	0.77	0.544
Cn ETOH (%V/V)*Temperatura (°C)	1	155.85	155.850	1.69	0.230
Cn ETOH (%V/V)*Ratio Solvente/Sólido (mL/g)	1	5.40	5.396	0.06	0.815
Temperatura (°C)*Ratio Solvente/Sólido (mL/g)	1	50.45	50.451	0.55	0.481
Error	8	737.23	92.154		
Falta de ajuste	5	688.17	137.635	8.42	0.055
Error puro	3	49.06	16.352		
Total	17	2584.92			

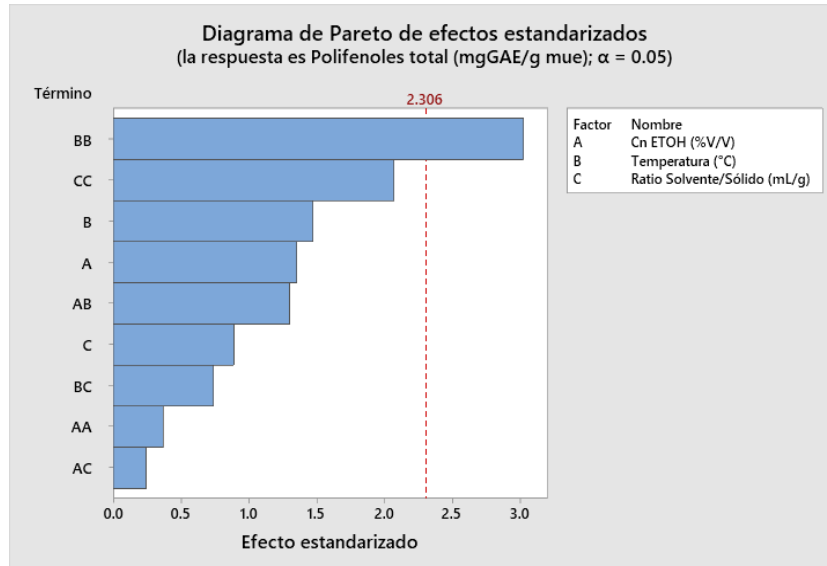
**Figura 4.2.** Tabla del análisis de varianza para las extracciones de polifenoles en las cáscaras de la naranja.

Como se puede observar en la Figura 4.2 solamente el término cuadrático de temperatura es significativo para la obtención de los compuestos fenólicos extraídos vía ultrasonido con un valor-p de 0.017 el cual es menor al valor de significancia de 0.05. Utilizando esta misma Figura, se identifica que el modelo cuadrático se ajusta para el proceso de optimización realizado gracias a su valor-p de 0.043, además, de confirmar la no significancia del modelo a un ajuste de un sistema lineal pues su valor-p es 0.265, mayor a la significancia de 0.05.

De igual forma, según la Figura 4.2 se corrobora que el modelo se ajusta de manera adecuada a los datos experimentales pues el error en la falta de ajuste es no significativo gracias a su valor-p de 0.055, mayor a la significancia. Es decir, el modelo manifiesta de manera adecuada la relación entre la variable de respuesta y los predictores.

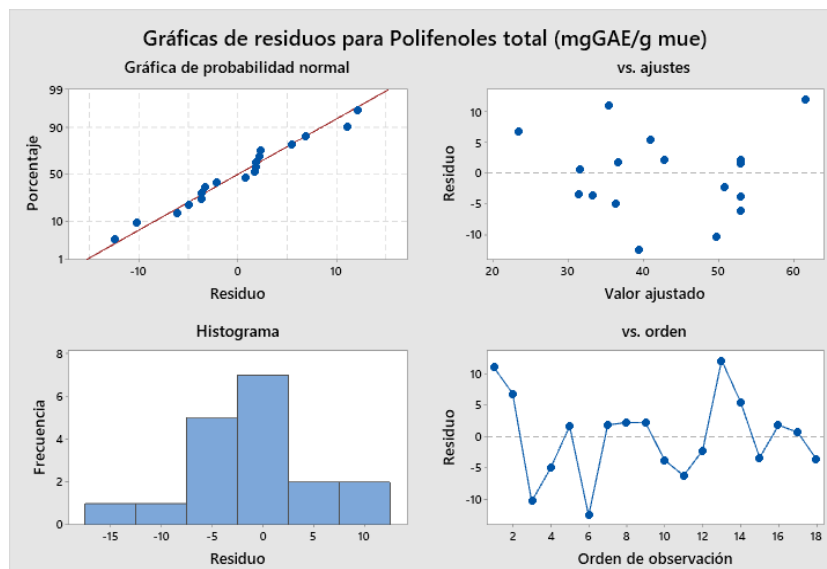
El término significativo se puede confirmar de forma gráfica con ayuda del diagrama de Pareto de efectos estandarizados que se muestra en la Figura 4.3 el cual compara la magnitud relativa y la significancia estadística de los efectos principales, los cuadráticos y sus interacciones ordenados de manera decreciente, donde aquellos que

sobrepasen la línea roja punteada del gráfico son los significativos, esto es, aquellos términos que generan cambios en la variable de respuesta.



**Figura 4.3.** Pareto de los efectos estandarizados para las extracciones de polifenoles en las cáscaras de la naranja.

Para comprobar la validez de los resultados obtenidos se realizó la verificación de los supuestos del modelo tal y como se presenta en la Figura 4.4 con ayuda de los residuos, pues estos son una herramienta útil y sencilla de verificarlo.

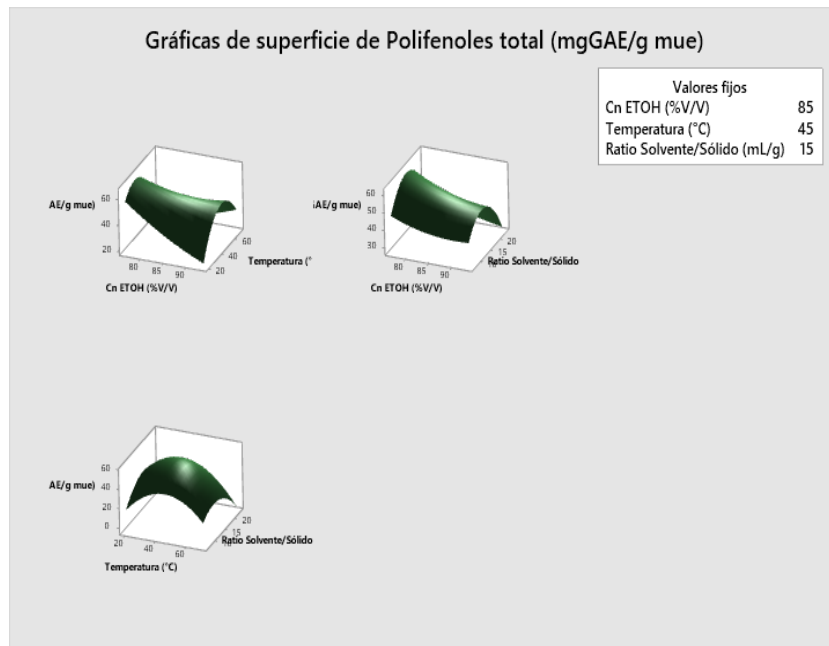


**Figura 4.4.** Gráfica de residuos para la extracción asistida ultrasonido de polifenoles presentes en las cáscaras de la naranja.

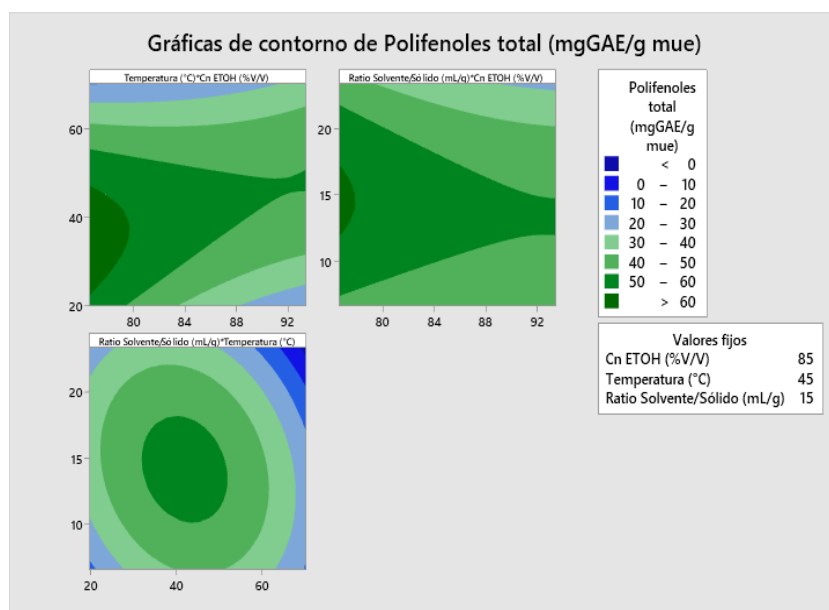


Como se observa en la Figura 4.4 en la esquina superior izquierda se presenta la gráfica de residuos contra los valores esperados en una distribución normal, la cual se cumple ya que no se observan valores atípicos o alejados de la línea roja, además, de verificar con una prueba de normalidad (Anderson-Darling) dicha gráfica obteniendo un valor-p de 0.227, lo que indica que se puede concluir con suficiente evidencia estadística que los datos siguen una distribución normal. Por otro lado en la esquina superior derecha se observa la gráfica de residuos contra los valores ajustados donde se comprueba el supuesto de varianza constante puesto que los residuos se encuentran distribuidos de manera aleatoria ya que no se logra detectar un patrón entre los mismos. En la parte inferior izquierda se observa el histograma donde se muestra un comportamiento de campana, que confirma una distribución normal para los residuos. Finalmente en la esquina inferior derecha se muestra la gráfica de residuos versus el orden en que se tomaron los datos, al no observar algún patrón o tendencia (creciente o decreciente) se comprueba validez del supuesto de independencia entre ellos; al aplicar el principio de aleatorización al inicio de la ejecución del experimento este comportamiento era el esperado, además este comportamiento también nos muestra que no aparecieron factores a lo largo del desarrollo del experimento que afectaran la respuesta observada.

La representación gráfica del modelo propuesto en la Ecuación 1 mediante superficies de respuesta y de contorno realizadas utilizando el software estadístico Minitab para la cantidad total de polifenoles obtenidos mediante una extracción ultrasónica variando la concentración de etanol, el ratio solvente/sólido y la temperatura del baño ultrasónico se muestran en las Figuras 4.5 y 4.6 respectivamente.



**Figura 4.5.** Gráficas de superficies de respuesta para la cantidad total de polifenoles en extractos de cáscaras de la naranja.



