



UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

**OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE
CÁSCARA DE NARANJA (*Citrus sinensis*) MEDIANTE LA
EXTRACCIÓN CON CO₂ SUPERCRÍTICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

ALMA ROSA TOLEDO GUILLÉN

HERMOSILLO, SONORA

JULIO 2009

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA

APROBACIÓN DEL JURADO

de la tesis presentada por:

Alma Rosa Toledo Guillén

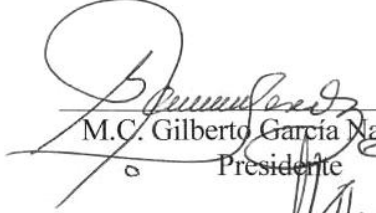
Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

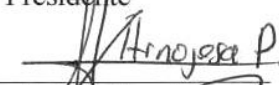
22/06/2009
Fecha

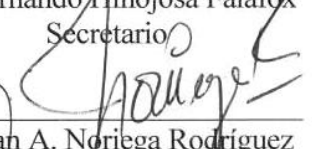
22/06/2009
Fecha

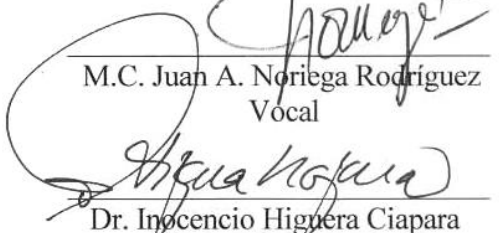
21/06/2009
Fecha

21/06/2009
Fecha


M.C. Gilberto García Navarrete
Presidente


Dr. J. Fernando Hinojosa Palafox
Secretario


M.C. Juan A. Noriega Rodríguez
Vocal


Dr. Inocencio Higuera Ciapara
Sinodal Externo

UNIVERSIDAD DE SONORA
AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO

Julio 2, de 2009.

Por la presente se hace constar que la estudiante **ALMA ROSA TOLEDO GUILLEN**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de Grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.



DR. VICTOR MANUEL SANCHEZ CORRALES
COORDINADOR
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

RESUMEN

Los flavonoides cítricos constituyen uno de los grupos de compuestos bioactivos más destacados, por su importante actividad biológica y baja toxicidad. El objetivo de este trabajo fue obtener extractos con flavonoides de cáscara de naranja *Citrus sinensis* con la técnica de extracción supercrítica, y optimizar las condiciones de extracción de flavonoides identificados con potencial de aplicación.

En el proceso de extracción supercrítica se empleó un diseño compuesto centrado rotatorio (DCCR) para estudiar los efectos de la presión de extracción (149-401 bar), temperatura de extracción (40-60 °C) y porcentaje de cosolvente (0-20 % de etanol), sobre el rendimiento de flavonoides de interés, recuperados de cáscara de naranja *Citrus sinensis* (mg de flavonoide obtenidos de 20 g de cáscara de naranja). El tiempo de extracción se fijó en 3 horas. Por su potencial farmacológico, las flavonas polimetoxiladas nobiletina y tangeretina se seleccionaron para optimizar su extracción.

La interacción entre la presión de extracción y el porcentaje de cosolvente fue determinada por la metodología de superficie de respuesta (MSR), como el factor de mayor influencia en el rendimiento de extracción, tanto de nobiletina como de tangeretina ($p = 0.001$ y $p = 0.035$, respectivamente). El término cuadrático del porcentaje de cosolvente también tuvo un efecto significativo, aunque menor, en la obtención de estos compuestos ($p = 0.016$ para nobiletina y $p = 0.033$ para tangeretina). Mediante el análisis de regresión se ajustó un modelo cuadrático para rendimiento de nobiletina y otro para rendimiento de tangeretina. Las condiciones óptimas de extracción determinadas por los modelos de predicción fueron las mismas para nobiletina y tangeretina: 400 bar, 60 °C y 23.35 % de cosolvente. Bajo estas condiciones es posible extraer 57.66 mg de nobiletina y 3.65 mg de tangeretina por cada 20 g de cáscara de naranja.

Con la técnica convencional de extracción con solventes orgánicos (metanol-DMSO, 1:1 v/v), se identificaron y cuantificaron los principales flavonoides presentes en la cáscara de naranja *Citrus sinensis*, variedad Valencia, de Guaymas, México. Los flavonoides detectados con esta técnica fueron las flavanonas glicosiladas: hesperidina y narirutina; y las flavonas polimetoxiladas: sinensetina, nobiletina, tangeretina y tetrametil escutellareina. La hesperidina fue el flavonoide más abundante. Por su parte, en todos los extractos supercríticos se encontraron presentes las flavonas polimetoxiladas: sinensetina, nobiletina, tangeretina y tetrametil escutellareina. Se detectaron pequeñas cantidades de hesperidina en los extractos supercríticos con mayor porcentaje de cosolvente.

Los rendimientos de extracción de hesperidina fueron considerablemente menores con la técnica de extracción supercrítica, que con la técnica de extracción con solventes metanol-DMSO (1:1 v/v). La extracción supercrítica resultó altamente efectiva para la obtención de los flavonoides cítricos menos polares (flavonas polimetoxiladas), al recuperar, a condiciones de 275 bar, 50 °C y 23.35 % de etanol, más de dos veces la cantidad obtenida con la técnica de solventes metanol-DMSO (1:1 v/v). La cáscara de naranja recolectada para la presente investigación resultó una buena fuente de flavonas polimetoxiladas.

ABSTRACT

Citrus flavonoids are one of the most important bioactive compounds described in the recent scientific literature. This is due to their unique properties which combine low toxicity and strong biological effects. Thus, the objective of this research was to obtain extracts containing high concentrations of flavonoids with potential applications in the pharmacological industry, from the peel of *Citrus sinensis* orange cultivated in the Sonora region using supercritical extraction, and to optimize the conditions for their extraction.

A central composite rotatory design (CCRD) was used to quantify the effects of extraction pressure (149-401 bar), extraction temperature (40-60°C) and cosolvent concentration (0-20% ethanol) on the yield of flavonoids of interest obtained from the orange peel (mg of flavonoid per 20 g of orange peel). The extraction period was fixed for 3 hours. Due to their high pharmacological potential, the polymethoxylated flavones nobiletin and tangeretin were chosen for optimization of the process.

Using response surface methodology (RSM), it was found that the interaction between extraction pressure and cosolvent concentration was the factor bearing the largest influence on extraction yield of nobiletin and tangeretin ($p = 0.001$ and $p = 0.035$). The quadratic term corresponding to cosolvent concentration also had a significant effect ($p = 0.016$ for nobiletin and $p = 0.033$ for tangeretin). A quadratic model was fitted through regression analysis for nobiletin and tangeretin yield. The optimal extraction conditions determined by the prediction models were the same for nobiletin and tangeretin: 400 bar, 60 °C and 23.35 % ethanol. Under these conditions it is possible to extract 57.66 mg of nobiletin and 3.65 mg of tangeretin for each 20 g of orange peel.

A conventional extraction method using organic solvents (methanol-DMSO, 1:1 v/v) was used to identify and quantify the main flavonoids found in the orange peel used in

the experiments. Flavonoids identified with this technique were the glycosilated flavanones: hesperidin and narirutin; and the polymethoxylated flavones: sinensetin, nobiletin, tangeretin and tetramethylscutellarein. Hesperidin had the highest concentration. On the other hand, all the extracts prepared by supercritical extraction contained polymethoxylated flavones: sinensetin, nobiletin, tangeretin and tetramethylscutellarein. Small amounts of hesperidin were identified in supercritical extracts containing a higher cosolvent concentration.

Hesperidin extraction yield was considerably lower with supercritical extraction than with the traditional organic solvent extraction technique but less polar citrus flavonoids such as polymethoxylated flavones were extracted very efficiently using the supercritical process. Thus, under conditions of 275 bar, 50 °C and 23.35 % ethanol, the quantity of these compounds obtained, was more than double as compared to the results from the conventional organic solvent extraction method. Thus, orange peel used in this investigation resulted in an excellent source of polymethoxylated flavones.

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme el tiempo y darme la fe y fortaleza necesarias para lograr esta meta.

A mis padres, por el amor, comprensión y apoyo incondicional que siempre me han brindado.

A mis hermanos y sobrinos, por su compañía, cariño y apoyo. Sé que cuento con ellos siempre.

A mis amigos que, a pesar del tiempo y la distancia, han mostrado estar siempre conmigo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS	xiii
AGRADECIMIENTOS	xiv
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo General	4
1.2.2 Objetivos Específicos	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Naranja	5
2.1.1 Requerimientos Climáticos y Edáficos del Cultivo	5
2.1.2 Situación Nacional de la Naranja	6
2.1.3 Situación Estatal de la Naranja	8
2.1.4 Características de la Naranja	10
2.1.5 Composición de la Naranja	13
2.2 Flavonoides	16
2.2.1 Aspectos Generales de los Flavonoides	16
2.2.2 Flavonoides Cítricos	17
2.2.3 Patentes y Productos Comerciales Relacionados	21
2.3 Técnicas de Extracción de Flavonoides	30
2.4 Extracción con Fluidos Supercríticos	31
2.4.1 Propiedades de los Fluidos Supercríticos para la Extracción	33
2.4.2 Proceso de Extracción Supercrítica	35
2.4.3 Modelación de la Extracción Supercrítica	36
2.4.4 Propiedades del Bióxido de Carbono Supercrítico	41
2.4.5 Uso de Cosolventes en la Extracción con Fluidos Supercríticos	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1 Materiales	43
3.2 Metodología	43
3.2.1 Caracterización de la Materia Prima	46
3.2.2 Preparación de la Muestra	46

3.2.3 Caracterización del Sustrato	48
3.2.4 Extracción Supercrítica de Flavonoides	49
3.2.5 Diseño Experimental	51
3.2.6 Análisis Estadístico	52
3.2.7 Extracción de Flavonoides con Solventes Orgánicos	57
3.2.8 Análisis HPLC	58
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
4.1 Caracterización de la Materia Prima	60
4.2 Contenido de Humedad de la Cáscara de Naranja Seca	61
4.3 Caracterización del Sustrato	61
4.4 Extracción Supercrítica de Flavonoides	62
4.4.1 Selección de Compuestos con Aplicación Potencial	62
4.4.2 Diseño Experimental de Extracción Supercrítica de Compuestos Seleccionados	65
4.5 Extracción de Flavonoides con Solventes Orgánicos	79
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	85
5.1 Conclusiones	85
5.2 Recomendaciones	87
ANEXOS	89
A. Patentes Relativas a Aplicaciones Biomédicas de Hesperidina.	90
B. Solicitudes de Patente Relativas a Aplicaciones Biomédicas de Hesperidina.	92
C. Patentes Relativas a Aplicaciones Biomédicas de Flavonas Polimetoxiladas.	95
D. Solicitudes de Patente Relativas a Aplicaciones Biomédicas de Flavonas Polimetoxiladas.	98
BIBLIOGRAFÍA	103

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
2.1 Zonas básicas de la naranja: a) flavedo; b) albedo; c) endocarpo.	12
2.2 Principales flavonoides presentes en la cáscara de naranja <i>Citrus sinensis</i> .	18
2.3 Diagrama de fases de una sustancia pura.	32
2.4 Representación esquemática de la extracción supercrítica de sustratos vegetales.	38
3.1 Metodología experimental desarrollada.	44
3.2 Diagrama esquemático del sistema de extracción con fluidos supercríticos.	50
4.1 Perfil HPLC de flavonoides identificados en extractos supercríticos, determinados a 285 nm: hesperidina (17.101 min); sinensetina (37.759 min); hexametil éter quercetagetina (38.567 min); nobiletina / tetrametil escutellareina (42.538 min); 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona (43.437 min); tangeretina (48.943 min). Cromatograma de extracto obtenido a P = 350 bar, T = 44 °C y cosolvente = 16 %.	63
4.2 Perfil HPLC de flavonas polimetoxiladas identificadas en extractos supercríticos, determinados a 340 nm: sinensetina (3.953 min); hexametil éter quercetagetina (4.523 min); nobiletina (5.201 min); tetrametil escutellareina (5.875 min); 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona (6.065 min); tangeretina (7.681 min). Cromatograma de extracto obtenido a P = 401 bar, T = 50 °C y cosolvente = 10 %.	64
4.3 Efecto de la presión y temperatura de extracción en el rendimiento de nobiletina, con 10 % de cosolvente. Gráfica de superficie de respuesta	70
4.4 Efecto de la presión y porcentaje de cosolvente en el rendimiento de nobiletina, a una temperatura de 50 °C. Gráfica de superficie de respuesta.	71
4.5 Efecto de la temperatura y porcentaje de cosolvente en el rendimiento de nobiletina, a una presión de 275 bar. Gráfica de superficie de respuesta.	73
4.6 Efecto de la presión y temperatura de extracción en el rendimiento de tangeretina, con 10 % de cosolvente. Gráfica de superficie de respuesta.	77
4.7 Efecto de la presión y porcentaje de cosolvente en el rendimiento de tangeretina, a una temperatura de 50 °C. Gráfica de superficie de respuesta.	78
4.8 Efecto de la temperatura y porcentaje de cosolvente en el rendimiento de tangeretina, a una presión de 275 bar. Gráfica de superficie de respuesta.	80
4.9 Perfil HPLC de flavonoides identificados en extractos obtenidos con la técnica convencional de solventes, determinados a 285 nm: narirutina (14.857 min); hesperidina (17.654 min). Cromatograma de extracto	

obtenido con metanol-DMSO (1:1 v/v). 81

- 4.10 Perfil HPLC de flavonas polimetoxiladas identificadas en extractos obtenidos con la técnica convencional de solventes, determinadas a 340 nm: sinensetina (3.820 min); hexametil éter quercetagetina (4.638 min); nobiletina (5.306 min); tetrametil escutellareina (6.002 min); 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona (6.528 min); y tangeretina (8.354 min). Cromatograma de extracto obtenido con metanol-DMSO (1:1 v/v). 82

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
2.1	Principales productos frutícolas en México. Superficie sembrada, superficie cosechada, producción y consumo aparente. Año 2007.	7
2.2	Principales estados productores de naranja Valencia. Superficie sembrada y rendimiento. Año 2007.	9
2.3	Superficie sembrada y producción de naranja en el estado de Sonora. Año 2007.	11
2.4	Composición nutricional de naranja Valencia. Cantidad contenida en 100 g.	14
2.5	Concentración de flavonoides en flavedo, albedo y cáscara de naranja variedad Valencia (mg por 100 g de peso fresco).	15
2.6	Productos comerciales que contienen hesperidina.	24
2.7	Productos comerciales que contienen flavonas polimetoxiladas.	27
2.8	Propiedades físicas y de transporte de gases, líquidos y fluidos supercríticos.	34
3.1	Variables y niveles del DCCR usado en la extracción supercrítica de flavonoides de cáscara de naranja (<i>Citrus sinensis</i>).	53
3.2	Diseño conceptual del DCCR.	54
3.3	Tratamientos experimentales planteados por el diseño para la extracción supercrítica de flavonoides de cáscara de naranja (<i>Citrus sinensis</i>).	55
3.4	Tratamientos experimentales aplicados en la extracción supercrítica de flavonoides de cáscara de naranja (<i>Citrus sinensis</i>).	56
4.1	Rendimientos experimentales y rendimientos estimados por el modelo de superficie de respuesta de extracción supercrítica de nobiletina.	67
4.2	Coefficientes de regresión y significancia de los términos del modelo de superficie de respuesta de extracción supercrítica de nobiletina.	68
4.3	Rendimientos experimentales y rendimientos estimados por el modelo de superficie de respuesta de extracción supercrítica de tangeretina.	74
4.4	Coefficientes de regresión y significancia de los términos del modelo de superficie de respuesta de extracción supercrítica de tangeretina.	76
4.5	Rendimientos de flavonoides obtenidos con la técnica de extracción con fluidos supercríticos y con la técnica de extracción con solventes orgánicos (mg por 100 g de cáscara de naranja <i>Citrus sinensis</i> variedad Valencia).	83

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a las instituciones que contribuyeron a la realización de este trabajo:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado para el desarrollo de la presente investigación.

