

Síntesis parcial de citroflavonoides a partir de la naringina

Mónica F. Martínez Coronado, Eloy Rodríguez de León*, Alejandro Núñez Vilchis, Areli Rodríguez Ontiveros, Moustapha Bah.

Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Cerro de las Campanas, Querétaro 76010.

* eloy.rodriguez@uaq.mx

Resumen

Los flavonoides son compuestos naturales presentes en una gran cantidad de plantas. Su alta capacidad antioxidante les otorga diversas propiedades benéficas para la salud humana. La familia de los flavonoides puede dividirse en seis grandes grupos: los flavanoles, las antocianinas, los flavonoles, las isoflavonas, las flavonas y las flavanonas. La cáscara de los frutos del género *Citrus*, comúnmente conocidos como cítricos, es rica en ácidos fenólicos y flavonoides. La toronja (*Citrus paradisi*) es uno de los frutos que compone este género y destaca por poseer una cantidad significativa del flavonoide naringina (en adelante, mencionado como "compuesto 1"). En la actualidad, al consumir un cítrico, la cáscara y la semilla no son utilizadas, lo que implica un desperdicio de aproximadamente un 60 % del total del fruto. Asimismo, existe una creciente necesidad de reutilizar y optimizar los recursos naturales con la intención de reducir el impacto ambiental. En este sentido, el presente trabajo está enfocado en aprovechar los residuos de la cáscara de toronja (*Citrus paradisi*) para extraer la flavanona naringina mediante una metodología sencilla y amigable con el ambiente. A partir del compuesto 1, se obtuvieron mediante síntesis parcial los flavonoides naringenina (compuesto 2), rhoifolina (compuesto 3) y apigenina (compuesto 4) con un buen porcentaje de conversión. Finalmente, los análisis mediante HPLC-DAD indicaron que la naringenina se obtiene con un 99 %, mientras que la conversión de la rhoifolina y la apigenina en un 70 % y 99 % respectivamente.

Palabras clave: citroflavonoides, química sostenible, naringina, toronja, apigenina.

Abstract

Flavonoids are natural compounds present in a large number of plants. Their high antioxidant capacity gives them several beneficial properties for human health. The flavonoid family can be divided into six major groups: flavanols, anthocyanins, flavonols, isoflavones, flavones and flavanones. The peel of the fruits of the *Citrus* genus, commonly known as citrus fruits, is rich in phenolic acids and flavonoids. Grapefruit (*Citrus paradisi*) is one of the fruits that make up this genus and stands out for possessing a significant amount of the flavonoid naringin (hereafter referred to as "compound 1"). At present, when consuming a citrus fruit, the peel and seed are not used, which implies a waste of approximately 60 % of the total fruit. Likewise, there is a growing need to reuse and optimize natural resources with the intention of reducing the environmental impact. In this sense, the present work is focused on taking advantage of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel residues to extract the flavanone naringin by means of a simple and environmentally friendly methodology. From compound 1, the flavonoids naringenin (compound 2), rhoifolin (compound 3) and apigenin (compound 4) were obtained by partial synthesis with a good conversion rate. Finally, HPLC-DAD analysis indicated that naringenin is obtained with 99 %, while the conversion of rhoifolin and apigenin in 70 % and 99 % respectively.

Keywords: citroflavonoids, sustainable chemistry, naringin, grapefruit, apigenin.

Introducción

La necesidad de utilizar materias primas renovables para la obtención de productos con alto valor agregado, en lugar de recursos no renovables como el petróleo, es una actividad que contribuye enormemente a lograr un desarrollo sostenible. Actualmente, entendemos como desarrollo sostenible (sostenibilidad) aquel que sea capaz de satisfacer las necesidades actuales de las personas sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras.