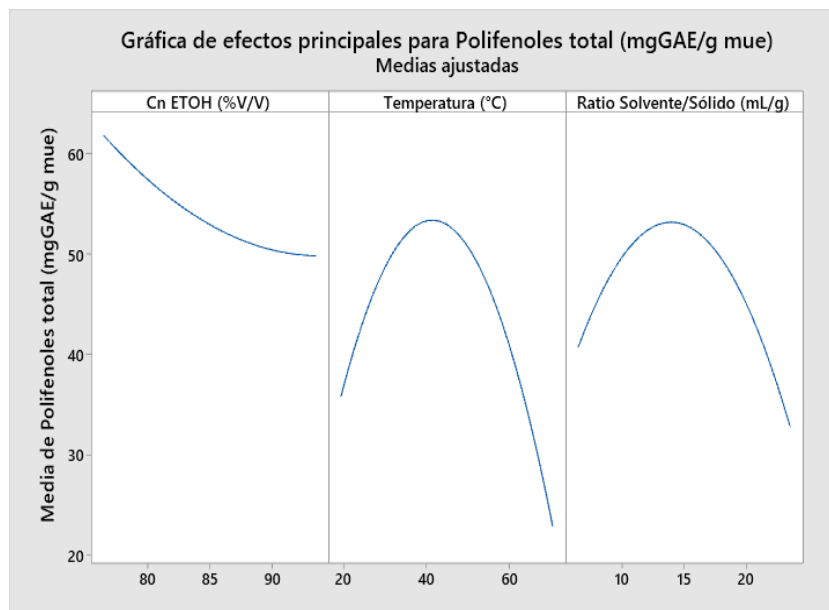
**Figura 4.6.** Gráficas de contornos para la cantidad total de polifenoles en extractos de cáscaras de la naranja.

Con el fin de encontrar las condiciones de operación que maximicen la variable de respuesta se analizan las Figuras 4.5 y 4.6, dónde observamos la presencia de dos puntos sillar en las gráficas superiores los cuales representan máximos o mínimos

locales dependiendo del sentido en que se movilizce, además, de corroborar dicho comportamiento con las gráficas de contorno al presentarse curvaturas en ambas direcciones, tanto hacia la parte inferior como superior. También se identifica un punto máximo de operabilidad en la gráfica inferior representado por una gráfica de montaña simétrica y de círculos concéntricos en su representación de contorno. Al no obtener una representación en forma de cordillera para las tres gráficas con dos factores cada vez, el centro del diseño de experimentos se ubica en una región que no es el punto estacionario el cuál determina las condiciones óptimas globales de extracción.

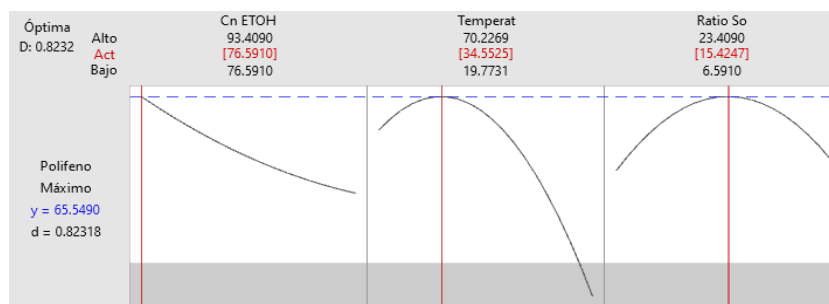
Con base en esto, se utiliza la última gráfica para determinar las condiciones óptimas de extracción del modelo propuesto por el programa estadístico donde la concentración de etanol a utilizar debe ser la menor de todo el diseño realizado pues este efecto no presenta una curvatura pronunciada, posee un coeficiente negativo y su término cuadrático es no significativo tal y como se presenta en la Figura 4.2, entonces, en este caso específico el tomar menores valores de concentración se maximiza la variable de respuesta, aunque no es conveniente utilizar valores inferiores a los asignados ya que esto generaría una extracción de sustancias que no son de interés para nuestro estudio como por ejemplo azúcares o grasas presentes en las cáscaras.

Esto se puede corroborar en la Figura 4.7, donde la menor concentración es la que genera una maximización en la variable de respuesta, aunado a esto se debe utilizar una temperatura cercana a los 35 °C y un ratio solvente/sólido de 15 mL/g pues son los puntos máximos de las curvas mostradas en los gráficos de cada efecto, condiciones de optimización similares a las obtenidas por distintos autores como por ejemplo: Tranquilino *et al.* (2020) y Dahmoune *et al.* (2014) para determinar la cantidad total de polifenoles presentes en varios extractos naturales.



**Figura 4.7.** Gráfica de efectos principales para la cantidad total de polifenoles en extractos de cáscaras de naranja.

Utilizando el modelo propuesto en la Ecuación 1 las condiciones óptimas de extracción ultrasónica para la cantidad total de polifenoles presentes en las cáscaras de la naranja brindadas por el software estadístico Minitab se muestran en la Figura 4.8, con una concentración de etanol de 76.59 %v/v, temperatura del baño ultrasónico de 34.55 °C y un ratio solvente/sólido de 15.42 mL/g. La deseabilidad obtenida fue de 0.82, este valor indica que tan bien una combinación de las variables analizadas satisface el valor que se definió para la variable de respuesta, lo cual el valor al ser relativamente alto indica que la configuración logró resultados favorables para la variable de respuesta en estudio.



**Figura 4.8.** Predicción de las condiciones óptimas para la cantidad total de polifenoles en extractos de cáscaras de naranja.

Como se puede observar la respuesta máxima para las condiciones óptimas propuestas es de 65.55 mg GAE/g muestra, valor que se encuentra un poco inferior al máximo valor determinado experimentalmente del diseño mostrado en el Cuadro 4.1 el cual fue de 73.84 mg GAE/g muestra. La no obtención de un máximo igual o superior al dato mayor obtenido experimentalmente podría deberse a la presencia de puntos silla los cuales no predicen de manera correcta el máximo de operabilidad, si no, que brindan información de hacia donde se podría desplazar un nuevo diseño estadístico utilizando estas condiciones para obtener el máximo buscado, centrando el diseño en el punto estacionario (Gutiérrez y De la Vara, 2008). El valor máximo supera de manera notoria al promedio de los datos obtenidos experimentalmente, por lo que al no haber réplicas de dicho punto, ya que es un punto estrella tampoco podría descartarse un error humano a la hora de realizar la extracción como por ejemplo lectura de la temperatura del baño ultrasónico a lo largo de todo el proceso de extracción, posición del termómetro dentro del baño ultrasónico, medición de la masa final para la cuantificación de los polifenoles o bien no secar por completo el extracto en el rotavapor.

Los resultados experimentales obtenidos para las extracciones en las condiciones óptimas brindadas por el modelo empleado se muestran en el Cuadro 4.2. Se obtiene una media de 67.25 mg GAE/g de muestra, el cual es un valor bastante cercano al predicho por el modelo para las condiciones óptimas, con un valor teórico de 65.55 mg GAE/g de muestra, es decir, se tiene una discrepancia o porcentaje de error con respecto al promedio de los datos inferior al 2.6%.

**Cuadro 4.2.** Polifenoles totales obtenidos mediante el método de Folin-Ciocalteu para los puntos óptimos del diseño de experimentos.

Repetición del punto óptimo	Polifenoles totales (mg GAE/g muestra)
1	62.83
2	72.83
3	65.85
4	67.50

Los resultados obtenidos mediante la extracción asistida por ultrasonido muestran la gran capacidad antioxidante que poseen las cáscaras de la naranja *Citrus sinensis*

analizadas, dicha capacidad antioxidante es la principal contribuyente a las acciones biológicas específicas en la prevención y tratamiento de enfermedades humanas, por lo que al tener altos resultados sobre estos componentes fitoquímicos bioactivos se le puede definir un alto valor medicinal a las cáscaras utilizadas (Sok *et al.*, 2018). Dentro de los beneficios para la salud que presentan dichas sustancias es que son agentes antivirales, antifúngicos, antibacteriales y pueden ser ampliamente utilizados en distintas industrias como la farmacéutica, cosmética y alimentaria (Damián *et al.*, 2016).

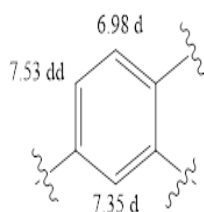
Para futuros estudios se recomienda centrar el diseño experimental en las condiciones óptimas de extracción obtenidas para determinar un óptimo global de operabilidad y determinar si se presenta una mejora significativa en la capacidad antioxidante a dichas condiciones, sin embargo, con las condiciones actuales de operación los resultados obtenidos son bastantes promisorios ya que son mayores a los reportados por distintos autores.

## **4.2 Elucidación y cuantificación del contenido de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de las cáscaras de naranja mediante Resonancia Magnética Nuclear y Cromatografía de Capa Fina**

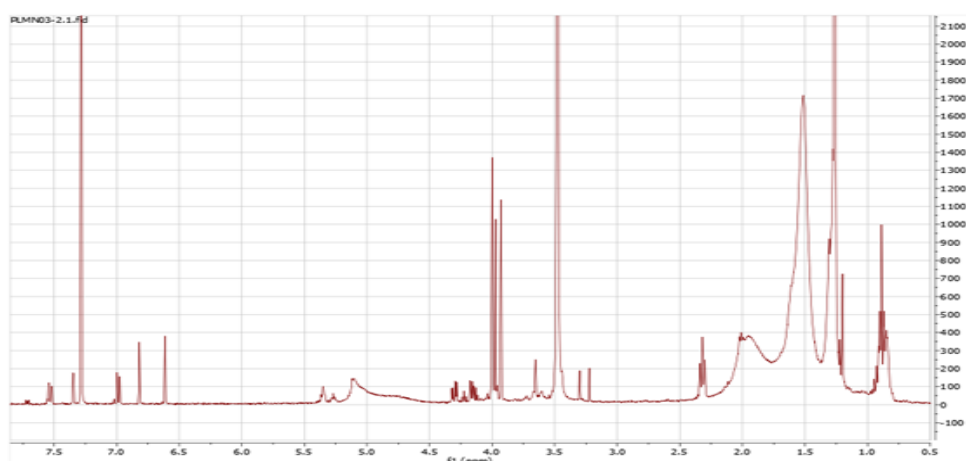
De las extracciones de los polifenoles obtenidas mediante ultrasonido y luego de realizar las separaciones cromatográficas respectivas, se logró aislar un compuesto relativamente puro el cual se se identificó como PLMN03-2, es importante recalcar que las muestras son codificadas con el único fin de llevar un orden de las corridas experimentales realizadas y para obtener una secuencia de los espectros que el equipo de RMN Bruker Ascend brinda.