A la Universidad de Sonora, y de manera especial al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, por darme la oportunidad de continuar con mi formación profesional en el programa Maestría en Ciencias de la Ingeniería.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), por las facilidades otorgadas en tiempo, instalaciones y equipo requeridos en la parte experimental de este trabajo.

De manera particular, quiero expresar mi agradecimiento al M.C. Gilberto García Navarrete por su acertada labor de dirección de tesis. Gracias por sus conocimientos, orientación y ayuda, indispensables en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Fernando Hinojosa Palafox y al M.C. Juan Noriega Rodríguez, gracias por las aportaciones y sugerencias realizadas para el adecuado desarrollo y conclusión del trabajo de tesis. Gracias también por los conocimientos proporcionados en clase.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Inocencio Higuera Ciapara (CIAD, A.C.), por haber confiado en mí para el desarrollo de este tema de tesis y apoyarme en la realización de mis estudios de maestría. Igualmente, gracias por su asesoría, confianza y apoyo de siempre.

Un agradecimiento especial al Dr. Juan C. de la Fuente de la Universidad Técnica Federico Santa María (Valparaiso, Chile), por el tiempo y conocimientos en el área de investigación, que con tan buena disposición siempre me brindó. Gracias por su gran ayuda.

Mi agradecimiento también especial a la Q.B. María Elena Ochoa Landín (Universidad de Sonora), por la orientación y facilidades otorgadas para el análisis de la materia prima; al M.C. Luis Enrique Robles Osuna (CIAD, A.C.), por el apoyo técnico brindado en la caracterización fisicoquímica y molienda de la materia prima; a la M.C. Ana Guadalupe Luque Alcaraz, por su ayuda durante las corridas experimentales de extracción supercrítica; y a la Q.B. Karla Guadalupe Martínez Robinson (CIAD, A.C.), por su apoyo en el análisis HPLC de los compuestos obtenidos. A todos ellos, gracias por haber estado siempre que les pedí ayuda.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Extracción Supercrítica del CIAD a cargo del Dr. Inocencio Higuera Ciapara durante el periodo 2006-2008 y fue financiado parcialmente por el FOMIX CONACYT-Sonora.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

Los compuestos bioactivos de origen vegetal son metabolitos secundarios producidos por las plantas, para su defensa y supervivencia. Estos compuestos tienen aplicación en la industria alimenticia, agrícola, cosmética y farmacéutica, siendo en este último campo altamente reconocidos por sus efectos preventivos en la formación y desarrollo de diferentes enfermedades.

Químicamente, los metabolitos secundarios de las plantas se clasifican en tres grupos principales: terpenoides, compuestos fenólicos y alcaloides. Los flavonoides son el subgrupo de compuestos fenólicos más grande y destacado (Balasundram *et al.*, 2006; Duthie *et al.*, 2003; Robards y Antolovich, 1997).

La citricultura constituye una de las actividades económicas más importantes en la agricultura nacional, y la naranja es su principal producto tanto por la superficie destinada a su cultivo, como por su producción y consumo aparente (SIAP, 2009; INEGI, 2008). En Sonora se cuenta con una superficie plantada de 9,215 Ha de este cítrico (SIAP, 2009), lo que lo ubica como el quinto estado productor de naranja en el país, y el primero en la producción de naranja para exportación. Sin embargo, a pesar de que la naranja es un fruto que puede ser aprovechado íntegramente, la explotación comercial en el estado, así como en el resto del país, se limita básicamente a su venta en fresco y a su procesamiento para la obtención de jugo.

La cáscara de naranja es una fuente rica en productos naturales importantes para la nutrición y salud humana. Entre los productos nutricionales que ya han sido obtenidos

de la cáscara de naranja se encuentran la pectina y el ácido cítrico. Los últimos trabajos de investigación realizados para la obtención de productos de valor agregado a partir de la cáscara de naranja, se han orientado a la recuperación de metabolitos secundarios potencialmente importantes, como flavonoides y limonoides (Manthey y Grohmann, 1996).

Los flavonoides presentes en las plantas cítricas han sido objeto de años de investigación. La primera observación relacionada con sus actividades biológicas fue publicada en 1936 por Rusznyak and Szent-Giorgyi (Ross y Kasum, 2002). Las plantas y productos cítricos contienen cantidades significativas de flavonoides, los cuales presentan propiedades benéficas para la salud humana. Entre las características que exhiben se encuentran sus propiedades antiinflamatoria, antiviral y anticarcinogénica, además de sus propiedades antiagregante, antiadhesiva y vasodilatadora a nivel plasmático (Benavente-García *et al.*, 1997). Estas características los hacen importantes agentes potenciales para la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares.

Tradicionalmente, los flavonoides cítricos han sido aislados por extracción con solventes orgánicos (Señoráns *et al.*, 2001). La técnica de extracción con bióxido de carbono supercrítico es una metodología alternativa, que permite obtener productos finales de alta calidad. Esta técnica presenta diversas ventajas sobre los métodos de extracción convencionales, como son: una extracción selectiva de diferentes compuestos, el uso de temperaturas moderadas de extracción, fácil separación y reciclaje del solvente, además de ser una tecnología ecológicamente limpia.

Recientemente se han desarrollado algunos trabajos de investigación dirigidos a la extracción de flavonoides con bióxido de carbono supercrítico, a partir de diferentes matrices vegetales. Rostagno *et al.* (2002), estudiaron la extracción con fluido supercrítico de isoflavonas a partir de harina de soya a condiciones de 200 a 360 bar de presión y 40 a 70 °C de temperatura. He *et al.* (2005), llevaron a cabo la extracción de

flavonoides a partir de desechos del procesamiento de lúpulo, usando bióxido de carbono supercrítico y etanol en alta concentración como cosolvente. Por su parte, Yang *et al.* (2002), extrajeron compuestos farmacéuticos (terpenoides y flavonoides) de hojas de *Gingko biloba*, usando una mezcla extractora de bióxido de carbono supercrítico y etanol, si bien aplicaron un tratamiento previo de extracción con 70% de etanol a las hojas. En otro de los trabajos realizados, Lin *et al.* (1999), mostraron que la extracción con bióxido de carbono supercrítico y cosolvente es una técnica conveniente para extraer flavonoides de *S. baicalensis*.

En relación al procesamiento de cítricos, el bióxido de carbono supercrítico ha sido usado en aplicaciones convencionales como son la extracción de aceite cítrico y el fraccionamiento del mismo, así como en la desterpenación y remoción de compuestos amargos del jugo de naranja (Señoráns *et al.*, 2001). Sin embargo, sólo pocos trabajos se han reportado dedicados a evaluar las posibilidades del uso de la extracción supercrítica en la obtención de flavonoides cítricos (Yu *et al.*, 2007; Gianuzzo *et al.*, 2003; Señoráns *et al.*, 2001).

En la presente investigación se estudió la extracción con bióxido de carbono supercrítico y etanol como cosolvente en bajas concentraciones, de los distintos flavonoides contenidos en cáscara de naranja *Citrus sinensis* variedad Valencia de la región, y se optimizaron las condiciones de extracción de presión, temperatura y porcentaje de cosolvente, con la metodología de superficie de respuesta (MSR).

Si bien los frutos frescos y jugos son los principales productos comerciales de la industria cítrica estatal y nacional, las plantas cítricas son una fuente importante de compuestos bioactivos de interés en investigación biomédica. El objetivo de este trabajo fue obtener extractos con compuestos bioactivos de cáscara de naranja *Citrus sinensis*, utilizando la técnica de extracción con bióxido de carbono supercrítico, con el propósito de identificar la presencia y grado de recuperación de compuestos con potencial valor agregado, dadas sus propiedades farmacológicas.

Para ello se determinó el grado de obtención de compuestos flavonoides presentes en cáscara de naranja *Citrus sinensis* de la región, y se estudió el efecto de las condiciones de presión, temperatura y porcentaje de etanol como cosolvente, en el rendimiento de extracción de los compuestos con potencial aplicación en la industria farmacéutica, obtenidos con la técnica de extracción supercrítica. Finalmente, con la metodología de superficie de respuesta se determinaron las condiciones de operación supercrítica óptimas dentro del rango experimental para la extracción de los flavonoides seleccionados.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Obtener compuestos bioactivos de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*), utilizando extracción supercrítica.

1.2.2 Objetivos Específicos

Obtener extractos con compuestos bioactivos presentes en la cáscara de naranja con la tecnología de extracción supercrítica, utilizando CO₂ como fluido extractor.

Identificar y determinar la concentración de compuestos bioactivos (flavonoides) en cáscara de naranja.

Optimizar la extracción de un compuesto bioactivo identificado con potencial de aplicación, utilizando el método de superficie de respuesta.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Naranja

La naranja es la fruta que más se produce en el mundo y la de mayor consumo per cápita (FIRA, 2003). Proviene del sureste de Asia y pertenece al género *Citrus* de la familia de las Rutáceas (Rutaceae). De entre los diferentes tipos de naranja, las variedades de naranja dulce (*Citrus sinensis*) son las más importantes a nivel comercial.

2.1.1 Requerimientos Climáticos y Edáficos del Cultivo

La naranja es un cultivo de tipo perenne. Su producción comercial se da en regiones de clima tropical y subtropical, dentro del área localizada entre los 23.5 y 40° de latitud norte y sur (Davies y Albrigo, 1994). Los principales factores que influyen en su cultivo son la temperatura, la humedad relativa, la luminosidad y el suelo. De estos elementos, la temperatura durante el desarrollo del fruto es el que tiene mayor efecto en la calidad de la naranja.

El árbol de naranjo presenta moderada resistencia al frío y requiere de temperaturas cálidas durante el verano para una maduración correcta del fruto. En general, las especies de cítricos pueden crecer y fructificar en un rango de 10 a 40 °C de temperatura, y en forma óptima de 24 a 32 °C (Samaniego *et al.*, 2004). En cultivos donde se presentan temperaturas altas durante todo el año, los niveles de clorofila en el fruto del naranjo se conservan elevados, lo que origina que el color de la cáscara permanezca verde. En la medida en que la temperatura del aire y del suelo decrece por debajo de los 15 °C, la clorofila se degrada y aparecen los pigmentos amarillos, naranjas o rojos, ésto como consecuencia de la conversión de cloroplastos a cromoplastos. Por

otra parte, en los casos en los que la cosecha de naranja es tardía, se puede presentar un reverdecimiento del color naranja de la cáscara motivado por la mayor permanencia del fruto en el árbol. Esta reconversión de cromoplastos a cloroplastos la inducen las temperaturas altas de la estación y un nivel de humedad del suelo adecuado para la síntesis de clorofila de la planta (Davies y Albrigo, 1994).

Los suelos destinados al cultivo de cítricos deben ser de textura liviana a media. El cultivo en un suelo de textura pesada presenta un drenaje lento, lo que da lugar a la proliferación de enfermedades causadas por hongos y a un crecimiento lento de las plantas. Los valores de pH en suelo de 5.5 a 6 se consideran óptimos para el desarrollo del naranjo, si bien un rango de valores pH de 4 a 9 es aceptable (Molina, 2000).

La profundidad efectiva del suelo es la mayor profundidad a la que penetran las raíces de los árboles, sin que encuentren obstáculos físicos que impidan su crecimiento y desarrollo normal. En el cultivo del naranjo se aconseja el uso de suelos de 1.5 m a más de 2 m de profundidad efectiva (Samaniego *et al.*, 2004).

La humedad ambiental también es un factor a considerar en el cultivo de la naranja. En regiones con humedad ambiental alta, tales como Guaymas, Ciudad Obregón, Navojoa y Culiacán, se producen frutos con cáscara más delgada y lisa, en tanto que en zonas con valores de humedad relativa baja, como son Caborca, Hermosillo y Mexicali, se obtienen frutos con cáscara más gruesa (Samaniego *et al.*, 2004).

2.1.2 Situación Nacional de la Naranja

La naranja es la fruta de mayor importancia económica en México, tanto por la superficie que se destina para su cultivo, como por el volumen de la producción y por el consumo interno (Tabla 2.1) En el año 2007, cerca del 30 % de la superficie cosechada en el sector frutícola correspondió a este cítrico. De igual manera, el volumen de producción de naranja conformó casi un 30 % de la producción nacional de frutas.

Tabla 2.1 Principales productos frutícolas en México. Superficie sembrada, superficie cosechada, producción y consumo aparente. Año 2007.

FRUTA	SUPERFICIE		PRODUCCIÓN ^a (miles de Ton)	CONSUMO APARENTE ^b (miles de Ton)
	Sembrada ^a (Ha)	Cosechada ^a (Ha)		
Naranja	336,234	330,290	4,249	4,224
Plátano	82,090	75,651	1,965	1,923
Limón	151,267	144,004	1,923	1,490
Mango	179,210	170,549	1,643	1,413
Aguacate	117,312	110,377	1,143	845
Manzana	59,969	56,072	505	725
Piña	26,965	15,918	671	639
Melón	22,008	21,499	543	536
Mandarina	19,024	18,456	283	279
Uva	29,763	29,268	356	263
Durazno	45,584	41,733	192	213
Fresa	6,287	6,238	176	130
Nuez	77,582	57,509	79	79

Fuente: Elaboración propia con base en datos de: ^a SIAP, 2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. SAGARPA. www.siap.gob.mx; ^b INEGI, 2008. El Sector Alimentario en México. www.inegi.org.mx.