En la actualidad, la gran mayoría de los principios activos de los medicamentos comercializados a nivel mundial son obtenidos a través de síntesis química. Esto implica que los materiales para la obtención de un determinado ingrediente activo sean derivados del petróleo y que en su desarrollo tengan una elevada huella de carbono. En ese sentido, el aprovechar los recursos naturales renovables y de preferencia endémicos de una región implica una gran disminución en el impacto ambiental de un determinado producto.

Nuestro país se destaca por ser uno de los principales países megadiversos debido a su amplia gama de recursos naturales y valores culturales. Asimismo, estos recursos representan una fuente importante de compuestos con efectos benéficos para la salud humana. Uno de ellos que resulta ser potencialmente aprovechable, abundante y ampliamente producido en el país es el residuo de los cítricos (principalmente la cáscara de toronja y de naranja) generado a partir de la industria alimentaria y de los pequeños comerciantes a nivel local (juguerías). Actualmente, al consumir un cítrico, la cáscara y la semilla no son utilizadas, lo que implica un desperdicio de aproximadamente un 60 % del total del fruto. El aprovechamiento de estos recursos representa una oportunidad para extraer compuestos de amplio valor agregado, como la naringina y sus

derivados, los cuales son moléculas con utilidad en la industria farmacéutica y alimentaria (Ghasemzadeh & Jaafar, 2013). También, es de destacarse que México ocupa el tercer lugar a nivel mundial como productor de toronja (USDA, 2020). La producción anual promedio de este cítrico es de aproximadamente 400,000 toneladas métricas, siendo el Estado de Veracruz el principal productor a nivel nacional (USDA, 2020).

La cáscara y las semillas de los cítricos son muy ricas en compuestos fenólicos y flavonoides. Sin embargo, la cáscara es más rica en flavonoides que las semillas. Los flavonoides presentes en los cítricos son principalmente del tipo flavanonas unidas a azúcares. La naringina es uno de los flavonoides más abundantes en todos los frutos cítricos (Tripoli et al., 2007).

La cáscara de pomelo (*Citrus grandis*) y toronja (*Citrus paradisi*) poseen una alta cantidad de naringina (Sudto et al., 2009). Su contenido en el fruto depende de diferentes factores como el estado de maduración, la parte utilizada y el tiempo de secado. La naringina ejerce acciones terapéuticas potenciales al modular diversas proteínas y enzimas, por lo que posee propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antivirales y antiinflamatorias (Wang et al., 2013).

El presente proyecto propone reutilizar y transformar los desechos, cáscara, de la toronja (*Citrus paradisi*) generados por la industria alimentaria para extraer, utilizando el ultrasonido y las microondas (fuentes de energía alternativas y ecológicas), el flavonoide naringina y a partir de éste transformarlo en compuestos con un alto valor agregado (síntesis parcial). Asimismo, el presente proyecto se enfoca en el desarrollo de una vía menos contaminante y que persigue los principios de la química verde para

producir los flavonoides naringenina, rhoifolina y apigenina.

Metodología

El análisis (% de conversión) e identificación de los flavonoides obtenidos, se realizó mediante cromatografía utilizando un cromatógrafo de líquidos marca Waters® provisto de una bomba cuaternaria modelo e2695 y un detector de arreglo de diodos (DAD) modelo 2998. Los análisis se realizaron mediante un método de fase reversa utilizando como fase estacionaria una columna C₁₈ (5 µm, 150 x 4.6 mm) y como fase móvil un gradiente de acetonitrilo con agua acidulada con ácido acético 0.0125N a un flujo de 1 mL/min (Tabla 1). Los análisis en cromatografía en capa fina se realizaron utilizando placas de gel de sílice de 0.25 mm de espesor y con indicador de fluorescencia (PF 254) (Merck).

Tabla 1. Gradiente de elución para el análisis de los flavonoides.

Tiempo (minutos)	Ácido acético [0.0125N] (%)	Acetonitrilo (%)
0	95	5
2	95	5
5	85	15
20	50	50
25	95	5

Fuente: Elaboración propia.