Este compuesto, como se muestra en la Figura 4.10 se encuentra contaminado con ácidos grasos ubicados en el espectro en la zona de 1.5 a 4 ppm aproximadamente, los mismos no interfieren en la identificación del compuesto ya que se encuentran fuera de la zona de interés. Sin embargo, en la ampliación de dicho espectro presentada en

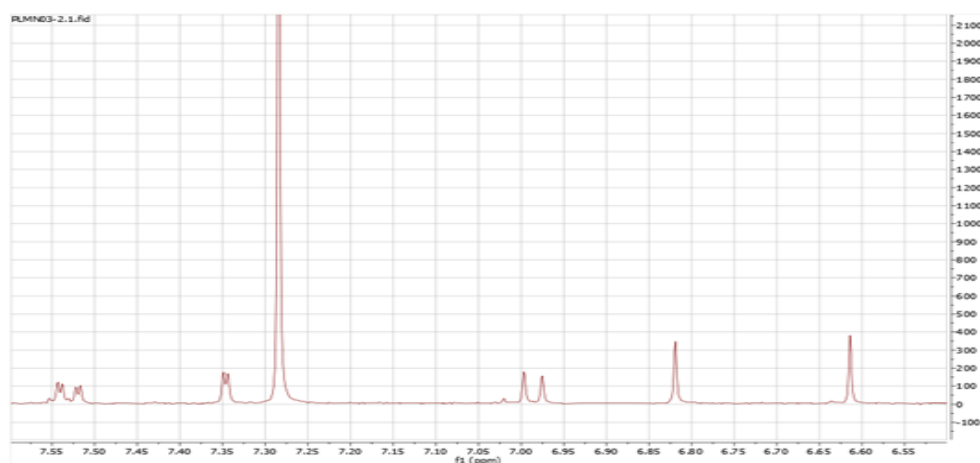
la Figura 4.11 se observan un grupo de señales aromáticas alrededor de 7 ppm. Del espectro H,H-COSY se deriva que el doblete a 6.98 ppm acopla con una constante de acoplamiento de 7 Hz con el doblete de dobletes a 7.53 ppm, y este a su vez acopla con el doblete a 7.35 ppm con una constante de acoplamiento de 1.5 Hz. Este patrón de acoplamiento sugiere la presencia de un anillo aromático con tres sustituyentes tal como se muestra a en la Figura 4.9



**Figura 4.9.** Patrón de acoplamiento para el anillo aromático con tres sustituyentes

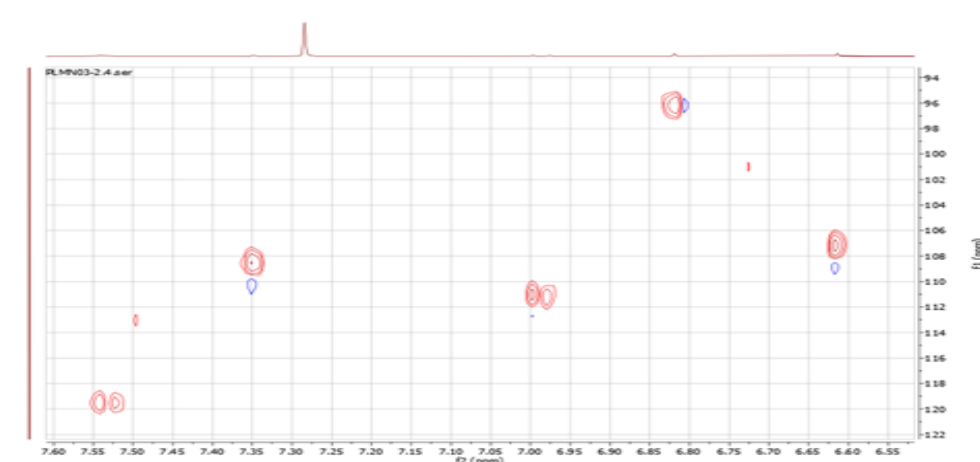


**Figura 4.10.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN 400 MHz, en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto PLMN03-2



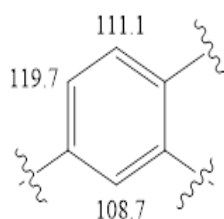
**Figura 4.11.** Ampliación del espectro  $^1\text{H}$ -RMN 400 MHz, en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto PLMN03-2

Seguidamente del espectro HSQC se pueden observar directamente los cambios químicos de  $^{13}\text{C}$  de los carbonos enlazados directamente a los  $^1\text{H}$  previamente descritos, tal como se presenta en la Figura 4.12. Estos cambios químicos tanto para los espectros  $^1\text{H}$  como  $^{13}\text{C}$  son las posiciones de absorción en el RMN debido al efecto pantalla de los electrones de otros átomos que rodean la molécula de interés que permiten generar el espectro de resonancia magnética nuclear pertenecientes a cada extracto analizado (Pavia *et al.*, 2001). Por otra parte, en la Figura 4.13 se presentan los cambios químicos de  $^{13}\text{C}$  del anillo aromático descrito derivados del mismo espectro.



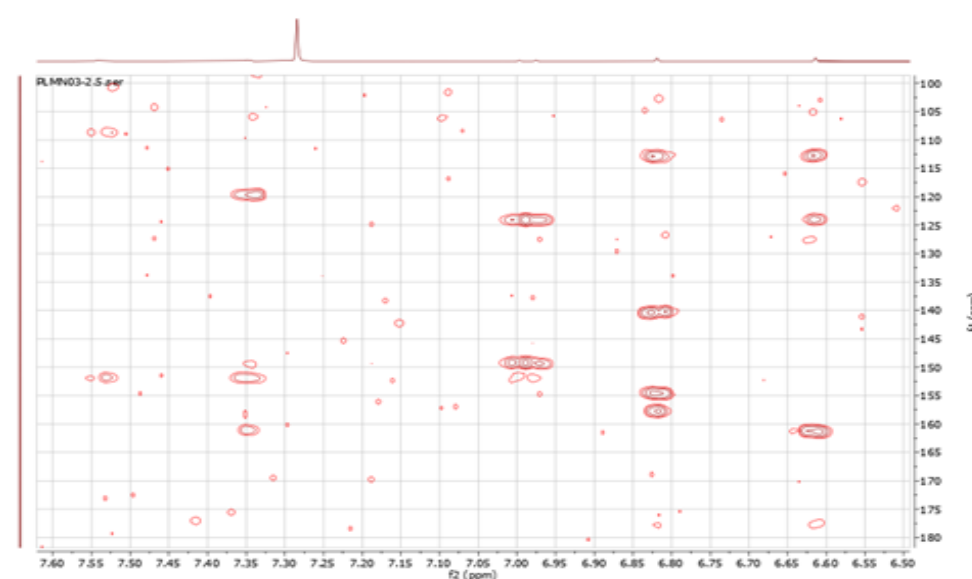
**Figura 4.12.** Fragmento del espectro HSQC de PLMN03-2 en  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz





**Figura 4.13.** Cambios químicos del  $^{13}\text{C}$  del anillo aromático derivados del espectro HSQC en  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz

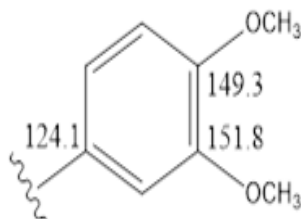
El espectro HMBC presenta correlaciones o acomplamientos a dos o más enlaces en la estructura química entre  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Como se puede observar en la Figura 4.14 el  $^1\text{H}$  a 6.98 ppm correlaciona con señales de  $^{13}\text{C}$  a 124.1, 149.3 y 151.8; el  $^1\text{H}$  a 7.35 ppm correlaciona con las señales a en  $^{13}\text{C}$  a 119.7, 149.3 y 151.8 ppm y el  $^1\text{H}$  a 7.53 ppm correlaciona con los  $^{13}\text{C}$  a 108.7 y a 151.8 ppm.



**Figura 4.14.** Fragmento del espectro HMBC de PLMN03-2 en  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz

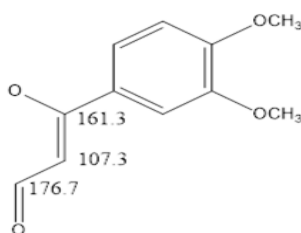
Además de estas correlaciones observadas en el HMBC, se observa en este mismo espectro (en un fragmento no mostrado) que dos metilos alrededor de 4.00 ppm en  $^1\text{H}$  acoplan con las señales de  $^{13}\text{C}$  a 149.3 y 151.8 ppm. Estas observaciones y los cambios químicos correspondientes sugieren la presencia del fragmento estructural mostrado en la Figura 4.15. Dicho fragmento es típico de las estructuras de varios flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja tal y como lo indica Inuma

*et al.* (1980) en su estudio sobre flavonoides poli sustituidos mediante resonancia magnética nuclear.



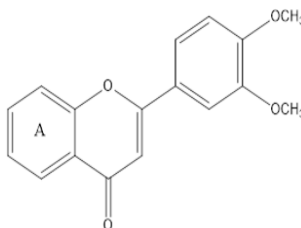
**Figura 4.15.** Fragmento estructural típico de los flavonoides obtenido del espectro HMBC de PLMN03-2 en  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz

En el fragmento del espectro HMBC presentado en la Figura 4.14 se observa además que la señal a 6.61 ppm del espectro de  $^1\text{H}$  acopla con el  $^{13}\text{C}$  a 124.1 y a 107.3 ppm, esta señal de  $^1\text{H}$  acopla a la vez en el HMBC con las señales a 176.7 y a 161.3 ppm en el espectro  $^{13}\text{C}$ , lo cual concuerda con el fragmento estructural presentado en la Figura 4.16:



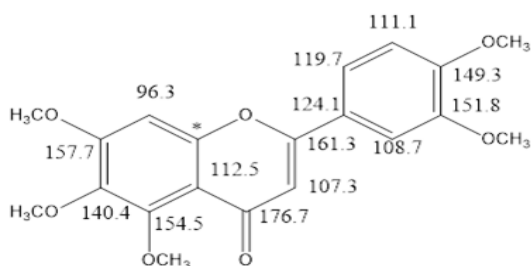
**Figura 4.16.** Fragmento estructural obtenido del espectro HMBC de PLMN03-2 en  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz

Claramente al observar dicho fragmento, todo este sistema sugiere la presencia de un flavonoide dada la muestra con la que se está trabajando, cáscaras de naranja, donde la Figura 4.17 muestra a la estructura del flavonoide.



**Figura 4.17.** Sistema estructural característico de un flavonoide

Sin embargo, en la región aromática del espectro presentado en la Figura 4.10 y su ampliación en la Figura 4.11, solo resta una señal (singulete) a 6.82 ppm que no había sido descrita previamente. La presencia de dicho singulete sugiere que el anillo denominado como "A" en la Figura 4.17 está completamente sustituido con excepción de un carbono. Del espectro HSQC se deriva que este 1H está enlazado a un 13C a 96.3 ppm como se aprecia en la Figura 4.12, y del espectro HMBC se observa que esta señal acopla con señales de 13C a 112.5, 140.4, 154.5 y 157.7 ppm como se observa en la Figura 4.14, siendo estas tres últimas señales carbonos con oxígenos enlazados debido a la ubicación de sus cambios químicos característicos observados en el espectro protónico. Los metilos alrededor de 4.0 ppm, que son un total de 5, acoplan con estos tres carbonos previamente descritos entre 140.4 y 157.7 ppm. El 13C a 140.4 ppm sugiere además que es un C-O en posición orto a otros dos C-O del sistema aromático por los cambios químicos observados. Todas estas observaciones anteriormente discutidas sugieren que la estructura del flavonoide es la mostrada en la Figura 4.18, donde se presentan los respectivos cambios de 13C.