Por su periodo de maduración, las variedades de naranja se clasifican en: a) tempranas; b) de media estación; y c) tardías. En México, la naranja de mayor producción comercial es la variedad Valencia, de maduración tardía. Únicamente un 5 % de la producción nacional corresponde a otros tipos, como la Navel y Hamlin, variedades de maduración temprana.

De acuerdo a datos oficiales reportados en el Anuario Estadístico de la Producción Agrícola (SIAP, 2009), en el año 2007 la naranja Valencia se cultivó en 22 entidades de la República Mexicana. Los estados de Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León, Yucatán y Sonora, contribuyeron con una producción importante, superior a las 100,000 toneladas cada uno.

En el 2007, Veracruz destinó 154,742 Ha al cultivo de naranja Valencia, lo que lo posicionó como el principal estado productor de la República, tanto por superficie sembrada como por producción. Del total de su superficie, sólo un 2.3 % contó con sistema de riego, por lo que su producción fue básicamente de temporal (Tabla 2.2). A nivel nacional, el porcentaje de superficie destinada al cultivo de naranja en la modalidad de temporal fue de 73.6 %. Bajo este sistema se obtuvo un rendimiento nacional promedio de 12.24 toneladas de producto por hectárea cosechada. Por su parte, el 26.4 % de la superficie que se trabajó bajo el sistema de riego, presentó un rendimiento medio de 15.29 Ton/Ha. En este aspecto destacó el estado de Sonora, al contar con una superficie de siembra de 6,546 Ha de naranja Valencia, toda bajo la modalidad de riego, y lograr un rendimiento de 19.52 Ton/Ha, cifra por arriba del promedio nacional.

2.1.3 Situación Estatal de la Naranja

El estado de Sonora ocupa el quinto lugar en la producción nacional de naranja, y el primero en la producción de naranja para exportación. La actividad citrícola en la entidad se centra principalmente en tres áreas: 1) La Costa de Hermosillo; 2) El Valle

Tabla 2.2 Principales estados productores de naranja Valencia. Superficie sembrada y rendimiento. Año 2007.

ESTADO	SUPERFICIE SEMBRADA			RENDIMIENTO (Ton/Ha)
	Temporal (Ha)	Riego (Ha)	Total (Ha)	
Veracruz	151,145.75	3,596.00	154,741.75	13.81
Tamaulipas	4,573.25	27,465.57	32,038.82	15.01
San Luis Potosí	37,300.85	7,532.00	44,832.85	9.64
Nuevo León	4,181.00	12,012.00	16,193.00	12.57
Yucatán	874.57	13,161.68	14,036.25	12.14
Sonora	-----	6,546.00	6,546.00	19.52
Puebla	8,523.00	60	8,583.00	9.99
Oaxaca	4,235.00	26	4,261.00	13.52
Hidalgo	4,842.00	-----	4,842.00	9.93
Campeche	954.50	3,978.00	4,932.50	9.75
SUBTOTAL	216,629.92	74,377.25	291,007.17	13.06
Resto del País	2762.00	4219.37	6,981.37	11.84
TOTAL	219,391.92	78,596.62	297,988.54	13.04

Fuente: Elaboración propia con base en datos de: SIAP, 2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. SAGARPA. www.siap.gob.mx.

del Yaqui; y 3) El Valle de Guaymas (Tabla 2.3). La Cuenca del Río Sonora y El Valle de Caborca son zonas de producción de naranja a menor escala.

La mayoría de los productores de cítricos en Sonora se encuentran organizados en tres asociaciones de carácter económico: la empresa Citrison, S.A. de C.V., que agrupa a los productores de la Costa de Hermosillo; la empresa Citrícola del Yaqui, conformada por los productores del Sur de Sonora; y la Asociación Agrícola Local de Productores de Cítricos de San José de Guaymas, A.C. (Molina, 2005). La naranja variedad Valencia es el principal cítrico cultivado. De acuerdo a información dada en el Plan Rector Sistema Producto Cítricos de la entidad, un 67 % de las hectáreas plantadas corresponden a este cultivo y un 26 % a naranja de otras variedades.

El mercado estatal se abastece de naranja local todo el año, excepto en los meses de septiembre a noviembre, en los que se adquiere además fruta proveniente de Nuevo León, Jalisco y Tamaulipas. En el ámbito internacional, el estado de Sonora contribuye con el 65 % de las exportaciones nacionales de naranja. Su estatus fitosanitario, al ser una zona libre de la mosca mexicana de la fruta, le permite ingresar su producto en el mercado internacional sin tratamientos adicionales de fumigación. Además, las condiciones climatológicas propias del clima desértico, confieren a la naranja de Sonora una apariencia externa de mayor calidad que la hace competitiva en el mercado internacional. Los productores de la Costa de Hermosillo son los principales exportadores de naranja a nivel nacional.

2.1.4 Características de la naranja

Los frutos de los cítricos son bayas modificadas llamados hesperidios, que se caracterizan por ser carnosos y tener semillas dispuestas en forma radial en su parte central. En particular, la cáscara de la naranja está formada por el exocarpo, capa externa de color llamado flavedo, y por el mesocarpo, capa interna esponjosa de color blanco conocida como albedo (Figura 2.1). El endocarpo es la parte comestible del fruto;

Tabla 2.3 Superficie sembrada y producción de naranja en el estado de Sonora.
Año 2007.

DISTRITO	SUPERFICIE SEMBRADA (Ha)	PRODUCCIÓN (Ton)
Caborca	268	2,283
Cajeme	1874	35,606
Guaymas	795	9,540
Hermosillo	6,245	125,000
Mazatán	4	20
Moctezuma	3	24
Navjoa	26	468
Total Estatal	9,215	172,941

Fuente: SIAP, 2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. SAGARPA.
www.siap.gob.mx.

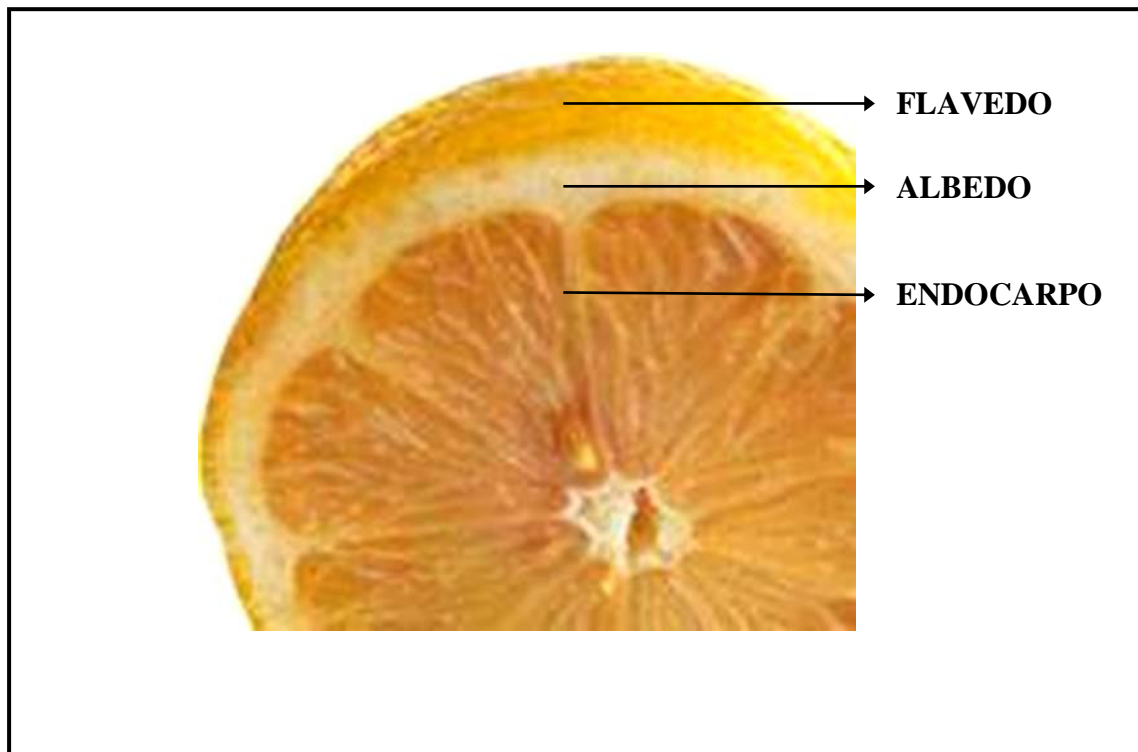


Figura 2.1 Zonas básicas de la naranja: a) flavedo; b) albedo; c) endocarpo.

corresponde a la porción interior de los carpelos, los cuales son segmentos cerrados que contienen vesículas con jugo y semillas (Davies y Albrigo, 1994). El número de gajos de la naranja es igual o superior a siete. En su estado maduro, el fruto alcanza un diámetro de 6 a 10 centímetros y un peso sin cáscara de 150 a 200 gramos.

2.1.5 Composición de la Naranja

En general, la naranja está conformada en una gran cantidad por agua, contiene niveles moderados de proteínas y es un alimento bajo en grasas (Tabla 2.4). Se le considera una buena fuente de fibra y vitamina C. Los principales carbohidratos incluyen monosacáridos como la glucosa y fructosa; oligosacáridos como la sucrosa; y polisacáridos como las pectinas (Davies y Albrigo, 1994). En la naranja se encuentran también presentes pequeñas cantidades de compuestos bioactivos, tales como terpenos, ácidos fenólicos y flavonoides, todos ellos compuestos orgánicos no nutrientes, con reconocidas propiedades benéficas para la salud humana.

La composición de los frutos cítricos varía para cada zona o tipo de tejido. En la Tabla 2.4 se presenta la composición nutricional de la cáscara de naranja. El albedo de la cáscara es rico en celulosa, hemicelulosa, lignina, sustancias pécticas y compuestos fenólicos (Ligor y Buszewski, 2003); por su parte, los constituyentes más importantes del flavedo son compuestos carotenoides y aceites (Cancalon, 1994).

El contenido total de carotenos es de 30 a 300 mg/kg de cáscara de naranja fresca (Fálder Rivero, 2003), siendo la violaxantina el pigmento carotenoide más abundante en cáscara de naranja dulce madura (Rodrigo *et al.*, 2004). El aceite esencial contenido en el flavedo varía en un rango de 0.5 a 3.0 kg/Ton de naranja. Está compuesto por terpenos (>90 %), compuestos oxigenados y compuestos no volátiles. Los principales terpenos presentes en el aceite de naranja son el limoneno y el α -pineno y los principales compuestos oxigenados son el linalol y el decanol (Díaz *et al.*, 2005). Tanto en el flavedo como en el albedo de la cáscara se encuentran presentes flavonoides (Tabla 2.5).

Tabla 2.4 Composición nutricional de naranja Valencia. Cantidad contenida en 100 g.

NUTRIENTE	UNIDADES	NARANJA CON CÁSCARA ^a	NARANJA SIN CÁSCARA ^a	CÁSCARA DE NARANJA
Proximal – Componentes principales				
Agua	g	82.30	86.75	72.50
Energía	kcal	63	47	97
Proteínas	g	1.3	0.94	1.50
Lípidos totales	g	0.30	0.12	0.20
Cenizas	g	0.60	0.44	0.80
Carbohidratos ^b	g	15.50	11.75	25.00
Fibra total dietaria	g	4.5	2.4	10.6
Azúcares, total	g	----	9.35	----
Minerales				
Calcio	mg	70	40	161
Hierro	mg	0.80	0.10	0.80
Magnesio	mg	14	10	22
Fósforo	mg	22	14	21
Potasio	mg	196	181	212
Sodio	mg	2	0	3
Zinc	mg	0.11	0.07	0.25
Cobre	mg	0.057	0.045	0.092
Manganeso	mg	----	0.025	----
Selenio	mcg	0.7	0.5	1.0
Vitaminas				
Vitamina C	mg	71.0	53.2	136.0
Tiamina	mg	0.100	0.087	0.120
Riboflavina	mg	0.050	0.040	0.090
Niacina	mg	0.500	0.282	0.900
Ácido Pantoténico	mg	0.330	0.250	0.490
Vitamina B-6	mg	0.093	0.060	0.176
Folatos, total	mcg	30	30	30
Colina, total	mg	----	8.4	----
Vitamina A	IU	250	225	420
Vitamina E	mg	----	0.18	0.25
Otros				
Beta-caroteno	mcg	----	71	----
Alfa-caroteno	mcg	----	11	----
Beta-criptoxantina	mcg	----	116	----
Luteína + zeaxantina	mcg	----	129	----

^a Sin semillas. ^b Por diferencia.

Fuente: USDA, 2007. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 20.

Tabla 2.5 Concentración de flavonoides en flavedo, albedo y cáscara de naranja variedad Valencia (mg por 100g de peso fresco).

FLAVONOIDE	FLAVEDO	ALBEDO	CÁSCARA ^a
Flavanonas			
Eriocitrina	8.2	3.6	5.9
Neoeriocitrina	0.0	0.0	0.0
Narirutina	13.3	118	66.5
Naringina	0.0	0.0	0.0
Hesperidina	495	2300	1410
Neohesperidina	0.0	0.0	0.0
Neoponcirina	10.1	73.0	42.1
Poncirina	0.0	0.0	0.0
Flavonas			
Rutina	0.0	0.0	0.0
Isorroifolina	2.3	0.0	1.1
Roifolina	11.8	0.0	5.8
Diosmina	11.1	0.0	5.5
Neodiosmina	6.0	0.0	3.0
Flavonas Polimetoxiladas			
Sinensetina	64.6	4.5	34.0
Nobiletina	33.7	3.1	18.1
Tangeretina	15.7	1.6	8.5
Heptametoxiflavona	4.1	0.0	2.0

^a Datos calculados a partir de los resultados experimentales de flavedo y albedo.

Fuente: Nogata *et al.*, 2006.

2.2 Flavonoides

Los compuestos bioactivos son sustancias químicas extraídas de plantas, animales o microorganismos, que causan un efecto biológico en los organismos vivos. En las plantas, estos compuestos son metabolitos secundarios producidos por ellas para su defensa y supervivencia. La función principal que se les atribuye es la de protección de la planta del ataque de herbívoros e infecciones microbianas o virales, aunque también parecen participar como atrayentes de insectos polinizadores y como sustancias de reserva energética (López, 1991).

Debido a la diversidad de sus actividades biológicas, los compuestos bioactivos vegetales tienen aplicación en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética y agrícola. Químicamente se clasifican en tres grupos principales: i) terpenoides, ii) compuestos fenólicos, entre los que se encuentran los flavonoides, y iii) alcaloides.