Para la optimización de la extracción de la naringina, se utilizó un diseño experimental 2k completo y centrado (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño experimental para la optimización de parámetros.*

Experimento	Nivel de temperatura	Nivel de tiempo
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0

*Los niveles bajos representados con '-1', niveles altos representados con '+1' y el nivel intermedio representado con '0'. Fuente: Elaboración propia.

En la extracción asistida por microondas, se evaluaron temperaturas de 50 °C y 80 °C como niveles alto y bajo, así como 15 y 25 minutos como alto y bajo de tiempo respectivamente. También, se evaluó la extracción del analito asistida por ultrasonido con las siguientes condiciones 35 °C, 37 kHz y 5 min. Asimismo, se realizó la extracción convencional mediante reflujo a 55 °C y durante 3 horas como control. Las extracciones por reflujo y asistidas por microondas, se realizó en metanol y etanol mientras que en la asistida por ultrasonido únicamente se utilizó metanol como medio extractante. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. El contenido de naringina (en mg/g) extraída a partir de la cáscara, se cuantificó mediante una curva de calibración realizada usando el método HPLC antes descrito y un estándar comercial de naringina. Los resultados de las extracciones fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA) y, para comprobar si existe una diferencia significativa entre los grupos (medios de extracción y técnicas), se realizó la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 95 % correspondiente al promedio de 3 réplicas (n =3).

Por otra parte, a partir de la naringina extraída se obtuvo la naringenina (compuesto 2) mediante reacciones de hidrólisis catalizada por ácido. Brevemente, se describe el procedimiento: en un matraz bola de 50 mL, se colocaron 0.25 mmol de

naringina, se adicionaron 10 mL de una disolución de ácido sulfúrico a diferentes concentraciones (entre 0.05 y 2.5 N). La mezcla se calentó a reflujo y se mantuvo en agitación durante 2 o 3 horas. Transcurrido este intervalo de tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le adicionaron 20 mL de una disolución de bicarbonato de sodio; por último, se realizaron tres extracciones con 5 mL de acetato de etilo. La obtención de la rhoifolina y de la apigenina, se realizó mediante una reacción de oxidación catalizada por yodo y base. En un matraz bola de 50 mL provisto de un agitador magnético, se adicionó 0.25 mmol de naringina, 0.25 mmol de yodo y 5 mL de piridina. La disolución se calentó a 95 °C con agitación constante durante 2 y 24 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 50 mg de metabisulfito de sodio en 5 mL de agua y 5 mL de ácido clorhídrico al 1 %. Finalmente, para la recuperación del producto de interés se realizaron tres extracciones con 10 mL de acetato de etilo.

Finalmente, la caracterización de los flavonoides se realizó a través del estudio de sus espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , los cuales fueron obtenidos en un espectrómetro de la marca Brüker Avance III HD de 500 MHz del Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Físicoquímicas y Estructura Molecular de la Universidad de Guanajuato. Se utilizó metanol y piridina deuterados como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

Resultados

La identificación y cuantificación de la naringina extraída y el monitoreo del avance de las reacciones se realizaron utilizando el método HPLC-DAD. La Figura 1 muestra el cromatograma obtenido del estándar de naringina.

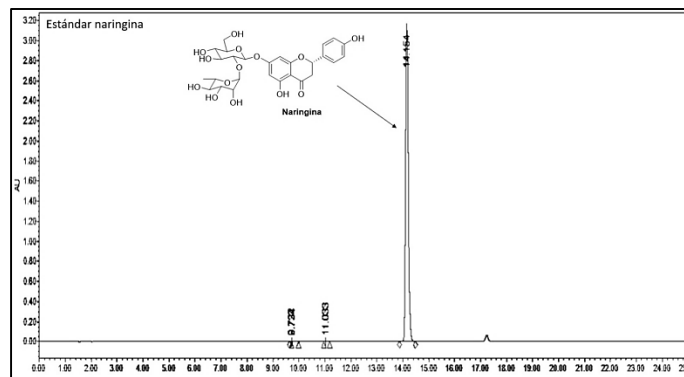


Figura 1. Cromatograma del estándar de naringina. Fuente: Elaboración propia.