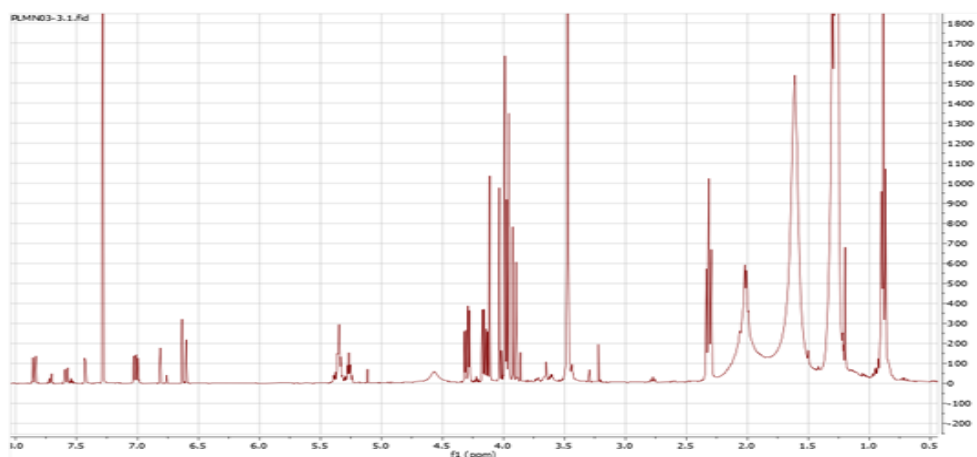


**Figura 4.18.** Flavonoide presente en el extracto PLMN03-2

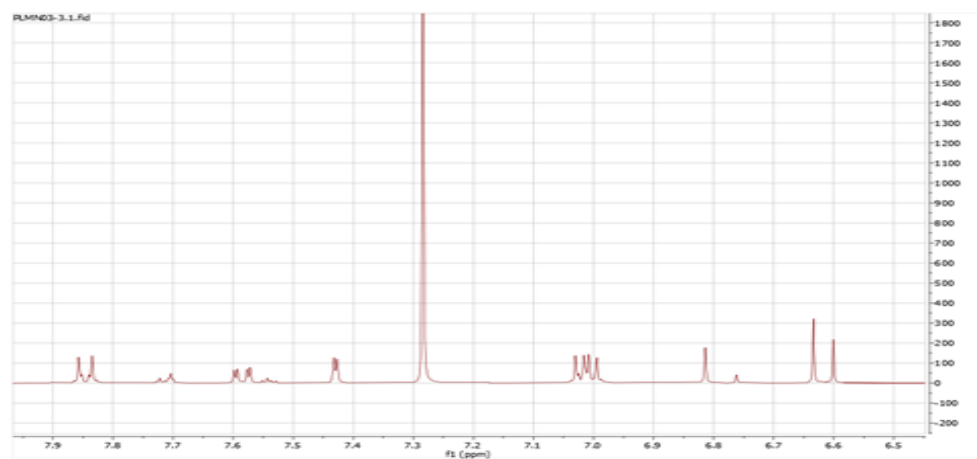
Este compuesto fue el aislado experimentalmente en primer lugar y ha sido reportado para las cáscaras de naranja, dónde recibe el nombre de Sinensetina. Los datos de 13C ya han sido previamente publicados como por ejemplo por Okuno y Miyazawa (2004) en el cual los mismos concuerdan con la estructura sugerida para los valores obtenidos experimentalmente.

En el proceso de aislamiento del compuesto PLMN03-2, se aisló otra fracción identificada como PLMN03-3, cuyo espectro 1H-RMN se presenta en la Figura 4.19, y la región aromática ampliada que se encuentra entre 6.50 y 7.90 ppm se presenta en la Figura 4.20.

En este espectro  $^1\text{H}$ -RMN de las Figura 4.19 y su ampliación en la Figura 4.20 se observan las señales previamente descritas para el compuesto PLMN03-2 y además, se observa un sistema aromático para sustituido en 7.85 y 7.02 ppm. Además, de un singulete a 6.63 ppm

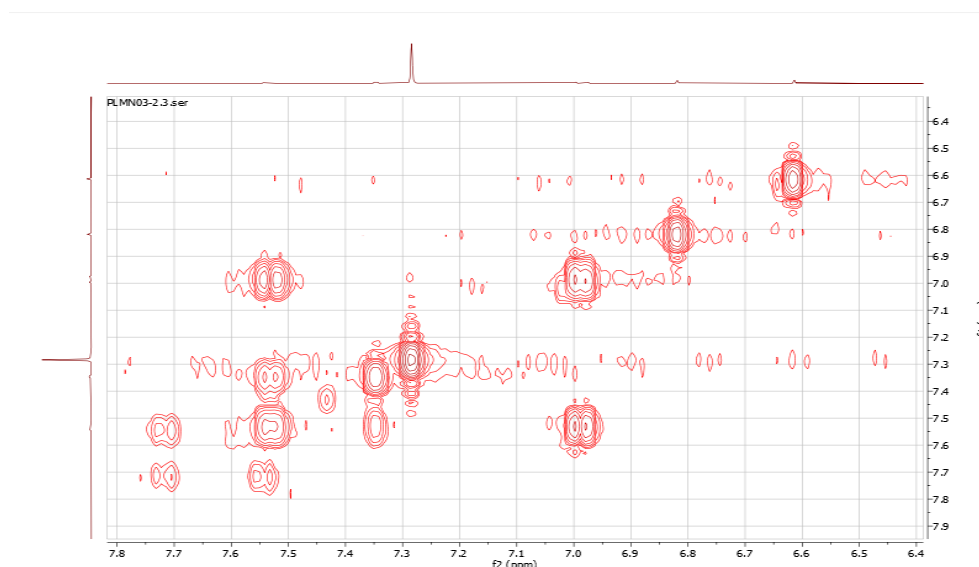


**Figura 4.19.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN 400 MHz, en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto PLMN03-3



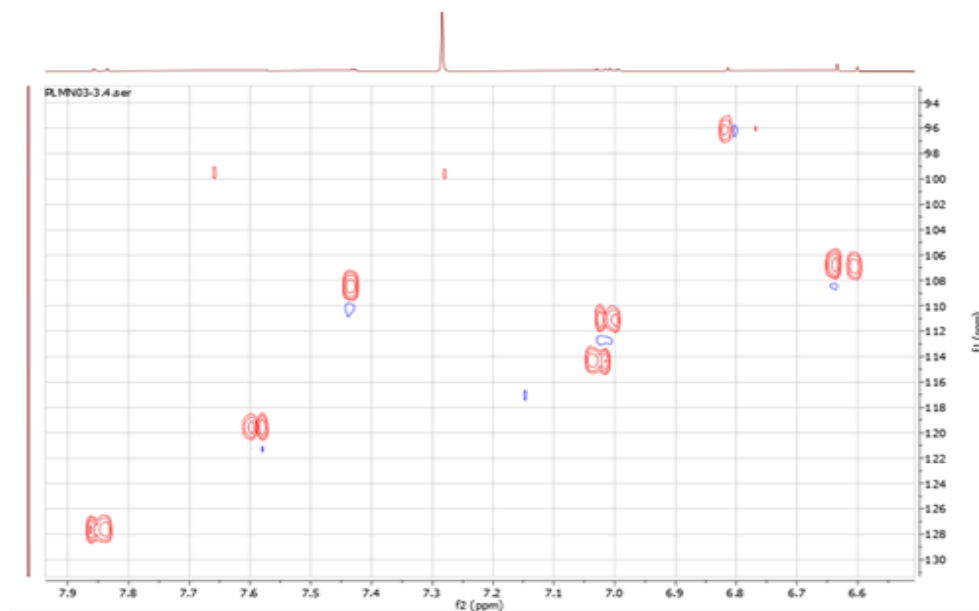
**Figura 4.20.** Ampliación del espectro  $^1\text{H}$ -RMN 400 MHz, en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto PLMN03-3

El sistema aromático para sustituido puede ser corroborado de los acoplamientos observados en el espectro  $\text{H,H}$ -COSY el cual muestra los acoplamiento homonucleares H-H, es decir, dicho espectro nos brinda información sobre que hidrógenos están acoplado a otros hidrógenos en la estructura, dicho fragmento del espectro se encuentra en la Figura 4.21.



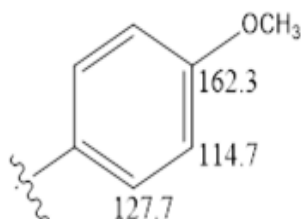
**Figura 4.21.** Fragmento del espectro H,H-COSY de PLMN03-3 en  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz

Estas señales aromáticas del sistema para sustituido acoplan en el espectro HSQC con los  $^{13}\text{C}$  de la forma siguiente: 7.85 ppm con la señal de  $^{13}\text{C}$  a 127.7 ppm y la señal de 7.02 ppm con la señal de  $^{13}\text{C}$  a 114.4 ppm, presentados en la Figura 4.22 .

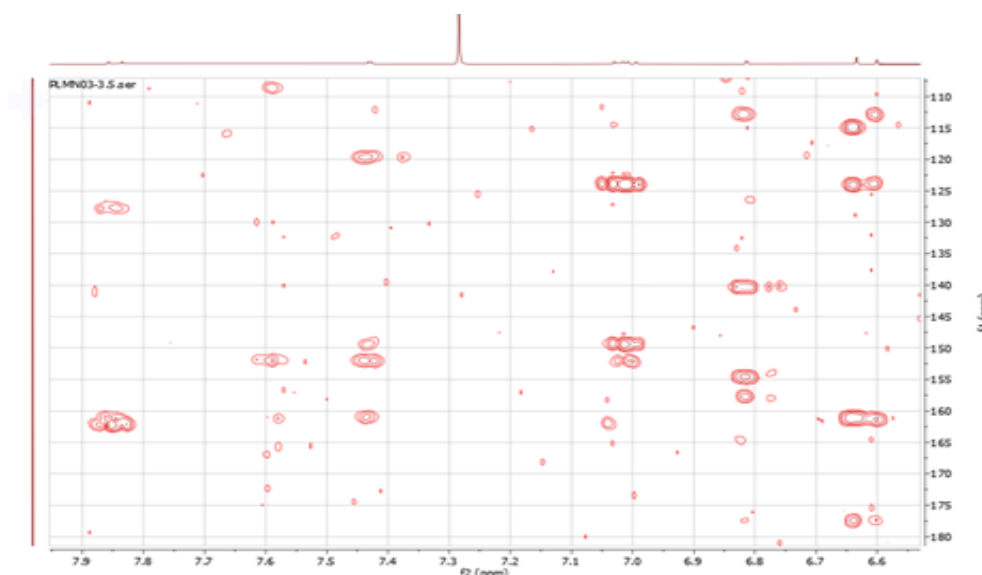


**Figura 4.22.** Fragmento del espectro HSQC de PLMN03-3 en  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz

En el espectro HMBC que se presenta en la Figura 4.24 se observa que la señal del sistema para a 7.85 ppm acopla con una señal en  $^{13}\text{C}$  a 162.1 ppm (mismo acoplamiento que presenta la señal a 7.02 ppm en el  $^1\text{H}$ -RMN). Además, la señal a 7.85 ppm acopla con otra señal en  $^{13}\text{C}$  a 127.7 ppm. Estas observaciones se presentan en el fragmento del espectro HMBC de la Figura 4.24. Del mismo espectro HMBC pero en un fragmento no mostrado se observa que un grupo metilo a 3.92 ppm acopla con el  $^{13}\text{C}$  a 162.1 ppm. Estas observaciones y los cambios químicos concuerdan con el fragmento estructural que incluye los cambios de  $^{13}\text{C}$  asignados en la Figura 4.23.