2.2.1 Aspectos Generales de los Flavonoides

Los flavonoides constituyen el subgrupo de compuestos fenólicos más destacado. Son compuestos de bajo peso molecular, solubles en agua, que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Rooprai *et al.*, 2003). Generalmente están presentes en las plantas en forma de glicósidos, aunque también se les puede encontrar como agliconas libres. La glicosilación hace al flavonoide menos reactivo y más soluble en agua, lo que permite su almacenamiento en las vacuolas celulares (Robards y Antolovich, 1997). En una misma planta se puede encontrar un aglicón flavonoide en varias combinaciones glicosídicas (Valencia, 1995).

Los compuestos flavonoides comparten una estructura química común (C₆-C₃-C₆), conformada por dos anillos aromáticos (A y B), unidos entre sí por tres átomos de carbono que forman un anillo heterocíclico oxigenado (C) (Manach *et al.*, 2004). De acuerdo con la sustitución del anillo C, su estado de oxidación, y la posición del anillo

B, los flavonoides se pueden clasificar en seis subclases principales: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles. A su vez, dentro de estas subclases se distinguen distintos compuestos. A la fecha se han aislado más de cinco mil flavonoides diferentes (Yao *et al.*, 2004).

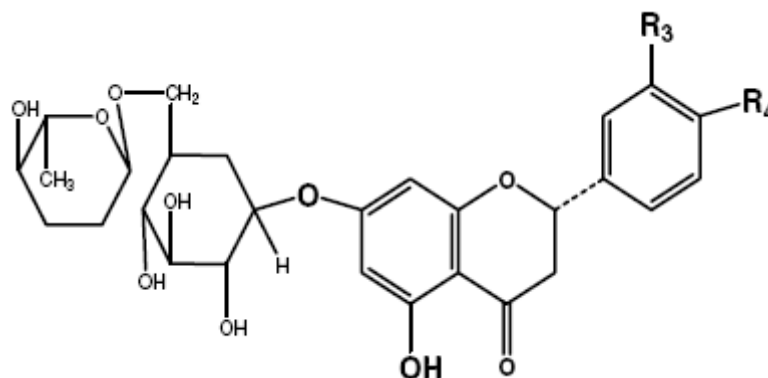
En las últimas décadas se ha incrementado el interés en los posibles efectos benéficos a la salud humana de los flavonoides, motivado principalmente por la actividad antioxidante observada *in vitro* e *in vivo* de estos compuestos (Yao *et al.*, 2004). Esta propiedad antioxidante depende básicamente de su capacidad de captación de radicales libres y de su actividad quelante de metales. Asimismo, estudios recientes han mostrado que los flavonoides poseen actividades antiinflamatorias, antivirales, antiproliferativas y anticarcinogénicas, que les confieren un gran potencial terapéutico (Rooprai *et al.*, 2003, Benavente-García *et al.*, 1997). Benavente-García *et al.* (1997), reportaron también propiedades antiagregantes, antiadhesivas y vasodilatadoras de estos compuestos.

2.2.2 Flavonoides Cítricos

Los flavonoides constituyen una clase muy importante de compuestos bioactivos en las especies cítricas, en razón de sus propiedades biológicas y de las cantidades significativas que contienen. Entre las características que exhiben destacan sus actividades anticáncer y antiinflamatoria como dos de las principales áreas de investigación biomédica (Manthey *et al.*, 2001).

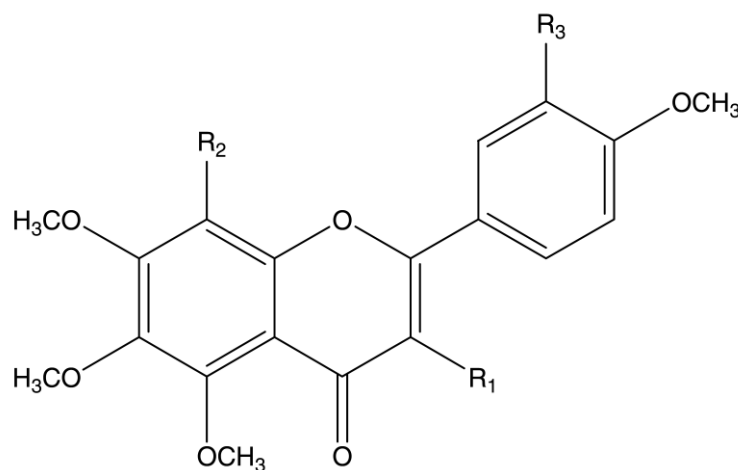
La concentración más alta de flavonoides en los frutos cítricos se presenta en la cáscara (1.7-2.0 % en peso seco) (Manthey y Grohmann, 1996). Los principales flavonoides contenidos en la cáscara de naranja dulce (*Citrus sinensis*) son las flavanonas glicosiladas: hesperidina y narirutina, localizadas principalmente en el albedo; y las flavonas polimetoxiladas: sinensetina, hexametil éter quercetagetina, nobiletina, tetrametil escutellareina, 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona y tangeretina, presentes en el flavedo (Manthey, 2006; Del Río *et al.*, 2004) (Figura 2.2).

FLAVANONAS GLICOSILADAS



	R ₃	R ₄
Hesperidina	OH	OCH ₃
Narirutina	H	OH

FLAVONAS POLIMETOXILADAS



	R ₁	R ₂	R ₃
Sinensetina	H	H	OCH ₃
Hexametil éter quercetagetina	OCH ₃	H	OCH ₃
Nobiletina	H	OCH ₃	OCH ₃
Tetrametil escutellareina	H	H	H
3,5,6,7,8,3',4'- Heptametoxiflavona	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
Tangeretina	H	OCH ₃	H

Figura 2.2 Principales flavonoides presentes en la cáscara de naranja *Citrus sinensis*.

La hesperidina es el flavonoide preponderante en la cáscara y partes membranosas de la naranja *Citrus sinensis*. La actividad biológica reportada a la fecha de este flavonoide incluye propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antihipertensivas, antimicrobianas, hipolipidémicas, anticarcinogénicas y vasodilatadoras (Etcheverry *et al.*, 2008).

Estudios realizados con hesperidina como compuesto puro mostraron que la hesperidina por si sola, o en combinación con la flavona cítrica diosmina, es un efectivo inhibidor del cáncer oral, de esófago y de colon en roedores, y sugirieron su uso potencial en humanos (Tanaka *et al.*, 1998). Otras investigaciones hechas en roedores mostraron que la administración de jugos de cítricos redujo el cáncer de colon en un 22 % (Miyagi *et al.*, 2000) y el cáncer de pulmón en un 29 % (Kohno *et al.*, 2001). En las dos investigaciones, el efecto benéfico de los jugos se atribuyó a su alto contenido de hesperidina.

En un estudio reciente hecho por Jung *et al.* (2006), se administró por separado un suplemento de hesperidina y otro de naringina a ratones diabéticos tipo 2. Los resultados obtenidos sugieren que tanto la hesperidina como la naringina mejoran la hiperlipidemia e hiperglicemia en animales con diabetes tipo 2, regulando el metabolismo de ácidos grasos y colesterol y afectando la expresión génica de enzimas reguladoras de glucosa.

La hesperidina, suministrada junto con otros flavonoides, se usa en el tratamiento de pacientes que presentan desórdenes vasculares, característicos de enfermedades como la insuficiencia venosa crónica y hemorroides. En tales casos, actúa reduciendo la fragilidad y permeabilidad capilar (Garg *et al.*, 2001).

Las flavonas polimetoxiladas son un grupo de flavonoides agliconas característico de los frutos cítricos, presentes principalmente en naranja y mandarina (Manthey *et al.*, 2001). Estos flavonoides son compuestos relativamente lipofílicos, escasamente solubles en agua (Wang *et al.*, 2008). Se encuentran en el flavedo de la cáscara, asociados con las glándulas de aceite (Widmer y Montanari, 1994). El contenido de flavonas

polimetoxiladas reportado en aceites esenciales de cáscara de naranja y mandarina es 200 a 500 veces mayor que el encontrado en los jugos de estos cítricos (Mouly *et al.*, 1999).

Las flavonas polimetoxiladas se encuentran en la cáscara de los cítricos en concentraciones mucho más bajas que las flavanonas glicosiladas, sin embargo, han suscitado un gran interés farmacológico por su superior actividad biológica (Del Río *et al.*, 2004; Benavente-García, *et al.*, 1997). La naturaleza lipofílica de los grupos metoxilo les confiere una mayor permeabilidad a través del intestino delgado y les permite una rápida absorción en el sistema circulatorio (Li *et al.*, 2006).

Si bien muchos flavonoides han mostrado una fuerte actividad antitumor en investigaciones realizadas en roedores y en líneas celulares humanas, las flavonas polimetoxiladas han resultado ser inhibidores más potentes del crecimiento de células tumorales que los flavonoides hidroxilados. Las flavonas polimetoxiladas poseen, además, potentes actividades anti-invasivas y anti-metastásicas (Pan *et al.*, 2002).

Manthey y Guthrie (2002), evaluaron las actividades antiproliferativas de distintas subclases de flavonoides cítricos en seis líneas celulares cancerígenas de humano: cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de colon, melanoma, cáncer de seno con receptor de estrógeno positivo y cáncer de seno con receptor de estrógeno negativo. El estudio incluyó flavonas polimetoxiladas naturales y sintéticas, agliconas de flavonas hidroxiladas, agliconas de flavanonas hidroxiladas, flavonas glicosiladas y flavanonas glicosiladas. Los resultados mostraron que las flavonas polimetoxiladas naturales y sintéticas exhibieron las actividades antiproliferativas más altas contra las seis líneas celulares de cáncer.

Las flavonas polimetoxiladas nobiletina y tangeretina, se consideran dos de los flavonoides más efectivos en la inhibición de proliferación de células cancerígenas humanas. Kandaswami *et al.* (1991), examinaron los efectos de quercetina, taxifolina

(dihidroquercetina), nobiletina y tangeretina, en el crecimiento *in vitro* de células humanas de carcinoma escamocelular. Los resultados obtenidos mostraron que la nobiletina y tangeretina inhibieron el crecimiento canceroso, en tanto que la quercetina y la taxifolina no presentaron una actividad de inhibición significativa. La nobiletina y la tangeretina han mostrado ser también inhibidores de la proliferación celular en líneas de células humanas de gliosarcoma, leucemia, melanoma, cáncer colorrectal, carcinoma gástrico y carcinoma de pulmón (Morley *et al.*, 2007).

La producción excesiva de óxido nítrico en el organismo humano se ha relacionado con condiciones fisiopatológicas, tales como inflamación, carcinogénesis y aterosclerosis. Choi *et al.* (2007), compararon las actividades inhibitoras de producción de óxido nítrico de los flavonoides naringina, naringenina, hesperidina, hesperetina, rutina, nobiletina y tangeretina, contenidos en extractos de cáscara de veinte especies cítricas. De los flavonoides evaluados, la nobiletina exhibió la actividad inhibitora de producción de óxido nítrico más potente. Lo anterior sugiere el uso de la nobiletina en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, resultantes de la sobreproducción de óxido nítrico. Otras investigaciones publicadas (Wilcox *et al.*, 2001; Kurowska y Manthey, 2004), han reportado que los flavonoides cítricos tienen la capacidad de reducir la producción hepática de lipoproteínas que contienen colesterol, y de disminuir, en consecuencia, los niveles de colesterol total en plasma, lo que podría reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares. El estudio realizado por Kurowska y Manthey (2004), evaluado en hamsters alimentados con dieta hipercolesterolémica, indicó que el efecto hipocolesterolémico *in vivo* de la formulación de flavonas polimetoxiladas conteniendo principalmente tangeretina, fue mayor que el mostrado por las flavanonas glicosiladas hesperidina y naringina.

2.2.3 Patentes y Productos Comerciales Relacionados

Las patentes son una fuente relevante de información, indicativa de la capacidad de transferencia a la industria de investigaciones científicas novedosas, y de la posibilidad

de explotación comercial de las mismas. En el presente trabajo se anexan los resultados obtenidos de una búsqueda de patentes y solicitudes de patente, concerniente a aplicaciones biomédicas de los principales flavonoides presentes en la cáscara de naranja *Citrus sinensis*: hesperidina (Anexos A y B) y flavonas polimetoxiladas (Anexos C y D).

Las patentes citadas señalan el uso de hesperidina como ingrediente activo principal de composiciones acuosas o tópicas, útiles en el tratamiento o prevención del herpes (US 5,849,786), así como su inclusión en pasta de dientes o enjuague bucal, efectivos en el tratamiento de la gingivitis (US 4,559,224), y en composiciones oftalmológicas de limpieza y desinfección de lentes de contacto (EP 0 883 408 B1).

La patente US 5,763,414 reivindica un método inhibitorio de reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA), útil para el tratamiento de hipercolesterolemia en humanos, el cual consiste en la administración de cantidades efectivas de hesperidina o de su aglicona hesperetina. La inhibición de reductasa HMG-CoA reduce la velocidad de biosíntesis de colesterol en el hígado.

Otra de las invenciones presenta el uso de hesperidina o de uno de sus derivados, como ingrediente activo de una composición nutricional y de una composición farmacéutica, estimulantes de la formación de huesos y/o inhibitoras de la resorción ósea (patente EP 1 536 806 B1 y solicitud de patente PCT/FR2003/002005). Por otra parte, la solicitud de patente PCT/MX2008/000119 describe una composición farmacéutica compuesta por una fracción flavonoide purificada micronizada de diosmina y hesperidina, y por dobesilato de calcio, tres agentes con actividad venotónica y vasoprotectora, como una combinación sinérgica útil en el tratamiento de la insuficiencia crónica venosa y enfermedades relacionadas.

La actividad anticáncer de los extractos de cáscara de naranja se ha señalado en la patente US 7,201,928 B1, la cual reivindica composiciones y métodos que inhiben el crecimiento de células tumorales, aplicables en el tratamiento de cáncer de colon en

humanos. La invención destaca a las flavonas polimetoxiladas tangeretina y nobiletina como los principales componentes del extracto, pudiendo también incluirse en la composición otras flavonas polimetoxiladas.

En la patente US 6,251,400 B1 se describen métodos con aplicación en la prevención y tratamiento de enfermedades neoplásicas, aterosclerosis e hipercolesterolemia, consistentes en la administración de dosis efectivas de limonoides cítricos, solos o en combinación con flavonoides cítricos y tocotrienoles de aceite de palma. Los flavonoides cítricos usados en la invención son las flavonas polimetoxiladas nobiletina o tangeretina.