Las Figuras 2 y 3 muestran las gráficas de superficie obtenidas para la optimización de la extracción de naringina asistida por microondas en dos medios extractantes (metanol y etanol respectivamente).

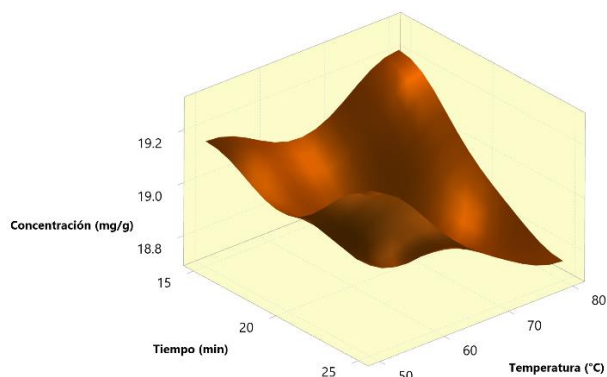


Figura 2. Extracción de naringina en metanol variando tiempo y temperatura usando microondas. Fuente: Elaboración propia.

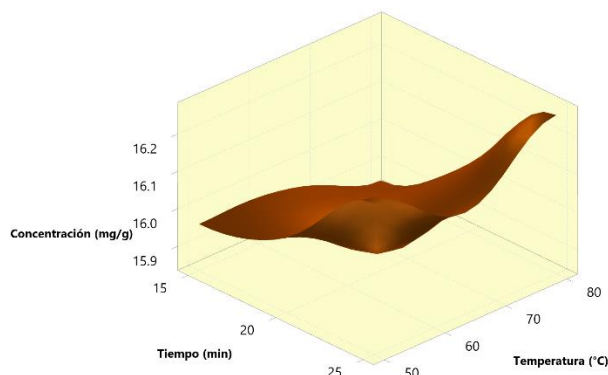


Figura 3. Extracción de naringina en etanol variando tiempo y temperatura usando microondas. Fuente: Elaboración propia.

La naringina obtenida mediante las distintas técnicas y condiciones de extracción se muestra en la Figura 4.

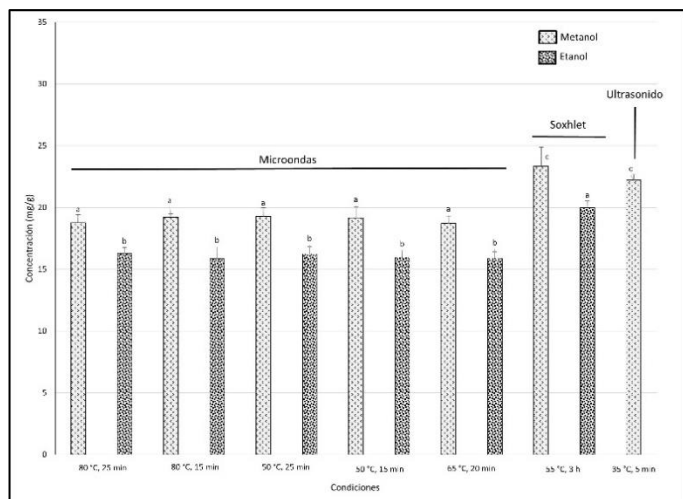


Figura 4. Concentración de naringina a las distintas condiciones de extracción (N=3). a, b, c Distintas letras representan diferencia estadística significativa. Fuente: Elaboración propia.

La Figura 5 muestra la mezcla de estándares de naringina y naringenina. Se observa que el flavonoide libre (aglicona) posee mayor tiempo de retención que el compuesto glicosilado (naringina).