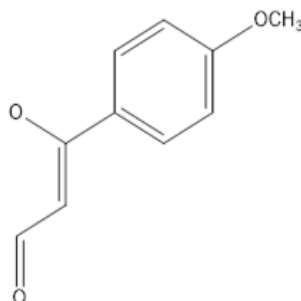
**Figura 4.23.** Fragmento estructural típico de los flavonoides obtenido del espectro HMBC de PLMN03-3 en  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz



**Figura 4.24.** Fragmento del espectro HMBC de PLMN03-3 en  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz

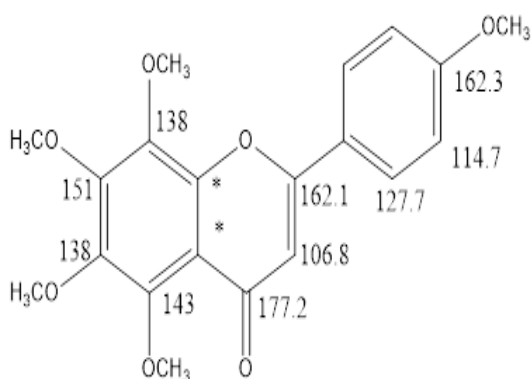
El singulete a 6.63 ppm presenta como se observa en el fragmento del espectro HMBC (Figura 4.24) un patrón de acoplamientos similares en el HMBC a la señal a

6.61 ppm del compuesto PLMN03-2, lo que dicta el siguiente fragmento estructural, referenciando todos los detalles previamente discutidos para dicha fracción.



**Figura 4.25.** Fragmento estructural obtenido del espectro HMBC de PLMN03-3 en  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz

Dado que este patrón es típico para la estructura de un flavonoide, se plantea que estos fragmentos pertenecen a un flavonoide. Sin embargo, no se observan más señales aromáticas en el espectro  $^1\text{H}$ -RMN. Estas observaciones sugieren que el anillo "A" del flavonoide se encuentra totalmente sustituido. En el fragmento del espectro  $^1\text{H}$ -RMN de la región de los metoxilos, se observa la presencia de varios metoxilos, y estos acoplan en el HMBC (no se muestra el fragmento del espectro) con señales en  $^{13}\text{C}$  entre 140 y 160 ppm. Estas observaciones sugieren que la estructura del compuesto (que no se encuentra puro) de la fracción PLMN03-3 es la mostrada en la Figura 4.26



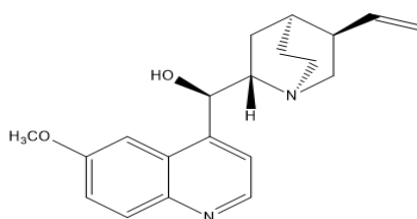
**Figura 4.26.** Flavonoide presente en el extracto PLMN03-3

El compuesto ha sido previamente reportado por Inuma *et al.* (1980) y a pesar de que el compuesto no fue aislado de manera pura ya que como se logra observar

en la Figura 4.20 se presentan señales características del compuesto presente en la fracción identificada como PLMN03-02; los cambios químicos de  $^{13}\text{C}$  reportados, concuerdan con los obtenidos en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN como se muestra en la Figura 4.26 con los datos medidos.

Los datos con un decimal fueron derivados del HMBC y los valores en \* no pudieron ser asignados de manera definitiva, sin embargo, con los datos presentados se corrobora la estructura del compuesto denominado Tangeretina.

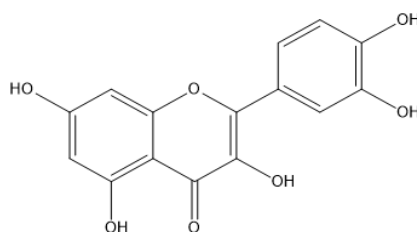
Con respecto a la cuantificación de los polifenoles en DMSO- $d_6$ , mediante resonancia magnética nuclear para las extracciones realizadas, se utilizó quinina como patrón en el espectro protónico gracias a que este presenta señales que no superponen al compuesto cuantificado, la estructura química de dicho compuesto se muestra en la Figura 4.27.



**Figura 4.27.** Estructura química de la quinina.

El compuesto cuantificado en el extracto que se identificó como SMN01 fue la quercetina debido a que según Olufunmilayo *et al.* (2015) es de los compuestos mayoritarios presentes en las cáscaras de la naranja maduras y de acuerdo a los espectros protónicos obtenidos para todas las corridas experimentales presentados en la Figura 5.8 los picos de una pronunciación mayor alrededor de 6.12 ppm son característicos del compuesto de interés. La estructura química de dicha sustancia se presenta en la Figura 4.28





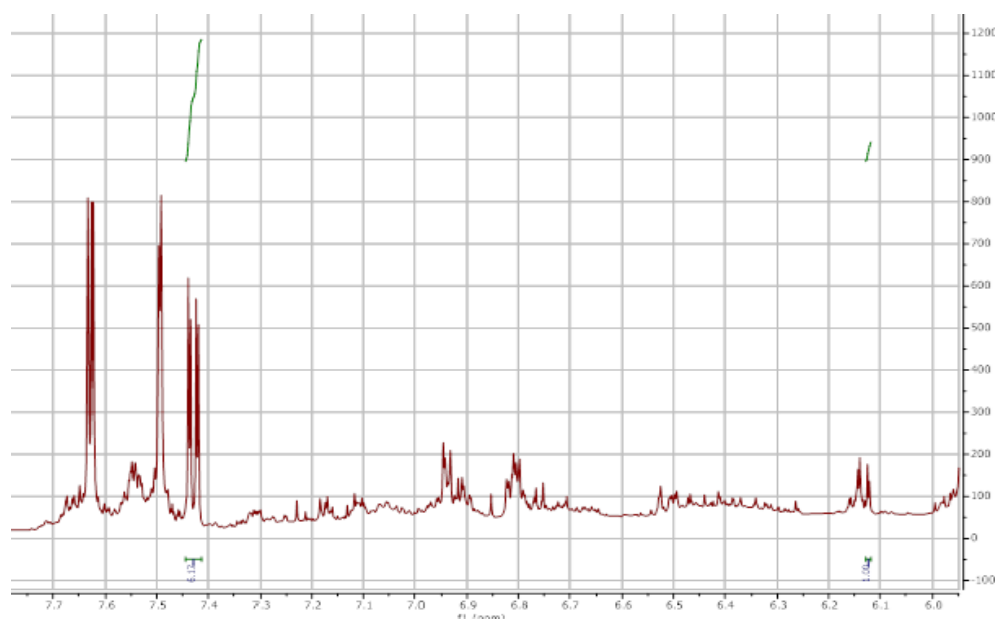
**Figura 4.28.** Estructura química de la quercetina.

Los resultados de quercetina obtenidos en las cáscaras de naranja se presentan en el Cuadro 4.3, la cantidad obtenida de dichos polifenoles depende principalmente del tipo de cultivo en que se desarrolle el fruto, las condiciones climáticas de la región de producción, las técnicas agronómicas utilizadas y en una gran manera de la maduración que presenta el fruto (Olufunmilayo *et al.*, 2015).

**Cuadro 4.3.** Cuantificación de quercetina/quercitrina obtenida mediante resonancia magnética nuclear en 100.3440 gramos de cáscaras.

Muestra	Masa quercetina/quercitrina (mg)
1	3.89
2	3.76
3	3.59

Para dicho extracto se realizó la cuantificación por deconvolución de áreas correspondientes a los protones en la zonas de 6.11 ppm y 7.45 ppm del espectro 1H-RMN mostrado en la Figura 4.29. Dado que la quercetina fue identificada sin dificultad con el RMN, se toma la señal a 6.12 ppm que corresponde a un H de la quercetina y la señal a 7.43 ppm que corresponde a un H de la quinina y se integran ambas señales en el mismo espectro, una relativa a la otra, Una vez integradas ambas señales, se hace una corrección por peso molecular. Dado que la quinina se agregó a la muestra en cantidad medida en balanza analítica, se puede calcular la cantidad de quercetina presente en el extracto y en la masa de cáscaras de naranja extraídas.

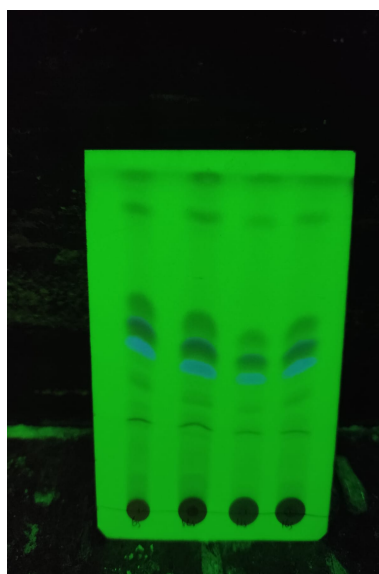


**Figura 4.29.** Fragmento del espectro  $^1\text{H}$ -RMN 400 MHz, en DMSO- $d_6$  del extracto SMN01.

De manera análoga se realizó el mismo procedimiento para las variaciones de masa inicial de quinina utilizadas que se muestran en el Cuadro A.5, donde lo único que varía en estos casos es el valor de la integral proporcionado por el programa debido a que se aumenta la masa inicial del patrón y por ende los picos en el espectro protónico incrementarán. Los espectros  $^1\text{H}$ -RMN para las muestras 2 y 3, se presentan en la sección de anexos y se identifican como Figura 5.10 y Figura 5.11 respectivamente.

Para corroborar la presencia de los compuestos fenólicos, pues son estos los que le dan un valor agregado a los residuos de cáscaras de naranjas utilizados en los extractos obtenidos en el Cuadro 4.1 mediante los espectros de resonancia magnética nuclear, de una manera simple, rápida y económica se realizaron cromatografías de capa fina ascendente en gel de sílice con revelador F254 bajo lámpara ultravioleta para cada una de las extracciones realizadas. Se comprueba la presencia de distintos compuestos fenólicos tal y como se muestra en la Figura 4.30, ya que según el tipo estructural de flavonoide que se encuentre presente en las distintas secciones de la placa se revelan bajo luz ultravioleta en colores como amarillo oscuro, verde o azul (Andersen y Markham, 2006). Por otro lado la presencia de bandas coloreadas bajo la lámpara ultravioleta para los extractos analizados confirma la presencia de

los flavonoides (Tenorio, 2016). No se caracteriza con ayuda de la cromatografía de capa fina ascendente, ya que este trabajo se realizó con ayuda de la resonancia magnética nuclear, el cuál es un método más certero y no necesita de patrones para la comparación de los extractos contra estos, sin embargo, de acuerdo a Urška *et al.* (2018) la presencia de los compuestos fenólicos en los extractos utilizando la misma longitud de onda es evidente por sus bandas coloreadas tal y como se observa en la Figura 4.30.



**Figura 4.30.** Cromatograma de polifenoles en gel de sílice revelados bajo lámpara ultravioleta a 254 nm.

### **4.3 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante ultrasonido de las cáscaras de la naranja por el método DPPH**

Las reacciones de oxidación son aquellas que implican el desplazamiento de electrones entre especies que posean muchos electrones, producen radicales libres los cuales son especies reactivas de oxígeno que pueden llegar a dañar gran cantidad de biomoléculas de la célula, como por ejemplo: ADN, ARN, proteínas, etc. Las cáscaras de frutos cítricos, en este caso en específico la naranja dulce, se caracteriza por poseer gran cantidad de antioxidantes naturales. Esta materia prima contiene

fenoles y flavonoides como hesperidina, narirutina, tangeretin, entre otros que participan en la donación de protones o electrones para estabilizar a los radicales libres (Singh *et al.*, 2020).

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos para las condiciones óptimas, se utilizó el método DPPH el cual se basa en la transferencia de electrones. Los resultados para dichos extractos se muestran en el Cuadro 4.4

**Cuadro 4.4.** Capacidad antioxidante de los extractos para los puntos óptimos del diseño de experimentos mediante el método DPPH.