Las citocinas son sustancias de tipo proteico o glucoproteico que forman parte del sistema inmunológico humano. La patente US 6,184,246 B1 está dirigida a proporcionar un método de inhibición de producción de citocinas, útil en el tratamiento de desórdenes tales como el factor de necrosis tumoral alfa, o de enfermedades tales como el cáncer, reumatismo crónico, colitis ulcerosa, todos ellos causados o caracterizados por una excesiva o indeseable producción de citocinas. El tratamiento consiste en la administración de una cantidad efectiva, inhibidora de producción de citocinas, de una flavona polimetoxilada cítrica.

De acuerdo a la solicitud de patente US 11/690,683, los flavonoides cítricos también tienen aplicación en el tratamiento de la obesidad, diabetes y síndrome metabólico. Los compuestos, particularmente flavonas polimetoxiladas suministradas como extracto de cáscara de naranja, actúan reduciendo la actividad de la enzima 11Beta-HSD1. El extracto de cáscara de naranja debe incluir una o más de las flavonas polimetoxiladas nobiletina, tangeretina y sinensetina.

En las Tablas 2.6 y 2.7 se presentan productos comerciales farmacéuticos que contienen como ingrediente activo hesperidina y flavonas polimetoxiladas, respectivamente.

Tabla 2.6 Productos comerciales que contienen hesperidina.

PRODUCTO	COMPOSICIÓN (PRINCIPIO ACTIVO)	COMPAÑÍA
Daflon® 500 mg	Fracción flavonoica purificada y micronizada equivalente a 450 mg de Diosmina y 50 mg de Hesperidina.	Laboratorios Servier, S.L. www.servier.com
Venodiol	Por tableta: Diosmina, 450 mg; Hesperidina, 50 mg; Ácido ascórbico, 100 mg.	World Medicine Ltd. www.worldmedicine.ge
DiosVein™	Fuente de bioflavonoides derivados de naranja dulce. Por cápsula: Diosmina (de DiosVein™), 500 mg; Hesperidina (de cáscara de cítricos), 100 mg.	Berg Imports LLC www.swansonvitamins.com cai@bergimports.com
Best Vein Support featuring DiosVein™	Por cápsula vegetal: Vitamina K2 (como MenaQ7™), 25 mcg; DiosVein™ Diosmina EP (mínimo 90%), 450 mg; Extracto natural de naranja (estandarizado a un mínimo de 97 % de hesperidina), 50 mg.	Doctor's Best, Inc. www.drbrvitamins.com
Vein Matrix™	Por dos cápsulas vegetales: Vitamina C (ácido ascórbico), 100 mg; Extracto de castaño de Indias (estandarizado a 20 % de Aescin), 500 mg; Diosmina, 450 mg; Rusco, 300 mg; Hesperidina (de cáscara de cítricos), 50 mg; Extracto de hoja de Gotu Kola, 30 mg.	New Vitality www.newvitality.com

Tabla 2.6 Productos comerciales que contienen hesperidina. (cont.)

PRODUCTO	COMPOSICIÓN (PRINCIPIO ACTIVO)	COMPAÑÍA
FlavoPlex C™	<p>Combinación de vitamina C con flavonoides puros y extracto de semilla de uva.</p> <p>Por 2 cápsulas: Vitamina C (como ascorbato de calcio), 420 mg; Calcio (como ascorbato), 48 mg; Hesperidina, 300 mg; Hesperidina metil chalcona, 200 mg; Extracto de semilla de uva, 100 mg; Extracto de cereza de invierno, 180 mg; Naringina, 100 mg.</p>	<p>Interplexus, Inc. www.interplexus.com</p>
Hist-O-Cal	<p>Por tableta: Vitamina A (como acetato), 5,000 i.u.; Ácido pantoténico (D-pantotenato de calcio), 50 mg; Calcio (como ascorbato), 59 mg; Complejo de hesperidina, 50 mg; L-tirosina, 25 mg; Betaína HCL, 30 mg; Adrenal, 50 mg; Pulmón, 20 mg; Hígado, 20 mg; Timo, 10 mg; Fenogreco (semilla), 50 mg; Aloe vera (hoja), 10 mg.</p>	<p>Nutri-West, Inc. www.nutriwest.com</p>
Kal Bioflavonoid Complex	<p>Cada tableta contiene: Concentrado de hesperidina (de limón [<i>Citrus limonium</i>], naranja [<i>Citrus sinensis</i>], toronja [<i>Citrus paradisi</i>]), 60 mg; Complejo de bioflavonoides (de limón [<i>Citrus limonium</i>], naranja [<i>Citrus sinensis</i>], toronja [<i>Citrus paradisi</i>]), 1000 mg.</p>	<p>HerbsMD www.herbsmd.com</p>

Tabla 2.6 Productos comerciales que contienen hesperidina. (cont.)

PRODUCTO	COMPOSICIÓN (PRINCIPIO ACTIVO)	COMPAÑÍA
Kal C 1000 Complex	Vitamina C (como ácido ascórbico), 1000 mg; Concentrado de rutina, 100 mg; Rosa mosqueta, 100 mg; Concentrado de hesperidina, 100 mg; Concentrado de bioflavonoides, 500 mg.	Nutraceutical Corporation www.nutraceutical.com
Hesper C	Por cápsula: Hesperidina, 360 mg; Ácido ascórbico (vitamina C), 200 mg; Rutósidos, 25 mg; Bisulfito sódico menadioma (vitamina K), 2.5 mg.	Laboratorios Unidos, S.A. www.cmp-trujillo.org.pe laboratoriosunidos @infonegocio.net.pe

Tabla 2.7 Productos comerciales que contienen flavonas polimetoxiladas.

PRODUCTO	COMPOSICIÓN (PRINCIPIO ACTIVO)	COMPAÑÍA
Citri-Z™	Extracto derivado de cítricos y estandarizado a un contenido no menor de 30 % de flavonas polimetoxiladas.	Next Pharmaceuticals, Inc. www.nextpharmaceuticals.com
Nexrelief™	Compuesto por Nexrutine® (extracto de la planta <i>Phellodendron</i>) y Citri-Z™ (extracto natural de cítricos con al menos 30 % de flavonas polimetoxiladas). Por cápsula: Nexrutine®, 500 mg; Citri-Z®, 50 mg.	Next Pharmaceuticals, Inc. www.nextpharmaceuticals.com
Flavoxine™	Mezcla de extracto de corteza de árbol (<i>Phellodendron amurense</i>), y de extracto estandarizado de flavonas polimetoxiladas de cáscara de naranja (<i>Citrus sinensis</i>). Por cápsula: Flavoxine™, 370 mg.	Next Pharmaceuticals, Inc. www.nextpharmaceuticals.com
Citrofen™	Mezcla de extracto de corteza de árbol (<i>Phellodendron amurense</i>), y de extracto de flavonas polimetoxiladas de cáscara de naranja <i>Citrus sinensis</i> . Por cápsula: Citrofen™, 370 mg.	Next Pharmaceuticals, Inc. www.nextpharmaceuticals.com

Tabla 2.7 Productos comerciales que contienen flavonas polimetoxiladas. (cont.)

PRODUCTO	COMPOSICIÓN (PRINCIPIO ACTIVO)	COMPAÑÍA
CitruXine PMF™	<p>Extracto de naranja <i>Citrus sinensis</i> estandarizado a un contenido no menor de 30 % de flavonas polimetoxiladas.</p> <p>Por cápsula: CitruXine PMF™ (<i>Citrus</i> extract), 400 mg.</p>	Xymogen, Inc. www.xymogen.com
Sytrinol™	<p>Complejo de flavonas polimetoxiladas cítricas (naranja y mandarina) y tocotrienoles de fruta de palma (<i>Elaeis guineensis</i>).</p> <p>Por softgel: Sytrinol™, 150 mg.</p>	SourceOne Global Partners www.source-1-global.com
Cardio Pro	<p>Fórmula compuesta de Sytrinol, esteroides de planta y extracto de granada.</p> <p>Por dos cápsulas: Esteroides de planta (Fitoesteroides) (de soya), 400 mg; Sytrinol™ (extracto de flavonas polimetoxiladas de frutas cítricas y tocotrienoles de fruta de palma), 150 mg; Extracto estandarizado de granada (fruta) (estandarizado a 40 % de ácido eláxico), 50 mg.</p>	ProAdjuster LifeStyle www.proadjusterlifestyle.com
Cholestin®	<p>Ingredientes activos: Tocotrienoles y flavonas polimetoxiladas de frutas cítricas; geraniol; lípidos marinos.</p>	Pharmanex, Inc. www.pharmanex.com

Tabla 2.7 Productos comerciales que contienen flavonas polimetoxiladas. (cont.)

PRODUCTO	COMPOSICIÓN (PRINCIPIO ACTIVO)	COMPAÑÍA
ArthroMax™	<p>Por cuatro cápsulas: Sulfato de glucosamina (derivado de crustáceos), 1000 mg; N-acetil-D-glucosamina (derivado de crustáceos), 1000 mg; Metilsulfonilmetano (MSM), 1000 mg; Mezcla de extractos naturales de cítricos conteniendo nobiletina y tangeretina, y de fruta de palma, 300 mg; 5-Loxin® (estandarizado para un mínimo de 30 % en base seca de ácido 3-O-acetil-11-ceto-β-boswelico), 75 mg.</p>	<p>Life Extension myhealthonline.com</p>
Citricoma™	<p>Combinación de flavonas polimetoxiladas (extracto de cáscara de naranja) y <i>Eurycoma Longifolia</i> (extracto).</p> <p>Por dos cápsulas: Citricoma™, 200 mg.</p>	<p>HP Ingredients www.hpingredients.com</p>

2.3 Técnicas de Extracción de Flavonoides

La extracción con solventes orgánicos ha sido la técnica tradicionalmente usada para el aislamiento de flavonoides de muestras vegetales. El método se basa en la separación por difusión de los compuestos solubles, originalmente presentes en el tejido vegetal, haciendo uso de un solvente orgánico (Escribano-Bailon y Santos Buelga, 2003). La materia prima se puede usar fresca, congelada o seca, y debe ser macerada o molida antes de su extracción. Los solventes de extracción de compuestos fenólicos más usados son el metanol, el etanol y las mezclas metanol o etanol-agua (Ziaková y Brandšteterová, 2002). El tipo y volumen de solvente, así como el número de tratamientos repetitivos dados a la muestra, son factores importantes a considerar para una extracción eficiente de flavonoides por este procedimiento.

Otra técnica convencional aplicada en la recuperación de flavonoides es la extracción en fase sólida. En este método, los compuestos químicos de interés son retenidos en un adsorbente sólido, y posteriormente son recuperados por elución con un disolvente adecuado (Wells, 2003). La principal ventaja de esta técnica es el requerimiento de volúmenes significativamente menores de solventes orgánicos. La extracción en fase sólida se aplica a la recuperación de compuestos de muestras líquidas.

Entre las nuevas técnicas de extracción de compuestos bioactivos de muestras sólidas y líquidas, se encuentra la extracción con fluidos supercríticos. Esta técnica es de reciente aplicación en la recuperación de flavonoides y otros compuestos fenólicos. La operación de extracción supercrítica de los compuestos se lleva a cabo en ausencia de luz y oxígeno, lo que minimiza procesos de degradación que se pueden presentar con las técnicas convencionales de extracción, como son oxidaciones e isomerizaciones de los compuestos (Escribano-Bailon y Santos Buelga, 2003); esto conduce a la obtención de extractos más estables, de mayor calidad y con incrementada vida de anaquel. El solvente más comúnmente usado en la extracción supercrítica es el bióxido de carbono, llevado a condiciones de operación superiores a las de su punto crítico (73.8 bar y 31.1

°C). La aplicación de temperaturas moderadas de extracción permite procesar materiales de productos naturales, los cuales en su generalidad son térmicamente inestables, sin alterar sus propiedades funcionales. Un fluido en estado supercrítico presenta una densidad similar a la de los solventes líquidos, a la vez que posee una difusividad más alta y una viscosidad menor a ellos. Además, a diferencia de un solvente líquido, un fluido supercrítico puede ajustar su densidad, y de ahí su poder disolvente (Wang y Weller, 2006). Estas características propias de los fluidos supercríticos, permiten reducir el tiempo de proceso y extraer de manera selectiva compuestos de interés.

La extracción acelerada con disolventes es otra de las nuevas técnicas desarrolladas en la obtención de compuestos fenólicos. Esta técnica, llamada también extracción presurizada con disolvente y extracción líquida presurizada, se aplica en la extracción de compuestos de muestras sólidas y semisólidas. En ella se usan temperaturas y presiones elevadas, en el rango de 50 a 200 °C y 10 a 15 MPa, respectivamente. Se le considera una técnica similar a la de extracción con fluidos supercríticos, pero, a diferencia de esta última, el solvente se mantiene por debajo de su punto crítico, en estado líquido. La alta temperatura de operación incrementa la difusividad del solvente y acelera la extracción de los compuestos (Wang y Weller, 2006).

2.4 Extracción con Fluidos Supercríticos

Un fluido supercrítico es una sustancia que ha sido llevada a condiciones de presión y temperatura superiores a su presión crítica (P_c) y temperatura crítica (T_c). En la Figura 2.3 se muestra el diagrama de fases de una sustancia pura. El punto crítico (P_c , T_c) es el punto final de la curva de coexistencia gas-líquido, y representa la máxima presión y temperatura en la que la fase gas (vapor) y la fase líquida de la sustancia están en equilibrio.