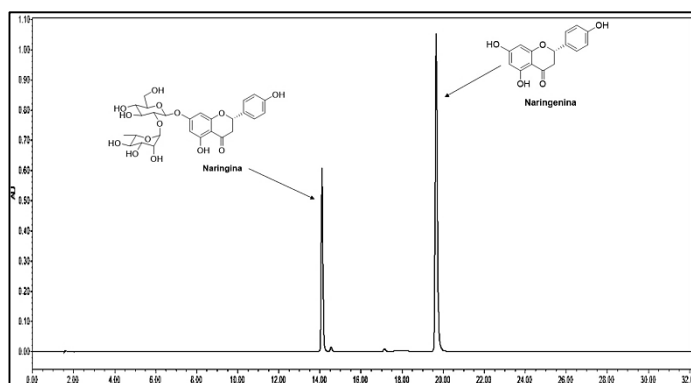
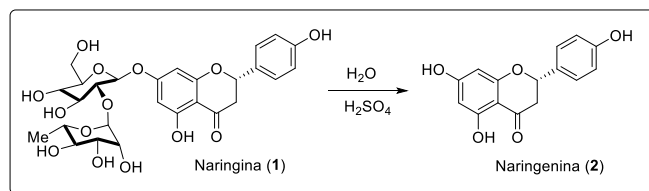


Figura 5. Cromatograma de la mezcla de estándares. Fuente: Elaboración propia.

Las pruebas de hidrólisis a partir de la naringina para la obtención de la naringenina (Esquema 1) fueron realizadas mediante dos distintas metodologías: un método convencional (calentamiento a reflujo) y utilizando un método más “eficiente y ecológico” como el uso de las microondas.



Esquema 1. Hidrólisis catalizada por ácido a partir de la naringina. Fuente: Elaboración propia.

Los resultados de las pruebas de hidrólisis se muestran en la Tabla 3. Todas las pruebas fueron monitoreadas mediante HPLC-DAD para obtener el % de conversión.

Tabla 3. Reacciones de hidrólisis catalizada por ácido a partir de la naringina.

Experimento	H ₂ SO ₄ [N]	Tiempo (horas)	Conversión (%)
1	0.50	2 ^a	50
2	1.00	2 ^a	80
3	1.50	2 ^a	95
4	2.00	2 ^a	97
5	1.50	3 ^a	99
6	0.05	2 ^b	99
7	0.10	2 ^b	100
8	0.50	2 ^b	100
9	1.50	2 ^b	100

^aReacción a reflujo. ^bReacción realizada en microondas a 120 °C. Fuente: elaboración propia.

En la Figura 6, se muestra el cromatograma obtenido de analizar el producto de la hidrólisis ácida de la naringina utilizando una concentración de ácido 1.5 N y dos horas de reacción.

Síntesis parcial de citroflavonoides a partir de la naringina

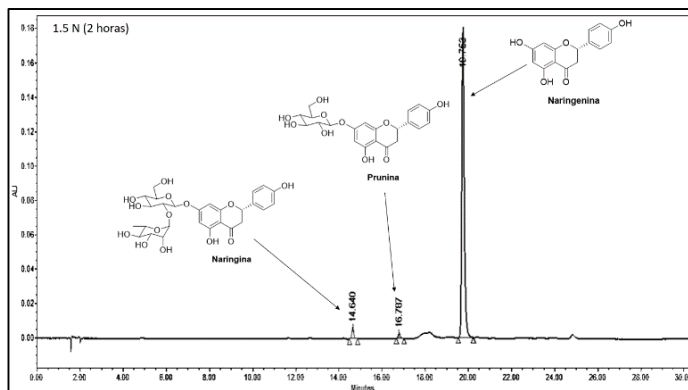


Figura 6. Cromatograma de la reacción de hidrólisis llevada a cabo en 2 horas y con una concentración de ácido 1.5 N (Tabla 3, experimento 3). Fuente: Elaboración propia.