Repetición del punto óptimo	Capacidad antioxidante $IC_{50}$ (mg extracto/ L)
1	447.97
2	437.57
3	404.29
4	399.16

Con los resultados obtenidos en el Cuadro 4.4 se puede observar una fuerte correlación entre la cantidad total de polifenoles presentes en los extractos mostrados en el Cuadro 4.2, ya que se indicó que poseían una mayor cantidad de compuestos fenólicos con respecto a distintos autores, lo que se esperaría entonces en este caso al tener una mayor cantidad de estos es que la capacidad antioxidante también fuera mejor a los datos reportados por otros autores. Se tiene un promedio de actividad antioxidante mediante DPPH de 422.25 mg extracto/ L, mientras que según Singh *et al.* (2020) se obtuvo un valor de 570 mg extracto/ L y Lagha-Benamrouche y Madani (2013) reportó un valor de 568 mg extracto/ L para las cáscaras de naranja de la especie *Citrus sinensis*. Un valor menor en la actividad antioxidante indica una gran capacidad inhibidora al radical DPPH, es decir, se necesita una menor cantidad de los antioxidantes para inhibir en un 50% la acción de dicho radical, por lo que los extractos etanólicos obtenidos poseen una mayor actividad antioxidante respecto a valores reportados previamente.

La variación en estos valores se debe principalmente al tratamiento previo a la extracción que posea la materia prima, ya que si esta es secada la piel de la cáscara sufre la pérdida del contenido de agua y reduce el volumen lo que hace que se dé

una extracción más eficiente, además de reducir el riesgo de crecimiento bacteriano en la materia prima, las condiciones de almacenamiento y el proceso de extracción al que se someta la cáscara ya que estos tienen distintos métodos de funcionamiento y porcentajes de rendimiento (Singh *et al.*, 2020) (Sok *et al.*, 2018).



## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ☞ Se determinó que las condiciones óptimas en la zona de trabajo para la extracción ultrasónica de polifenoles de las cáscaras de la naranja (*Citrus sinensis*) son: concentración de etanol 76.59 %v/v, temperatura del baño ultrasónico 34.55 °C y un ratio solvente sólido de 15.42 mL/g.
- ☞ Mediante resonancia magnética nuclear se logró identificar en la fracción identificada como PLMN03-2 la presencia de un flavonoide con alto grado de pureza en las cáscaras de naranja, denominado Sinensetina.
- ☞ Con ayuda de resonancia magnética nuclear se determinó la presencia de una de las sustancias polifenólicas características de los frutos cítricos como lo es la Tangeretina.
- ☞ Se cuantificó mediante resonancia magnética nuclear uno de los polifenoles mayoritarios presentes en las cáscaras de la naranja (quercetina/quercitrina), obteniendo una masa promedio de 3.75 mg por cada 100.3440 g de cáscara de naranja.
- ☞ Las cáscaras de la naranja al poseer una cantidad importante de compuestos fenólicos con actividad antioxidante los cuales pueden ser recuperados mediante extracciones ultrasónicas son una fuente prometedora para sus usos en distintas industrias.
- ☞ El método DPPH muestra valores altos para los extractos en las condiciones óptimas de extracción con un promedio de 422.25 mg extracto/ L, lo que indica el valor potencial antioxidante de estos extractos.
- ☞ Los extractos etanólicos obtenidos mediante una extracción ultrasónica presentan un alto contenido de polifenoles totales cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu en comparación a otros autores, con un resultado promedio de 43.25 mg GAE/g muestra.
- ☞ El valor de contenido de polifenoles totales para las condiciones óptimas del

modelo predicho se ajusta de manera adecuada a los obtenidos experimentalmente, con una discrepancia promedio en los datos de aproximadamente 2.6%.

☞ Para el proceso de extracción vía ultrasonido de las cáscaras de la naranja, se observó que solamente el término cuadrático de temperatura es significativo para la obtención de los compuestos fenólicos.

- Se recomienda realizar el estudio con extractos cítricos obtenidos con una materia prima distinta a las cáscaras de la naranja (hojas de naranja, pulpa o semillas) para determinar las propiedades antioxidantes de estas y las condiciones óptimas de extracción.
- Se recomienda realizar un nuevo diseño de superficie de respuesta utilizando como punto central los factores que generan la mejor combinación dentro del rango analizado para identificar un óptimo de operabilidad.
- Se recomienda utilizar otro tipo de disolvente en la extracción ultrasónica para determinar las condiciones óptimas de extracción y la cantidad total de polifenoles a dichas condiciones.
- Se recomienda realizar un tratamiento previo de secado a la materia prima para determinar si existen diferencias entre los resultados de cantidad total de polifenoles mediante Folin-Ciocalteu para las cáscaras pre calentadas o frescas.



# NOMENCLATURA

## Acrónimos

<i>CCF</i>	Cromatografía de capa fina ascendente	adim
<i>CDCl<sub>3</sub></i>	Cloroformo deuterado	adim
<i>DCC</i>	Diseño central compuesto	adim
<i>DMSO – d<sub>6</sub></i>	Dimetilsulfóxido deuterado	adim
<i>DPPH</i>	2,2 difenil-1-picrihidracil	adim
<i>fac</i>	Factor de integración	adim
<i>GAE</i>	Equivalentes de ácido gálico	adim
<i>HMBC</i>	Espectroscopía de correlación heteronuclear de múltiples enlaces	adim
<i>HPLC</i>	Cromatografía líquida de alta eficiencia	adim
<i>HSQC</i>	Espectroscopía de correlación heteronuclear de un único cuanto	adim
<i>IC</i>	Concentración inhibidora máxima media	adim
<i>MSR</i>	Metodología superficie de respuesta	adim
<i>RMN</i>	Resonancia Magnética Nuclear	adim
<i>UV</i>	Ultravioleta	adim

## Griegas

$\alpha$	Posición en el estado de energía	adim
$\beta$	Posición en el estado de energía	adim

## Mayúsculas

<i>C</i>	Concentración de etanol	%v/v
<i>Pt</i>	Polifenoles totales	mgGAE/gmuestra
<i>R</i>	Grupos sustituyentes de los compuestos fenólicos	adim
<i>T</i>	Temperatura del baño ultrasónico	°C
<i>C</i>	Masa molar	g/mol

## Minúsculas

<i>m</i>	Masa de cáscara	g
----------	-----------------	---

## Subíndices

cáscara	Refiérase a cáscaras de la naranja
dsln	Refiérase a disolución

EtOH Refiérase a etanol

integración Refiérase a valor de la integral

quercetina refiérase a quercetina

quinina Refiérase a quinina

Solid Refiérase a sólido

Solv Refiérase a solvente

## BIBLIOGRAFÍA

- Acebedo, G. (2018). *Evaluación del comportamiento agro morfológico en cultivo establecido de Citrus sinensis (naranja) a la aplicación de fertilización edáfica y foliar*. Tesis doctoral.
- Andersen, O. y Markham, K. (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Taylor Francis Group.
- Andres, A. I., Petron, M. J., Lopez, A. M., y Timon, M. L. (2020). Optimization of extraction conditions to improve phenolic content and in vitro antioxidant activity in craft brewers' spent grain using response surface methodology (RSM). *Foods*, 9(10):1–15.
- Araya, J. (2001). Acciones de prevención contra la leprosis de los cítricos en Costa Rica. (62):81–84.
- Arias, L., Retana, J., Torres, D., y Peña, L. (2018). Los nuevos frutos de oro. Aparato productivo de piña y naranja en la Zona Norte, Costa Rica. (1974-2015). *Revista Rupturas*, pp. 101–129.
- Bellete, B. S., Ramin, L. Z., Porto, D., Ribeiro, A. I., Forim, M. R., Zuin, V. G., Fernandes, J. B., y Silva, M. F. G. (2018). An environmentally friendly procedure to obtain flavonoids from Brazilian citrus waste. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(5):1123–1129.
- Cartaya, O. y Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2):5–14.
- Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Belbahi, A., Aoun, O., Spigno, G., y Madani, K. (2014). Optimization conditions of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Citrus sinensis L. peels using response surface methodology. *Chemical engineering transactions*, 37(10):889–894.
- Damián, A. A., González, J. C., y Chávez, M. D. C. (2016). Procedimientos actuales

- para la extracción y purificación de flavonoides cítricos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1).
- Esquivel, A. y Vargas, P. (2007). Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en Marcha*, 20(4):41–50.
- Franco, G. (2019). Valorización de la cáscara de cítricos como fuente de antioxidantes para la industria alimentaria mediante el empleo de procesos de extracción no convencionales. *Ingeniería Química y Ambiental*, p. 121.
- García Martínez, E., Fernández Segovia, I., y Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. *Universitat Politècnica de València*, p. 9.
- González, L. (2021). Alternativas de aprovechamiento de los residuos en la agroindustria.
- Gutiérrez, H. y De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*, volumen 7.
- Herrera, J., Rojas, J., y Anchia, D. (2016). Generation Rates and Characterization of Ordinary Solid Waste in Four Municipalities of the Metropolitan Area Costa Rica. *Revista Geografica De America Central*, (57):235–260.
- Herrera, Y. (2011). Actividad antioxidante in vitro y toxicidad frente a *Artemia salina* de extractos hidroalcohólicos de cinco especies de cítricos.
- Iinuma, M., Matsuura, S., y Kusuda, K. (1980).  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectral studies on Polysubstituted flavonoids. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, (43):2091.
- Jayaprakasha, G. K. y Patil, B. S. (2014). Quantification of health-promoting compounds by quantitative  $^1\text{H}$ NMR spectroscopy. *ACS Symposium Series*, 1185:289–302.

- Kumar, K., Srivastav, S., y Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70.
- Lagha-Benamrouche, S. y Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50:723–730.
- Londoño, J. A. (2010). Aprovechamiento de residuos de la agroindustria de cítricos : extracción y caracterización de flavonoides. *Corporacion Universitaria Lasallista*, 21:395–416.
- MAG (2012). Cadena Agroalimentaria de Cítricos. pp. 1–98.
- Murillo, R., Navarro, M., Moreira, I., Arnáez, E., Rivera, W., Zamora, W., Saravia, A. Y., y Vargas, F. (2017). Estudio preliminar del contenido polifenólico y capacidad antioxidante de la especie *Malus domestica* cultivada en Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 30(1):3.
- Nishad, J., Saha, S., y Kaur, C. (2019). Enzyme- and ultrasound-assisted extractions of polyphenols from *Citrus sinensis* (cv. Malta) peel: A comparative study. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(8):1–13.
- Okuno, Y. y Miyazawa, M. (2004). Biotransformation of sinesetin by the larvae of the common cutworm (*Spodoptera litura*). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(8):1289–1292.
- Olufunmilayo, S., Olajumoke, R., Ola, S., Augusti, A., y Linde, M. (2015). HPLC-DAD phenolic characterization and antioxidant activities of ripe and unripe sweet orange peels. *Antioxidants*, 4(3):498–512.
- Pavia, D., Lampman, G., y Kriz, G. (2001). Introduction to spectroscopy.
- Ramsey, E. (2012). Analytical Supercritical Fluid Extraction Techniques.
- Rodríguez, L., Pulido, N. A., y Alba, J. A. (2011). Formulación de néctar de marañón (*Anacardium Occidentale* L.) usando la metodología de superficie de respuesta

- para optimizar la aceptación sensorial y la actividad antioxidante. *Revista de la Asociación Colombiana de ciencia y Tecnología de Alimentos*, 20(24):47–52.
- Romo, L., Melio, S., Alvarez, H., y Salamanca, G. (2008). Ciencia y tecnología. VII(2).
- Salazar, N. (2019). No Validación de la técnica de DPPH-CLAR como método para la actividad antioxidante de metabolitos secundarios hidrofílicos extraídos de actinobacterias. pp. 1–9.
- Sharma, K., Mahato, N., y Lee, Y. R. (2018). Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Reviews in Chemical Engineering*, 35(2):265–284.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., y Singh, N. (2020). Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Research International*, 132(February):109114.
- Sok, L., Wan, H., Swee, Y., y Shaiful, S. (2018). Phytochemical composition and in vitro antioxidant activities of Citrus sinensis peel extracts. *PeerJ*, 2018:1–16.
- Tarazona, N. (2016). *Aislamiento de la hesperidina a partir de extractos etanólicos obtenidos de cáscaras de mandarina y evaluación de su actividad antioxidante*. Tesis doctoral.
- Tenorio, M. (2016). Flavonoids extracted from orange peelings tangelo (Citrus reticulata x Citrus paradisi) and their application as natural antioxidant in sachu inchi (Plukenetia volubilis) vegetable oil. *Scientia Agropecuaria*.
- Toledo, A. (2009). *Obtención de compuestos bioactivos de cáscaras de naranja (Citrus sinensis) mediante la extracción con dióxido de carbono supercrítico*. Tesis doctoral.
- Tovar, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera*.