Un incremento simultáneo de presión y temperatura en una mezcla líquido-vapor, situada a lo largo de la curva donde coexisten en equilibrio el gas y el líquido, da lugar a

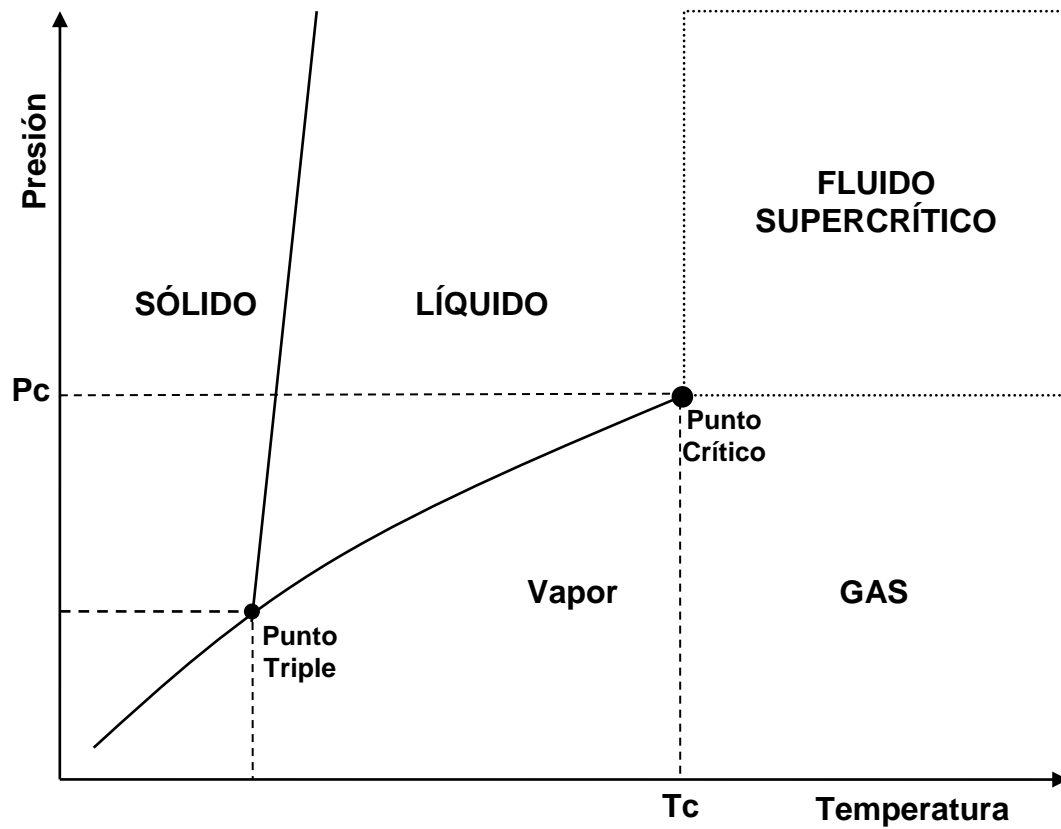


Figura 2.3 Diagrama de fases de una sustancia pura.

dos efectos: la densidad de la fase vapor aumenta debido al incremento de presión, y la densidad de la fase líquida disminuye a causa del incremento de temperatura. Finalmente, en el punto crítico la densidad de la fase líquida llega a ser igual a la densidad de la fase vapor y la distinción entre las fases desaparece (Clifford y Williams, 2000). En la región supercrítica sólo existe una fase: la de fluido supercrítico. En este estado, una compresión isotérmica del fluido da lugar un incremento de su densidad, pero no a la formación de líquido por condensación (Leitner, 2004). Un fluido supercrítico es también llamado un gas denso.

En el estado supercrítico, un fluido adquiere propiedades únicas, intermedias entre las de un gas y un líquido. Su densidad es similar a la de un líquido, su difusividad es más alta que la de un líquido, y su viscosidad es más cercana a la de un gas (Tabla 2.8). Estas características le confieren al fluido supercrítico importantes ventajas como solvente de extracción.

2.4.1 Propiedades de los Fluidos Supercríticos para la Extracción

La extracción supercrítica es un proceso de separación basado en la transferencia de masa entre una matriz sólida, la cual contiene el soluto de interés, y un fluido supercrítico, usado como solvente extractor. En la actualidad, esta técnica es considerada una importante alternativa a los procesos de extracción con solventes orgánicos, tradicionalmente usados en la obtención de compuestos naturales. La densidad de los fluidos supercríticos les confiere un poder solvente muy próximo al que tienen los solventes líquidos, y sus propiedades de transporte, parecidas a las de los gases, resultan mejores para la extracción que las de los solventes líquidos: su coeficiente de difusión más alto les permite una penetración más fácil y rápida en la muestra, y su menor viscosidad les posibilita un transporte más rápido del soluto extraído (Clifford y Williams, 2000). Además, la baja tensión superficial de los fluidos supercríticos, inferior a la de los líquidos, facilita su penetración en los sustratos porosos de tejidos vegetales (del Valle *et al.*, 2004), favoreciendo también la transferencia de masa.

Tabla 2.8 Propiedades físicas y de transporte de gases, líquidos y fluidos supercríticos.

ESTADO DEL FLUIDO	DENSIDAD (g/cm ³)	DIFUSIVIDAD (cm ² /s)	VISCOSIDAD (g/cm.s)
Gas P = 1 atm, T = 15-30 °C	(0.6–2.0) x 10 ⁻³	0.1–0.4	(0.6–2.0) x 10 ⁻⁴
Líquido P = 1 atm, T = 15-30 °C	0.6-1.6	(0.2-2.0) x 10 ⁻⁵	(0.2-3.0) x 10 ⁻²
Fluido Supercrítico P = P _c , T ≈ T _c	0.2-0.5	0.7 x 10 ⁻³	(1-3) x 10 ⁻⁴
P = 4 P _c , T ≈ T _c	0.4-0.9	0.2 x 10 ⁻³	(3-9) x 10 ⁻⁴

Fuente: Brunner, 2005.

El poder disolvente de un fluido supercrítico depende de su densidad, y en un proceso de extracción, ésta puede ser manipulada en un rango relativamente amplio de valores, sencillamente realizando pequeños cambios en la presión y temperatura de operación (Wang y Weller, 2006). Esto otorga a los fluidos supercríticos la posibilidad de ajustar su poder disolvente, y permite a la técnica supercrítica una extracción selectiva de los compuestos solubles de interés. Posteriormente, el fluido supercrítico puede ser separado fácilmente del soluto extraído, disminuyendo su poder disolvente con una reducción de presión.

2.4.2 Proceso de Extracción Supercrítica

La extracción supercrítica de compuestos naturales a partir de sustratos vegetales sólidos, se lleva a cabo usualmente poniendo en contacto un lecho fijo de sustrato con un flujo vertical continuo de solvente supercrítico. La fase sólida consiste del soluto y del residuo insoluble del sustrato, y la fase fluida es la solución del soluto en el solvente.

La extracción del soluto comprende las siguientes etapas (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006):

1. Transporte del fluido supercrítico a la superficie externa de la matriz sólida;
2. Penetración y difusión del fluido supercrítico en la matriz sólida;
3. Solubilización del soluto;
4. Transporte del soluto a través de la matriz sólida; y
5. Transporte del soluto de la superficie externa del sólido a la solución solvente (transferencia de masa externa).

En el curso de la extracción, diferentes tipos de compuestos naturalmente presentes en los aceites vegetales de los sustratos pueden ser extraídos simultáneamente a diferentes velocidades de extracción. La velocidad de extracción de los solutos dependerá de la transferencia de masa externa, de la difusividad efectiva del soluto en el sólido, de la solubilidad del soluto en el solvente supercrítico y del enlace del soluto en la matriz

sólida (del Valle *et al.*, 2005).

En general, el tratamiento dado al material vegetal, previo a la extracción supercrítica, comprende el secado y la reducción de tamaño de la materia prima. Si bien la humedad en la extracción de compuestos bioactivos polares puede actuar como cosolvente interno y ayudar con ello a incrementar el rendimiento de la extracción, la presencia de agua en los sustratos vegetales también puede dificultar el contacto entre los compuestos bioactivos de interés y el fluido supercrítico (King y France, 1992). Además, una humedad alta puede conducir a la formación de hielo y obstruir el sistema. De acuerdo a Eggers (1996), un contenido de humedad de hasta 12 % en el sustrato no afecta la transferencia de masa en la extracción supercrítica de aceites vegetales.

Por otra parte, la solubilidad operacional o solubilidad “aparente” del soluto en el fluido supercrítico, está en función de la solubilidad del soluto en el fluido a la presión y temperatura de extracción (solubilidad termodinámica), y de cómo el soluto está ligado a la matriz del sólido (del Valle *et al.*, 2005). Un proceso previo de molienda incrementa el área de contacto de las partículas sólidas con el solvente supercrítico, a la vez que libera el aceite de las paredes celulares fragmentadas, acercando la solubilidad operacional al valor límite de solubilidad termodinámica. En este caso, la velocidad de extracción del aceite libre, localizado en la superficie de las partículas fragmentadas del sustrato vegetal previamente molido, es controlada por la resistencia externa a la transferencia de masa, en tanto que la velocidad de extracción del aceite ligado a la matriz del sólido, localizado en las porciones interiores de las partículas no dañadas, o parcialmente dañadas con el pretratamiento, es controlada por la resistencia interna a la transferencia de masa (del Valle y de la Fuente, 2006).

2.4.3 Modelación de la Extracción Supercrítica

En la extracción supercrítica de lechos empacados de sustratos sólidos, el solvente fluye verticalmente a través del lecho fijo formado por partículas sólidas, y es saturado

gradualmente con el soluto extraído (Figura 2.4). De esta manera se presenta una transferencia de masa de la fase sólida hacia la fase fluida (Brunner, 1994). Se han desarrollado diferentes planteamientos de modelos matemáticos para describir la transferencia de masa en la extracción supercrítica de sustratos vegetales sólidos. Algunos de ellos, como el de Naik *et al.* (1998), son modelos empíricos que no consideran las interacciones entre el soluto y la matriz sólida y sólo describen el rendimiento en función del tiempo de extracción (Esquivel *et al.*, 1999). Para propósitos de escalamiento y diseño de procesos comerciales, los modelos de extracción supercrítica más adecuados son aquellos que se basan en ecuaciones diferenciales de balance de masa planteadas para una sección cilíndrica delgada del lecho empacado (del Valle *et al.*, 2000).

Un modelo para extracción de productos naturales desarrollado por Sovová (2005), incluye el concepto de células vegetales intactas y células vegetales fragmentadas por el pretratamiento de la muestra. El modelo se basa en las siguientes suposiciones: a) las partículas de sólido contienen células fragmentadas cerca de la superficie y células intactas en el centro; b) el soluto fácilmente accesible de las células fragmentadas se transfiere directamente a la fase fluida, en tanto que el soluto de las células intactas se difunde primero a las células fragmentadas y posteriormente a la fase fluida; c) la transferencia de masa de las células fragmentadas hacia el solvente, presenta un coeficiente de transferencia de masa de la fase fluida algunos órdenes de magnitud mayor, que el coeficiente de transferencia de masa relacionado con la difusión de las células intactas a las células fragmentadas; d) las características del lecho de extracción, el espacio vacío y el área superficial, no son afectados por la reducción de masa del sólido ocurrida durante la extracción, y la densidad del fluido no es afectada por el soluto disuelto en el solvente.

El balance de masa por unidad de volumen del lecho de extracción del modelo es planteado para un flujo tapón. Se considera una ecuación para el soluto en la fase fluida (Ec. 2.1); otra ecuación para la fase sólida con células fragmentadas (Ec. 2.2); y una

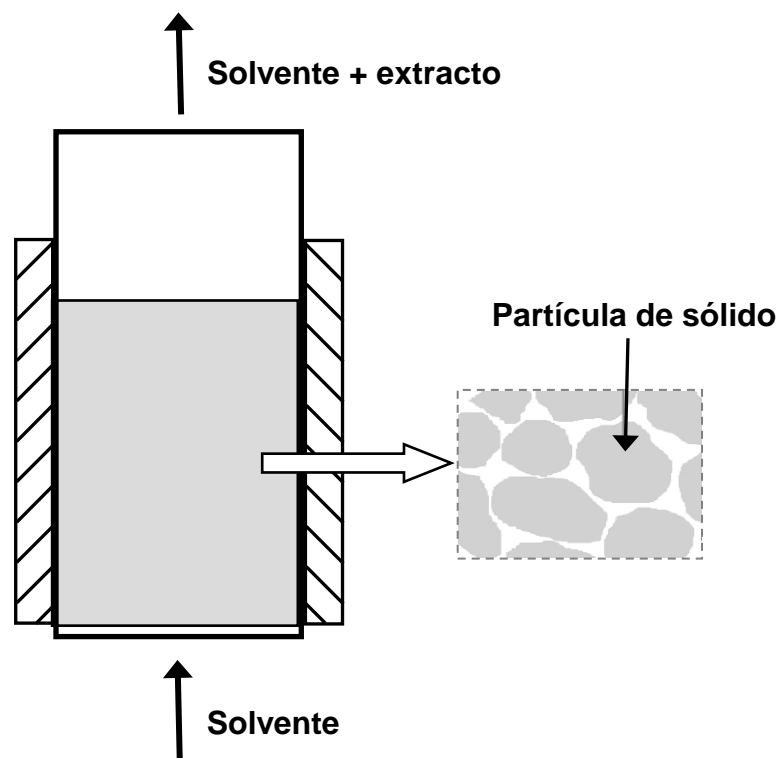


Figura 2.4 Representación esquemática de la extracción supercrítica de sustratos vegetales.

tercera para la fase sólida con células intactas (Ec. 2.3):

$$\rho_f \varepsilon \left(\frac{\partial y}{\partial t} + U \frac{\partial y}{\partial h} \right) = j_f \quad \text{Ec. (2.1)}$$

$$r \rho_s (1 - \varepsilon) \frac{\partial x_1}{\partial t} = j_s - j_f \quad \text{Ec. (2.2)}$$

$$(1 - r) \rho_s (1 - \varepsilon) \frac{\partial x_2}{\partial t} = -j_s \quad \text{Ec. (2.3)}$$

Donde: ρ_f es la densidad del solvente; ρ_s es la densidad del sólido; y es la concentración en la fase fluida; x_1 es la concentración en las células fragmentadas; x_2 es la concentración en las células intactas; t es el tiempo de extracción; h es la coordenada axial; ε es la fracción de espacio vacío; r es la eficiencia de la molienda (fracción de células fragmentadas); U es la velocidad intersticial del fluido; j_f es el flujo de las células fragmentadas hacia el solvente; j_s es el flujo de las células intactas hacia las células fragmentadas.

Un modelo general de transferencia de masa para sustratos sólidos descrito por del Valle *et al.* (2005), considera la difusión en el sólido (Ec. 2.4); el equilibrio entre fases en la superficie del sólido (Ec. 2.5); y la convección en la fase fluida (Ec. 2.6):

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} = \frac{De}{r^2} \left(r^2 \frac{\partial c_s}{\partial r} \right) \quad \text{Ec. (2.4)}$$

$$c_f^* = f(c_s) \quad \text{Ec. (2.5)}$$

$$\frac{\partial c_f}{\partial t} + U \frac{\partial c_f}{\partial z} - D_L \frac{\partial^2 c_f}{\partial z^2} = 3 \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{k_f}{R} (c_f^* - c_f) \quad \text{Ec. (2.6)}$$

El modelo está planteado para partículas de sólido esféricas. En el, c_s es la concentración del soluto en el sólido, o adsorbido en el sólido; c_f es la concentración del soluto en el fluido supercrítico; c_f^* es la concentración del soluto en una película de fluido supercrítico que está en equilibrio con la superficie del sólido; t es el tiempo de extracción; z es la posición axial en el lecho empacado; De es el coeficiente de difusión efectivo en el sustrato sólido; D_L es el coeficiente de dispersión axial del soluto; k_f es el coeficiente de transferencia de masa de la película; r es la posición radial en el interior de la partícula; R es el radio de las partículas sólidas esféricas; ε es la porosidad del lecho empacado; U es la velocidad superficial del solvente.