La naturaleza química de la naringenina fue confirmada mediante el análisis de sus espectros de RMN de ^1H (Figura 7) y ^{13}C (Figura 8).

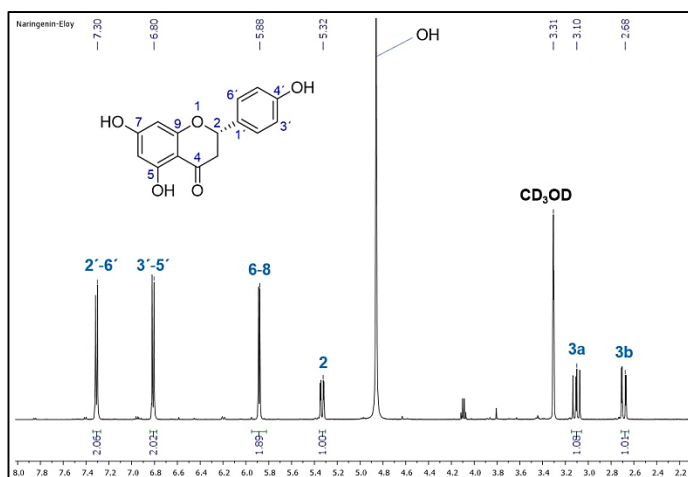


Figura 7. Espectro de ^1H de RMN de la naringenina. Fuente: Elaboración propia.

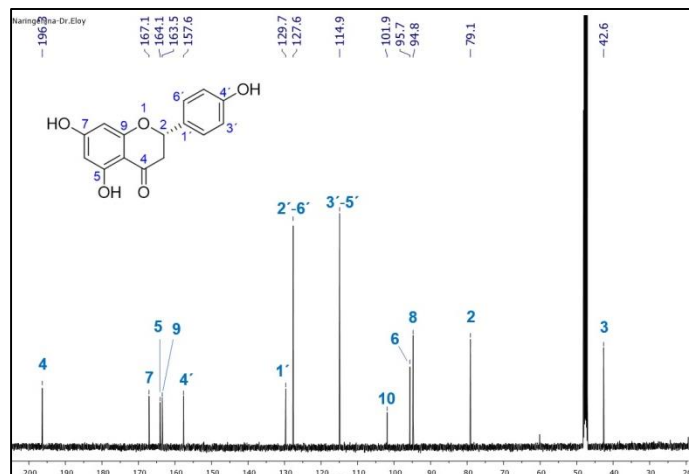
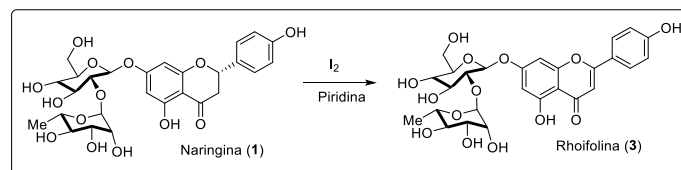


Figura 8. Espectro de ^{13}C de RMN de la naringenina. Fuente: Elaboración propia.

Asimismo, se realizaron distintas pruebas para la obtención de la rhoifolina a partir de la naringina utilizando una reacción de oxidación catalizada por yodo y base (Esquema 2).



Esquema 2. Reacción de oxidación de la naringina para la obtención de la rhoifolina. Fuente: Elaboración propia.

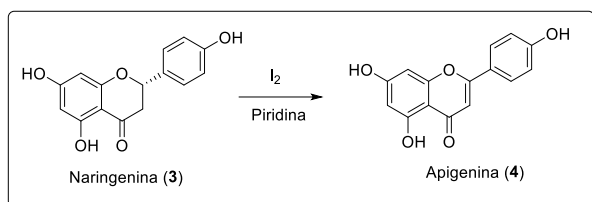
Los resultados de algunas pruebas de oxidación de la naringina se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Reacciones de oxidación catalizada por yodo y base a partir de la naringina.