- Tranquilino, E., Martínez, H. E., Rodiles, J. O., Figueroa, J. D. D., y Pérez, R. E. (2020). Optimization in the extraction of polyphenolic compounds and antioxidant activity from *Opuntia ficus-indica* using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(6):1–12.
- Ullauri, P. (2010). Transporte de masa en extracción fase sólido-líquido.
- Urango, K. J., Ortega, F., Vélez, G., y Pérez, Ó. (2018). Extracción rápida de Pectina a partir de cáscara de Maracuyá (*Passiflora edulis flavicarpa*) empleando microondas. *Informacion Tecnologica*, 29(1):129–136.
- Urška, J., Glavnik, V., Kranjc, E., y Vovk, I. (2018). HPTLCdensitometric and HPTLCMS methods for analysis of flavonoids. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 41(6):329–341.
- Wankat, P. (2008). *Ingeniería de procesos de separación*. Pearson Educación, México, segunda edición.





# APÉNDICES

## A DATOS EXPERIMENTALES

**Cuadro A.1.** Masa de cáscaras utilizadas y del extracto seco obtenido en la extracción de flavonoides vía ultrasonido para el diseño de experimentos.

Orden estándar de corrida	Masa cáscara (g)	Masa extracto seco (g)
6	25.0595	0.4380
12	25.0508	0.5037
10	25.0193	0.2955
11	25.0443	0.4066
16	25.0551	0.3446
3	25.0783	0.1781
2	25.0098	0.4658
4	25.0167	0.4790
15	25.0528	0.3620
5	25.0302	0.2215
17	25.0291	0.1365
1	25.0512	0.2988
9	25.0424	0.4907
13	25.0081	0.3224
7	25.0257	0.5155
18	25.0994	0.1787
8	25.0146	0.3269
14	25.0069	0.3422

**Cuadro A.2.** Masa de cáscaras utilizadas y del extracto seco obtenido en la extracción de flavonoides vía ultrasonido para las repeticiones del punto óptimo del diseño de experimentos.

Repetición del punto óptimo	Masa cáscara (g)	Masa extracto seco (g)
1	25.0304	0.1559
2	25.0223	0.1524
3	25.0537	0.1893
4	25.0235	0.1603

**Cuadro A.3.** Volumen de la disolución y etanol 95% para las extracciones ultrasónicas de acuerdo a la concentración requerida.

Orden estándar de corrida	Volumen Etanol (mL)	Volumen Disolución (mL)
6	474	500
12	336	375
10	369	375
11	336	375
16	336	375
3	211	250
2	237	250
4	237	250
15	336	375
5	421	500
17	336	375
1	211	250
9	302	375
13	147	165
7	421	500
18	336	375
8	477	500
14	524	585

**Cuadro A.4.** Volumen de la disolución y etanol 95% para las extracciones ultrasónicas del punto óptimo del diseño de experimentos.

	Volumen Etanol (mL)	Volumen Disolución (mL)
Punto óptimo	311	386

**Cuadro A.5.** Masas de quinina utilizadas para la cuantificación de quercetina mediante resonancia magnética nuclear.

Muestra	Masa quinina (g)
1	0.0258
2	0.0305
3	0.0354

**Cuadro A.6.** Detalle del diseño de experimentos para la extracción de flavonoides presentes en las cáscaras de la naranja.

Orden estándar	Orden corrida	Punto central	Bloque	Concentración Etanol		Temperatura (°C)	Ratio solvente/sólido (mL/g)
				(%V/V)	(mL/g)		
6	1	1	1	90	20	30	20
12	2	-1	1	85	15	70	15
10	3	-1	1	93	15	45	15
11	4	-1	1	85	15	20	15
16	5	0	1	85	15	45	15
3	6	1	1	80	10	60	10
2	7	1	1	90	10	30	10
4	8	1	1	90	10	60	10
15	9	0	1	85	15	45	15
5	10	1	1	80	20	30	20
17	11	0	1	85	15	45	15
1	12	1	1	80	10	30	10
9	13	-1	1	77	15	45	15
13	14	-1	1	85	7	45	7
7	15	1	1	80	20	60	20
18	16	0	1	85	15	45	15
8	17	1	1	90	20	60	20
14	18	-1	1	85	23	45	23

## B RESULTADOS INTERMEDIOS

**Cuadro B.1.** Polifenoles totales obtenidos mediante el método de Folin-Ciocalteu para las extracciones realizadas.

Orden estándar de corrida	Polifenoles totales (mg GAE/g muestra)
6	46.58
12	30.32
10	39.57
11	31.34
16	54.64
3	26.95
2	38.60
4	45.21
15	55.14
5	49.26
17	46.78
1	48.76
9	73.84
13	46.55
7	28.17
18	54.79
8	32.38
14	29.66

**Cuadro B.2.** Polifenoles totales obtenidos mediante el método de Folin-Ciocalteu para los puntos óptimos del diseño de experimentos.

Repetición del punto óptimo	Polifenoles totales (mg GAE/g muestra)
1	62.83
2	72.83
3	65.85
4	67.50

**Cuadro B.3.** Capacidad antioxidante de los extractos para los puntos óptimos del diseño de experimentos mediante el método DPPH.

Repetición del punto óptimo	Capacidad antioxidante $IC_{50}$ (mg extracto/ L)
1	447.97
2	437.57
3	404.29
4	399.16

**Cuadro B.4.** Cuantificación de quercetina obtenida mediante resonancia magnética nuclear en 100.3440 gramos de cáscaras secas.

Muestra	Masa quercetina (mg)
1	3.89
2	3.76
3	3.59

## C MUESTRA DE CÁLCULO

### C.1. Cálculo de la cantidad de disolución final en las distintas extracciones:

Para el cálculo del volumen total de disolución se utiliza la fórmula:

$$V_{dsln} = m_{cascara} * Ratio_{Solv/Solid} \quad (C.1)$$

Utilizando los valores del Cuadro A.6, fila 1, columna 7 y los valores del Cuadro A.2 fila 1 columna 2:

$$V_{dsln} = 25.0595 * 20 = 500mL$$

Resultado que se encuentra tabulado en el Cuadro A.3, fila 1, columna 3. El mismo cálculo se llevó a cabo para obtener el volumen final de disolución para las distintas condiciones de extracción del Cuadro A.3.

### C.2. Cálculo de la cantidad de volumen de etanol 95% utilizado en las distintas extracciones:

Para el cálculo del volumen de etanol 95% agregado se utiliza la fórmula:

$$V_{EtOH} = \frac{C_{EtOH} * V_{dsln}}{100 * Pureza_{EtOH}} \quad (C.2)$$

Utilizando los valores del Cuadro A.6, fila 1, columna 5 y los valores del Cuadro A.3 fila 1 , columna 3:

$$V_{EtOH} = \frac{90 * 500}{100 * 0.95} = 474mL$$

Resultado que se encuentra tabulado en A.3, fila 1, columna 2. El mismo cálculo se llevó a cabo para obtener el volumen de etanol para las distintas condiciones de extracción del Cuadro A.3.

### C.3. Cuantificación de quercetina mediante resonancia magnética nuclear:

Para el cálculo de la cantidad de quercetina presente en los extractos mediante resonancia magnética nuclear se utiliza la siguiente fórmula:

$$quercetina = m_{quinina} * \frac{1}{MM_{quinina}} * fac_{integracion} * \frac{1}{Valor_{integral}} * MM_{quercetina} \quad (C.3)$$

Utilizando los valores del Cuadro A.5, fila 1 columna 2:

$$quercetina = 0.0258 * \frac{1}{324.42} * 1 * \frac{1}{6.17} * 302.24 = 3.89mg \quad (C.4)$$

Resultado que se encuentra tabulado en el Cuadro B.4, fila 1, columna 2. El mismo cálculo se llevó a cabo para obtener las masas reportadas en el Cuadro B.4.

## ANEXOS



**Figura 5.1.** Sistema de extracción utilizado para la obtención de compuestos fenólicos de las cáscaras de la naranja vía ultrasonido.



**Figura 5.2.** Sistema de filtración para las extracciones ultrasónicas de compuestos polifenólicos.



**Figura 5.3.** Extractos concentrados de las cáscaras de naranja.

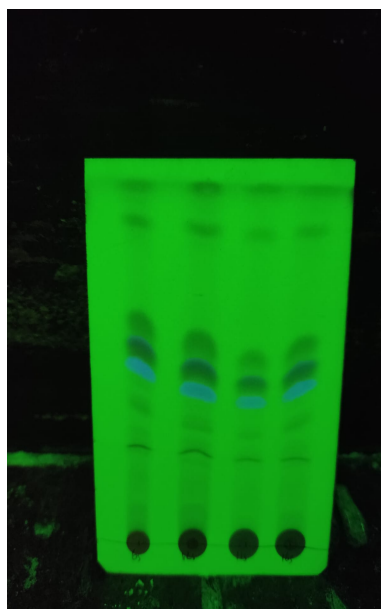


**Figura 5.4.** Viales con los extractos de las cáscaras de naranja con concentración conocida para las pruebas de Folin- Ciocalteu y DPPH.





**Figura 5.5.** Sistema de cromatografía capa fina ascendente en gel de sílice.



**Figura 5.6.** Cromatograma de polifenoles en gel de sílice revelados bajo lámpara ultravioleta a 254 nm.

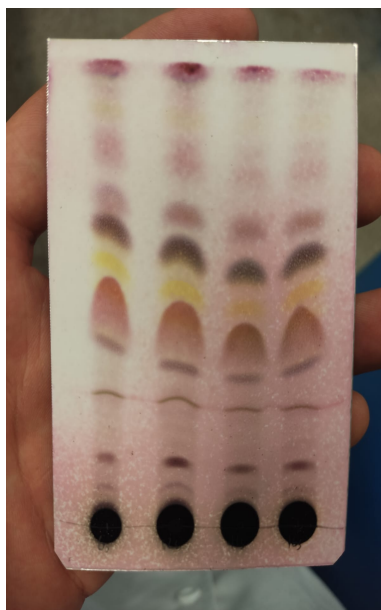


Figura 5.7. Cromatograma de polifenoles revelado con vanilina.