Este modelo general puede simplificarse no incluyendo algunos mecanismos de transferencia de masa que pudieran no tener efecto, o tener un efecto no significativo en el proceso. del Valle y de la Fuente (2006), evaluaron el posible efecto de la dispersión axial (D_L) en una extracción supercrítica industrial de aceites de semillas, a condiciones de 40° C, 300 bar, y usando un recipiente de extracción de 1 m³ con una relación longitud:diámetro de 4:1. En el estudio se concluyó que la dispersión axial no afectaría la velocidad de transferencia de masa de la extracción a nivel industrial.

Existen otros modelos de extracción supercrítica publicados en la literatura científica, cada uno adaptado para una descripción diferente de proceso. En un sustrato vegetal, los compuestos a extraer se encuentran en forma libre en la superficie del sólido, adsorbidos en la superficie exterior, localizados en el interior de los poros, o distribuidos en el interior de las células vegetales. La selección del modelo a aplicar deberá depender de la localización original de los compuestos en el sustrato, así como del análisis de los resultados de rendimiento obtenidos experimentalmente (Reverchon, 1997).

2.4.4 Propiedades del Bióxido de Carbono Supercrítico

El bióxido de carbono es el solvente más usado en la extracción supercrítica. Es inerte, no es tóxico, no es inflamable, su costo es bajo y se encuentra fácilmente disponible en alta pureza. Además, su punto crítico (73.8 bar y 31.1 °C) es relativamente bajo comparado al de los otros solventes.

La molécula de bióxido de carbono no tiene un momento bipolar neto, por lo que se le considera no polar y un buen disolvente de compuestos no polares. No obstante, el bióxido de carbono presenta en su molécula un momento cuadrupolar importante que le permite, a presiones altas, disolver en cierto grado sustancias ligeramente polares y algunas polares.

En términos generales, el poder solvente del bióxido de carbono presenta el siguiente comportamiento (Brunner, 2005; del Valle y Aguilera, 1999):

1. Disuelve compuestos no polares y ligeramente polares.
2. Su poder solvente con compuestos de bajo peso molecular es alto y disminuye con el aumento del peso molecular y con la presencia de grupos polares.
3. Los compuestos orgánicos oxigenados de mediano peso molecular, compuestos orgánicos no polares de bajo peso molecular y compuestos orgánicos polares de muy bajo peso molecular son completamente solubles.
4. Los ácidos grasos libres y sus glicéridos presentan bajas solubilidades.
5. Los pigmentos son aún menos solubles.
6. El agua, a temperaturas menores a 100 °C, tiene una baja solubilidad (< 0.5 % peso/peso) en bióxido de carbono supercrítico.
7. Las proteínas, polisacáridos, azúcares y sales minerales son insolubles.
8. A medida que la presión de extracción se incrementa, el bióxido de carbono supercrítico es capaz de extraer compuestos menos volátiles, de mayor peso molecular y/o mayor polaridad.

Por su baja temperatura crítica, cercana a la ambiente, el bióxido de carbono resulta el solvente más adecuado en la extracción supercrítica de compuestos bioactivos termolábiles. Sin embargo, los compuestos fenólicos y los alcaloides, por su carácter polar, son poco solubles en bióxido de carbono supercrítico (Wang y Weller, 2006). En estos casos, la adición de un cosolvente polar al fluido supercrítico podría incrementar la densidad de la mezcla de fluidos (bióxido de carbono-cosolvente), y contribuir a un aumento en la solubilidad de los compuestos.

2.4.5 Uso de Cosolventes en la Extracción con Fluidos Supercríticos

Un cosolvente es usualmente un solvente orgánico de volatilidad intermedia entre la del fluido supercrítico y la del soluto que se desea extraer, que se adiciona al solvente supercrítico con la finalidad de incrementar la solubilidad y extractabilidad de un compuesto.

El incremento de solubilidad por la adición de cosolvente se da principalmente por un incremento en la densidad del solvente, y/o por la formación de interacciones intermoleculares específicas entre el soluto y el cosolvente. La presencia de las interacciones soluto-cosolvente incrementan además la selectividad de extracción del compuesto (Güçlü-Üstündağ y Temelli, 2005).

En algunos casos, el cosolvente puede ser adsorbido en la superficie del sustrato; en estas circunstancias el cosolvente actúa previniendo la readsorción del compuesto que está siendo extraído (Williams *et al.*, 2002).

El metanol y el etanol son los cosolventes más frecuentemente usados en la extracción supercrítica de compuestos polares. Los dos tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo con compuestos fenólicos (Murga *et al.*, 2000); sin embargo, por su baja toxicidad, el etanol representa una mejor opción para la extracción de compuestos con actividad biológica.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

En el presente estudio se utilizó naranja *Citrus sinensis* variedad Valencia recolectada en una huerta en Guaymas, Sonora. Las naranjas se trasladaron en sacos convencionales a las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), en Hermosillo, Sonora. En este sitio se colocaron en cajas de cartón corrugado de 20 kg de capacidad, y se almacenaron en una cámara de refrigeración a una temperatura controlada de 4 °C.

Los reactivos usados en la experimentación fueron bióxido de carbono marca Infra (99.99% de pureza) adquirido localmente; etanol absoluto grado analítico (Merck México, S.A., Edo. de México); etilenglicol (Baker ACS, Edo. de México); dimetil sulfóxido (J.T. Baker, USA); metanol grado HPLC (Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Reino Unido); ácido fórmico (Fluka Chemie GmbH, Suiza); acetonitrilo grado HPLC (Fisher Scientific, NJ, USA), agua grado HPLC (suministrada localmente por CIAD); y los estándares: hesperidina, narirutina, sinensetina, tetrametil escutellareina, tangeretina (adquiridos a Indofine Chemical Company Inc., NJ, USA), y nobiletina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japón).

3.2 Metodología

La Figura 3.1 muestra la metodología seguida en el trabajo de tesis, descrita en las siguientes secciones de este capítulo.

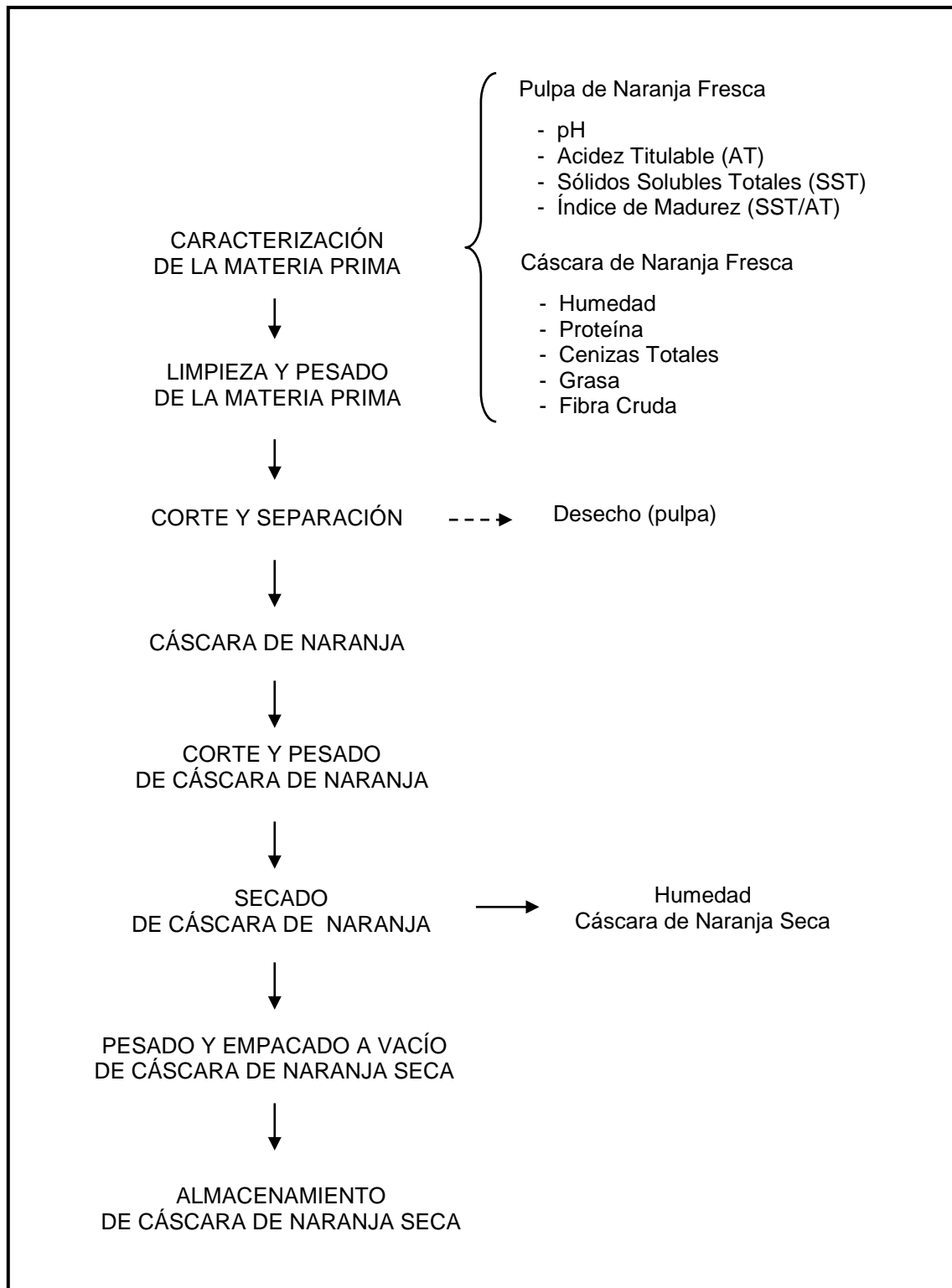


Figura 3.1 Metodología experimental desarrollada.

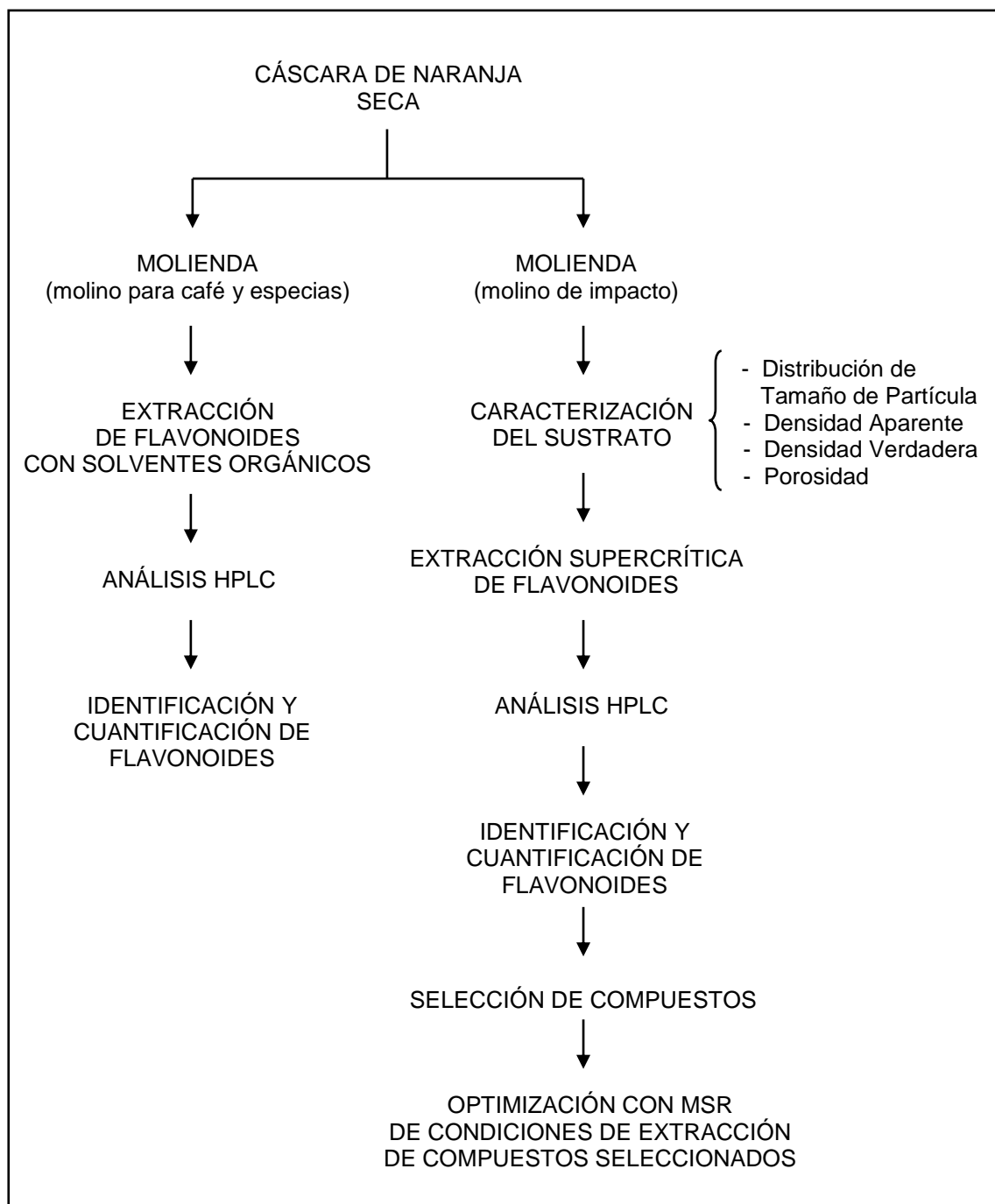


Figura 3.1 Metodología experimental desarrollada.

(cont.)

3.2.1 Caracterización de la Materia Prima

Para obtener información del estado de madurez de la naranja se determinaron los parámetros de pH, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT), y relación sólidos solubles totales y acidez titulable (SST/AT) en la pulpa de naranja fresca.

Los análisis fisicoquímicos de pH y acidez titulable se realizaron de acuerdo a la técnica propuesta por la A.O.A.C. (1990), homogenizando 10 g de muestra de pulpa de naranja con 50 ml de agua neutralizada. En ambas determinaciones se usó un titulador automático Mettler DL21 (Hightstown, N.J.). El valor de pH se midió en forma directa del homogenizado. La acidez titulable se determinó por titulación del homogenizado con una solución de NaOH 0.1 N, y los resultados se expresaron como porcentaje de ácido cítrico presente en la muestra.

El contenido de sólidos solubles totales, expresados como °Brix, se obtuvo colocando unas gotas del homogenizado en un refractómetro digital modelo PR-101, marca ATAGO (Tokio, Japón), calibrado previamente con agua bidestilada. Los resultados se multiplicaron por el factor de dilución y se reportaron como el porcentaje de sólidos solubles totales en el fruto.