Experimento	Tiempo (h)	Conversión (%)
1	3.5 ^a	20
2	24 ^a	70

^aReacción a 95 °C. Fuente: Elaboración propia.

Siguiendo la metodología anteriormente descrita (oxidación), se realizaron distintas pruebas para la obtención de la apigenina a partir de la naringenina (Esquema 3).



Esquema 3. Reacción de oxidación de la naringenina para la obtención de la apigenina. Fuente: Elaboración propia.

Los resultados de algunas de las pruebas de oxidación de la naringenina para la obtención de la apigenina se observan en la Tabla 5.

Tabla 5. Reacciones de deshidrohalogenación catalizada por yodo y base a partir de la naringenina.

Experimento	Tiempo (h)	Conversión (%)
1 ^a	2	15
2 ^a	24	99

^aReacción a 95 °C. Fuente: Elaboración propia.

Discusión

Las gráficas de superficie (Figuras 2 y 3) muestran las concentraciones de naringina recuperada usando las microondas y etanol o metanol como disolventes. En estos gráficos, se puede observar que las condiciones óptimas de extracción se logran cuando se utiliza la menor temperatura evaluada (50 °C) y el mayor intervalo de tiempo (25 minutos). Aunque cabe resaltar que la mayor cantidad del compuesto 1 se obtiene cuando se utiliza el metanol como disolvente.

La Figura 4 muestra que, tanto para la extracción mediante microondas como por reflujo, el metanol es el mejor medio para la extracción del compuesto 1 en el albedo de toronja al tener concentraciones significativamente mayores comparadas con el etanol en todas las condiciones de tiempo y temperatura evaluadas. Aun así, la extracción asistida por microondas no logró obtener las recuperaciones por reflujo. Es de destacarse que la

extracción asistida por ultrasonido obtuvo eficiencias comparables con la técnica tradicional, ambas en metanol, con tiempos y temperaturas bajos, por lo que puede considerarse una opción más viable para la extracción de la naringina.

El método cromatográfico desarrollado mediante HPLC-DAD nos permitió identificar a los flavonoides naringina y naringenina (Figura 1 y 5). Dicho método, permitió monitorear el avance de las reacciones de hidrólisis (Figura 6), así como el avance de las transformaciones de las reacciones de oxidación. Además de confirmar la presencia de la naringenina mediante HPLC-DAD, se logró confirmar la naturaleza química de este compuesto mediante el estudio de sus espectros de RMN de ¹H y ¹³C. En la Figura 7, se observa el espectro de ¹H de la naringenina, en el cual se muestra la presencia de los protones aromáticos en un desplazamiento químico de entre 5.80 y 7.40 ppm. Asimismo, se observa la señal del protón en la posición 2 a un desplazamiento químico de 5.32 ppm como un doble de dobles (*dd*). Finalmente, se confirma la presencia de los protones alifáticos y diastereotópicos 3a y 3b a un desplazamiento químico de 3.10 y 2.68 ppm respectivamente. Así mismo, en el espectro de ¹³C de la naringenina (Figura 8) se observan 15 señales correspondientes a los 15 carbonos presentes en la molécula. En dicho espectro, se puede destacar la presencia del carbono carbonilo a 196.3 ppm, 12 carbonos aromáticos pertenecientes a los anillos A y B de la estructura del flavonoide y las dos señales alifáticas correspondientes a los C-2 y C-3 a 79.1 y 42.6 ppm respectivamente.

Cabe resaltar que, para encontrar las mejores condiciones de obtención de la naringenina, se llevó a cabo distintas reacciones de hidrólisis a partir de la naringina utilizando diferentes concentraciones de ácido y tiempo (Esquema 1 y Tabla 3). A partir de dichos experimentos se encontró que utilizando una

concentración de ácido 1.5 N y en un tiempo de 3 horas, en el método convencional se obtiene un 99 %. Mientras que en el método alternativo (uso de microondas) se encontró que las condiciones óptimas fueron a un tiempo de 2 horas y con una concentración de ácido de 0.05 N; a partir de esto, se obtuvo un 100 % de conversión. Lo anterior indica que el uso de las microondas puede reducir significativamente la concentración de ácido, utilizada para la hidrólisis completa de los azúcares, y considerablemente el tiempo de reacción.