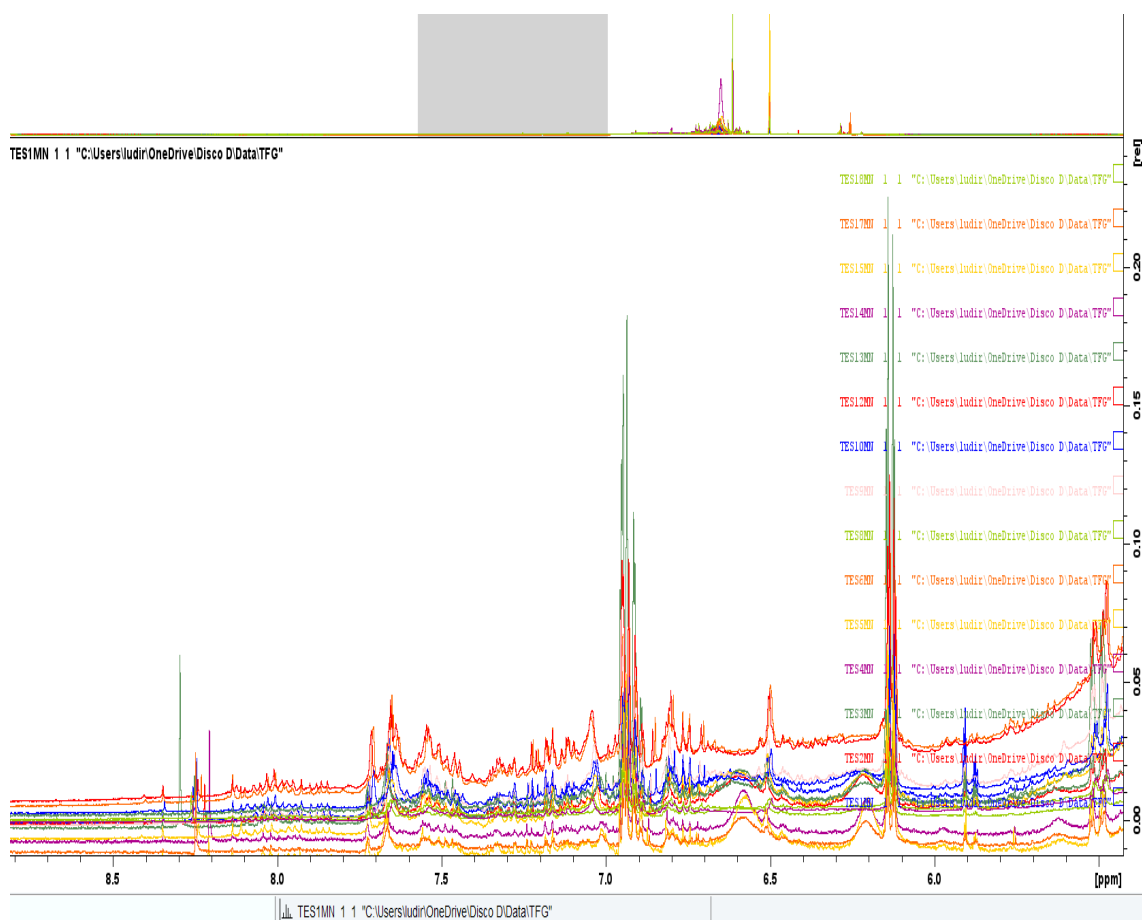
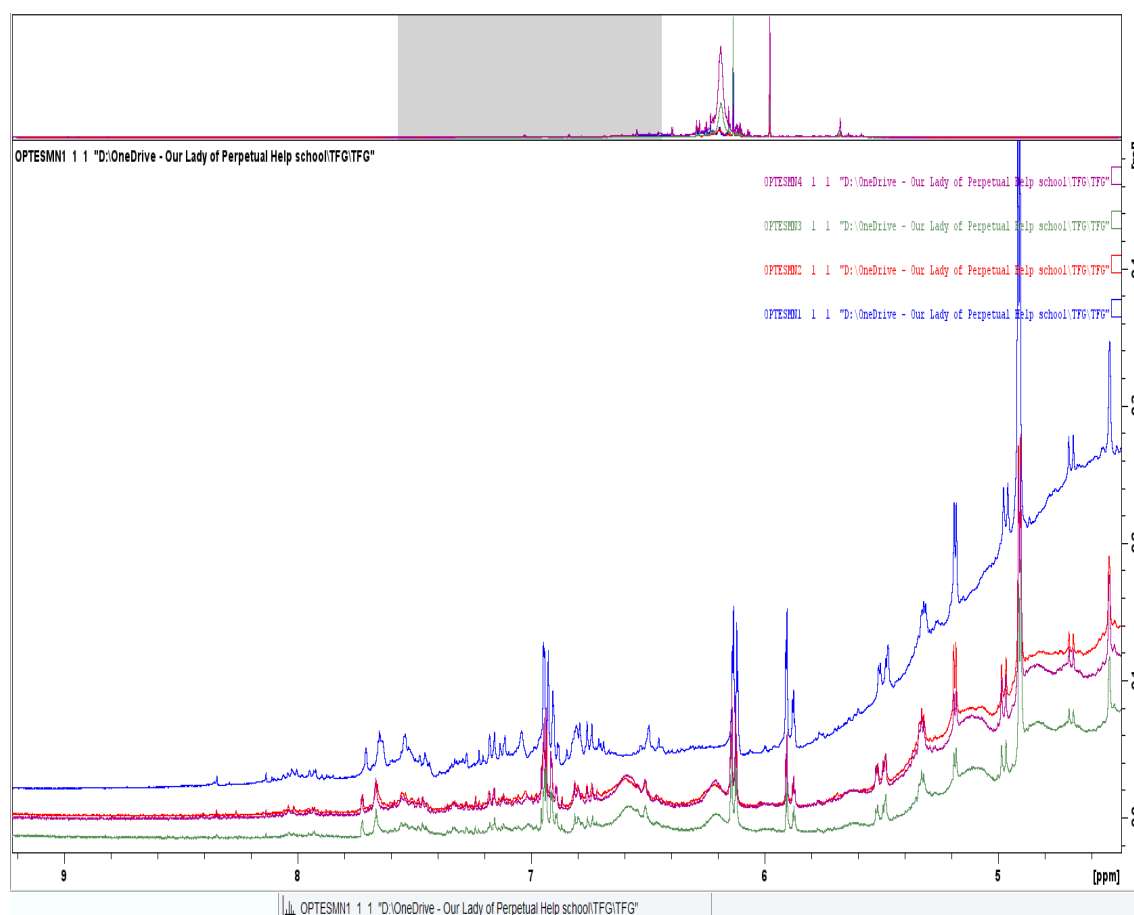
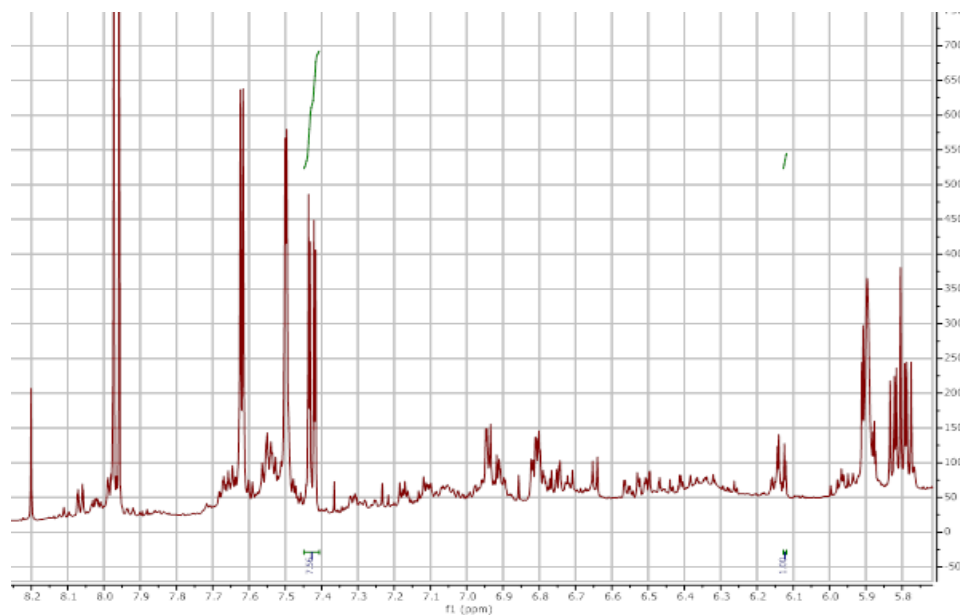


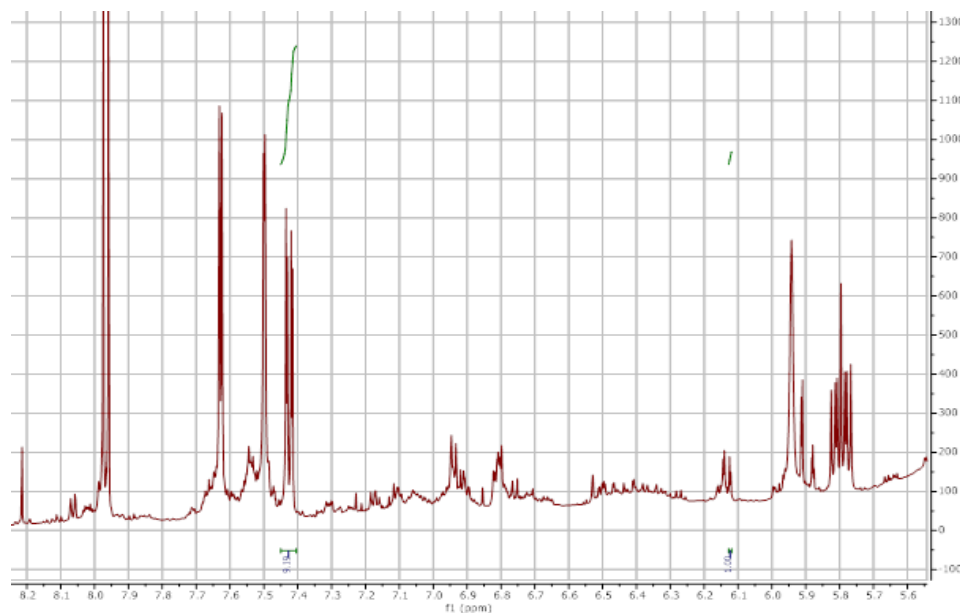
Figura 5.8. Fragmento de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de las extracciones realizadas para todo el diseño de experimentos en  $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz



**Figura 5.9.** Fragmento de los espectros <sup>1</sup>H-RMN de las extracciones en las condiciones óptimas determinadas por el modelo estadístico en DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz



**Figura 5.10.** Fragmento del espectro  $^1\text{H}$ -RMN 400 MHz, en DMSO- $d_6$  del extracto SMN01 para la segunda cuantificación.



**Figura 5.11.** Fragmento del espectro  $^1\text{H}$ -RMN 400 MHz, en DMSO- $d_6$  del extracto SMN01 para la tercera cuantificación.