Por otra parte, se exploraron dos vías independientes para la obtención de la rhoifolina y de la apigenina. La metodología que se siguió para la obtención de estos compuestos es mediante una reacción de oxidación catalizada por yodo y base. Cuando se lleva a cabo dicha reacción partiendo de la naringina es posible sintetizar la molécula de rhoifolina (Esquema 2). La mejor conversión obtenida fue del 70 % en un tiempo de reacción de 24 horas (Tabla 4). Asimismo, utilizando la misma reacción de oxidación, pero usando como precursor la naringenina se logró obtener la apigenina (Esquema 3). En dichas pruebas se puede observar que se obtuvo un porcentaje de conversión del 99 % (Tabla 5).

Conclusiones

En conclusión, se evaluaron distintas técnicas de extracción de la naringina (microondas, ultrasonido y reflujo) a partir de la cáscara de toronja. A partir de lo anterior, se encontró que mediante la extracción asistida por ultrasonido se logra una eficiencia comparable con la técnica convencional (reflujo durante 3 horas) en un intervalo de tiempo muy corto 5 minutos. Además, se desarrolló un método cromatográfico mediante HPLC-DAD para el monitoreo de los productos de las diferentes reacciones. Se logró establecer las condiciones en las cuales ocurre una hidrólisis completa de los azúcares

por dos distintas metodologías (reflujo y microondas) para la obtención de la naringenina. Asimismo, se confirmó mediante espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C la naturaleza química de la naringenina. Finalmente, se pudo obtener los citroflavonoides rhoifolina y apigenina con un buen porcentaje de conversión 70 y 99 % respectivamente.

Agradecimientos

A la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro por el financiamiento otorgado para la realización de una parte de este trabajo a través del Fondo “Química Somos Todos 2021”.

Referencias bibliográficas

- Ghasemzadeh, A., y Jaafar, H. Z. (2013). Profiling of phenolic compounds and their antioxidant and anticancer activities in pandan (pandanus amaryllifolius roxb.) extracts from different locations of Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1). doi:10.1186/1472-6882-13-341
- Kurahayashi, K., Hanaya, K., Higashibayashi, S., y Sugai, T. (2018). Synthesis of trilobatin from naringin via Prunin as the key intermediate: Acidic hydrolysis of the α -RHAMNOSIDIC linkage in naringin under improved conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82(9), 1463-1467. doi:10.1080/09168451.2018.1482455
- Sudto, K., Pompakakul, S., y Wanichwecharungruang, S. (2009). An efficient method for the large-scale isolation of naringin from pomelo (citrus grandis) peel. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(9), 1737-1742. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.01989.x
- Tripoli, E., Guardia, M. L., Giammanco, S., Majo, D. D., y Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity, and nutritional properties: A Review. *Food Chemistry*, 104(2), 466-479. doi:10.1016/j.foodchem.2006.11.054
- USDA. United States Department of Agriculture. (2020). Citrus: world markets and trade. Consultado el 24 de febrero, 2021. Obtenido de:

<https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/w66343603/gf06gq220/rx914c158/citrus.pdf>

USDA. United States Department of Agriculture. (2020) Mexico: citrus annual. Consultado el 24 de febrero, 2021 Obtenido de: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Citrus%20Annual_Mexico%20City_Mexico_12-20-2019

Wang, D., Yang, Y., Zhang, L., Zhang, X., Guan, F., y Zhang, L. (2013). Naringin enhances CaMKII activity and improves long-term memory in a mouse model of alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5576-5586. doi:10.3390/ijms14035576