El índice de madurez de la naranja se calculó como la relación entre el contenido de sólidos solubles totales y el valor obtenido de acidez titulable.

Por su parte, la cáscara de naranja fresca se caracterizó en términos del contenido de humedad, proteína, cenizas totales, grasa y fibra cruda, siguiendo los métodos oficiales de la AOAC (1997).

3.2.2 Preparación de la Muestra

Las naranjas (20kg) se lavaron con agua corriente, frotándose manualmente para

eliminar residuos de tierra y demás partículas presentes en la superficie del fruto. Se secaron con toallas de papel absorbente y se pesaron. Posteriormente, cada naranja se segmentó en cuatro porciones, haciendo un corte con cuchillo de acero inoxidable únicamente a la cáscara (flavedo y albedo). Los cuatro segmentos de cáscara se retiraron manualmente del fruto, se cortaron por la mitad y se pesaron.

En el secado de la cáscara se utilizó un secador de túnel (S/M), equipado con un controlador de temperatura DC1010 Honeywell y RTD de platino. La carga fue de alrededor de 4 kilogramos de trozos de cáscara de naranja. Para una distribución uniforme de la misma, en el interior del secador se colocaron dos estructuras de acero inoxidable con cinco niveles de malla cada uno, y se acomodaron 400 gramos de cáscara de naranja por malla aproximadamente.

Se ha observado que la concentración y actividad farmacológica de compuestos activos contenidos en plantas medicinales disminuye tanto con la aplicación de temperaturas altas de secado, como con tiempos de secado prolongados. Hevia y Tramón (2003), establecieron un rango máximo de temperatura en el secado de plantas medicinales de 35 a 45 °C. En el presente trabajo, la temperatura de secado de la cáscara de naranja se mantuvo a 40 °C (± 0.5 °C) y el tiempo de secado fue de 5 horas. El contenido de humedad de la cáscara seca se determinó tomando una muestra representativa de cada una de las mallas.

El lote de cáscara seca obtenida se pesó y se empacó cubierta con papel aluminio y protector para muestras con punta, en doble bolsa sellada al vacío. Posteriormente se almacenó en una cámara de refrigeración, a una temperatura de 4 °C hasta la etapa de molienda.

Mira *et al.* (1996), estudiaron el efecto del tamaño de partícula en la extracción supercrítica de aceite esencial de cáscara de naranja *Citrus sinensis* (L.), en un rango de 0.1 a 10 mm. De acuerdo a los resultados reportados, los tamaños de partícula de menos

de 2 mm resultaron adecuados para una rápida extracción de los compuestos. En base a lo anterior, en el presente estudio se determinó usar una distribución de tamaño de partícula de 1 a 2 mm. La operación de molienda de la cáscara se realizó en un molino de impacto marca URSHEL modelo 3600 (Valparaiso, Ind., USA), utilizando un tamiz de 0.09 pulg (2.28 mm) de diámetro de abertura.

3.2.3 Caracterización del Sustrato

Para obtener la distribución de tamaño de partícula de la cáscara de naranja a utilizar en la extracción de flavonoides con CO₂ supercrítico (1 a 2 mm), la cáscara seca molida se colocó en un agitador de tamices Meinzer II (Fairfax, VA). En la operación se utilizaron tamices ASTM E-11 número 8 (2.36 mm), 10 (2 mm), 12 (1.7 mm), 14 (1.4 mm), 16 (1.18 mm), 18 (1 mm) y 20 (0.85 mm).

Las determinaciones de densidad aparente y verdadera, así como de porosidad del sustrato a usar en la extracción supercrítica de compuestos bioactivos, se realizaron de acuerdo a la metodología propuesta por del Valle *et al.* (2004b). La densidad aparente del lecho empacado, esto es, de la muestra a cargar en el extractor supercrítico, se determinó gravimétricamente pesando la cáscara seca molida que había sido previamente cargada sin presionar en una probeta cilíndrica graduada de 25 ml. Para la determinación de la densidad verdadera se procedió de igual manera, con la diferencia de que en esta ocasión, la muestra se molió finamente y se cargó en la probeta compactándola fuertemente.

La porosidad del lecho empacado (ε), se determinó de acuerdo a la Ec. (3.1):

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_b}{\rho_s} \quad \text{Ec. (3.1)}$$

Donde:

ρ_b es la densidad aparente del lecho empacado (kg/m^3).

ρ_s es la densidad verdadera del sustrato sólido (kg/m^3).

3.2.4 Extracción Supercrítica de Flavonoides

La extracción de flavonoides de cáscara de naranja se hizo utilizando un sistema de extracción con fluidos supercríticos Thar Technologies Inc. SFE 5000 F3 (Pittsburgh, PA), adaptado a un tamaño de recipiente de extracción de 100 ml, y usando bióxido de carbono (CO_2) como fluido extractor y etanol como cosolvente (Figura 3.2).

En una operación semicontinua de extracción supercrítica, si el flujo del solvente a través del sustrato se realiza en sentido ascendente, la convección natural puede afectar de manera negativa la velocidad de extracción de los compuestos de interés (Germain *et al.*, 2005). La aplicación en la operación supercrítica de velocidades superficiales de solvente (U) suficientemente altos, sin embargo, permite incrementar el coeficiente externo de transferencia de masa (k_f), y contrarrestar de esta manera la influencia negativa del fenómeno de convección natural en la velocidad de extracción (Germain *et al.*, 2005; del Valle *et al.*, 2003b). Debido a lo anterior, en el presente estudio se decidió operar a una velocidad superficial de solvente de 1.1 mm/s de CO_2 , valor que se encuentra en el rango de 1 a 5 mm/s recomendado por Eggers (1996), para la extracción de aceites de sustratos vegetales. El flujo másico de solvente (CO_2) requerido para la velocidad superficial de solvente fija establecida, fue calculado para cada tratamiento experimental.

En cada experimento se usaron 20 g de cáscara seca y molida tamaño malla ASTM -10/+18 ($2\text{ mm} > dp > 1\text{ mm}$), de los cuales 3.2 g fueron tamaño malla 10; 3.4 g tamaño malla 12; 7 g tamaño malla 14; 3.4 g tamaño malla 16; y 3 g tamaño malla 18.

La muestra de cáscara de naranja se colocó en el recipiente de extracción, provisto de una chaqueta de calentamiento. El flujo másico de solvente (CO_2), así como la presión y

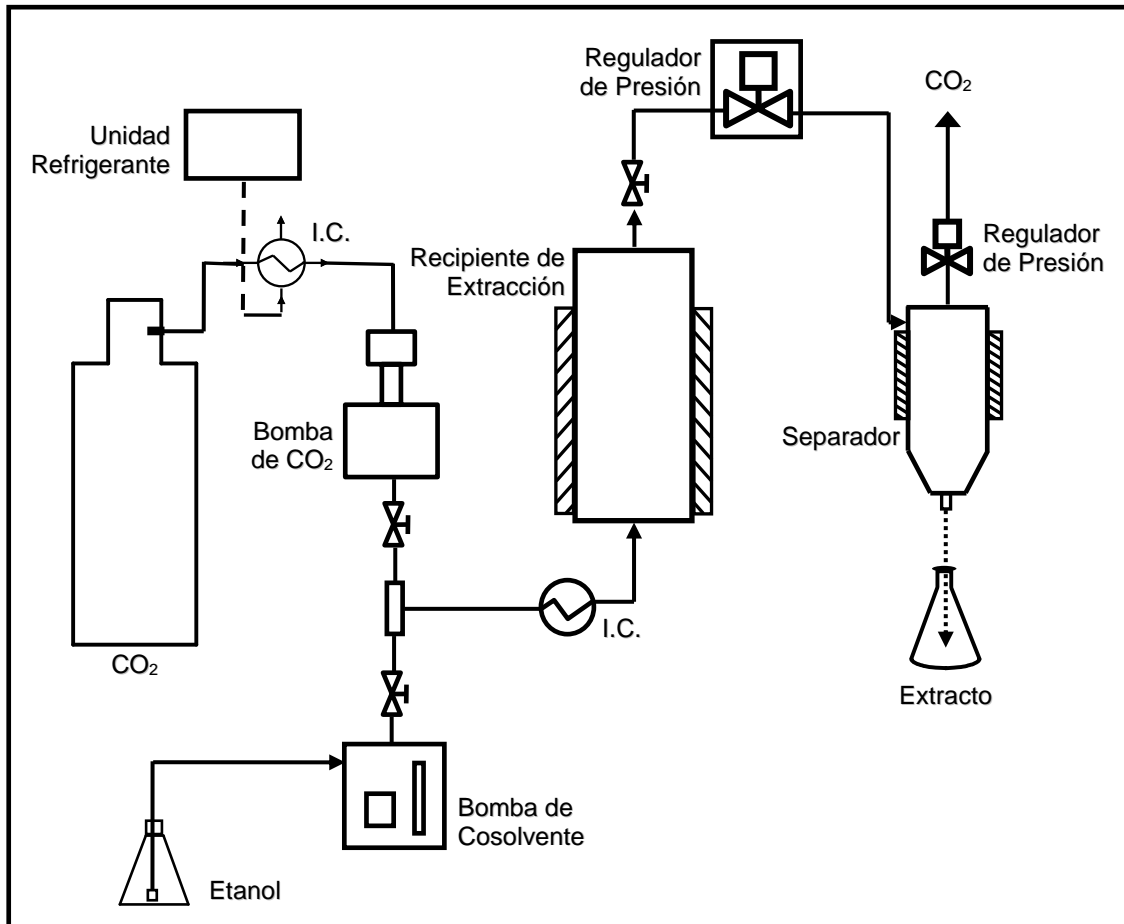


Figura 3.2 Diagrama esquemático del sistema de extracción con fluidos supercríticos.

temperatura de extracción y el porcentaje en masa de cosolvente (etanol), fueron señalados en el programa de control del sistema de acuerdo a los valores planteados en el diseño de experimentos. El CO₂ líquido, proveniente de un cilindro con sifón, se pasó a través de una bomba de alta presión para llevarlo a las condiciones de presión y flujo másico de extracción señalados. El etanol fue alimentado al sistema de manera independiente, succionándolo de un contenedor con una segunda bomba, misma que mantuvo la presión y el flujo másico de etanol a las condiciones de operación requeridas. Posterior a su ingreso, el etanol se mezcló con el CO₂.

Para la extracción selectiva de los compuestos, el fluido extractor se puso en contacto con la muestra, haciéndolo pasar a través del sustrato en flujo ascendente a las condiciones de presión y temperatura supercrítica señaladas. Posteriormente, el fluido extractor y el producto extraído fueron separados por precipitación del producto, al reducir la presión y temperatura a valores inferiores a la presión y temperatura crítica del CO₂. El tiempo de extracción dinámica fue de 3 horas.

Los extractos obtenidos en las distintas corridas experimentales se recolectaron con etanol y se mantuvieron en congelación a una temperatura de -20 °C, en atmósfera inerte de nitrógeno y en ausencia de luz hasta su análisis.

3.2.5 Diseño Experimental

En la extracción supercrítica de flavonoides de cáscara de naranja se aplicó la metodología de superficie de respuesta (MSR), con la finalidad de encontrar las condiciones de operación que permitieran la extracción selectiva de compuestos seleccionados. La MSR es un procedimiento efectivo para determinación de condiciones de operación óptimas de procesos, que ya ha sido aplicado en la obtención de extractos vegetales con fluidos supercríticos (Began *et al.*, 2000; Brachet *et al.*, 1999).

Como diseño de superficie de respuesta, se planteó un diseño compuesto centrado

rotatorio (DCCR) para tres variables independientes: presión (X_1), temperatura (X_2) y porcentaje de cosolvente (X_3). Cada variable fue codificada en cinco niveles: -1.682, -1, 0, +1 y +1.682. Los niveles de presión, temperatura y porcentaje de cosolvente se ubicaron dentro de los valores mínimos y máximos de 149-401 bar, 40-60 °C y 0-20 %, respectivamente (Tabla 3.1). La variable respuesta (Y) del diseño, fue el rendimiento del flavonoide de interés obtenido de la cáscara de naranja con el proceso de extracción supercrítica (mg de flavonoide obtenidos de 20 g de cáscara de naranja), determinado por HPLC.

En la Tabla 3.2 se muestra el diseño conceptual del DCCR seguido en la extracción supercrítica de flavonoides. El diseño incluye cuatro repeticiones del punto central (0,0,0) para la estimación del error experimental. Los tratamientos experimentales planteados por el diseño se presentan en la Tabla 3.3.

En el equipo de extracción supercrítica, el flujo de fluido (cantidad de fluido por unidad de tiempo), es controlado por la velocidad de bombeo. El diseño de la bomba de cosolvente, particularmente en el suministro de gramos de fluido por minuto, no permitió un ajuste exacto del porcentaje en masa de cosolvente establecido por el diseño de experimentos (Tabla 3.3). En consecuencia, los tratamientos experimentales aplicados en la extracción supercrítica son los que se muestran en la Tabla 3.4. Estos experimentos se hicieron en orden aleatorio para minimizar el efecto de factores externos en la respuesta.

3.2.6 Análisis Estadístico

El análisis y la presentación de los resultados de extracción supercrítica se hicieron utilizando el paquete estadístico Statistica, Versión 6.1. Para ello, los resultados experimentales del diseño se ajustaron, mediante un análisis de regresión múltiple, a un modelo polinomial de segundo orden. La obtención de un modelo adecuado permite estudiar el efecto de las variables independientes (presión, temperatura y porcentaje de

Tabla 3.1 Variables y niveles del DCCR usado en la extracción supercrítica de flavonoides de cáscara de naranja (*Citrus sinensis*).

VARIABLE	NIVELES CODIFICADOS DE LAS VARIABLES				
	-1.682	-1	0	+1	+1.682
X ₁ ; Presión (bar)	149	200	275	350	401
X ₂ ; Temperatura (°C)	40	44	50	56	60
X ₃ ; Cosolvente (%) ^a	0	4	10	16	20

^a Gramos de cosolvente (etanol) por 100 gramos de solvente (CO₂).

Tabla 3.2 Diseño conceptual del DCCR.

EXPERIMENTO	VARIABLES CODIFICADAS		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1.682	0	0
10	+1.682	0	0
11	0	-1.682	0
12	0	+1.682	0
13	0	0	-1.682
14	0	0	+1.682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

Tabla 3.3 Tratamientos experimentales planteados por el diseño para la extracción supercrítica de flavonoides de cáscara de naranja (*Citrus sinensis*).

EXPERIMENTO	VARIABLES NO CODIFICADAS		
	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Cosolvente (%) ^a
1	200	44	4
2	350	44	4
3	200	56	4
4	350	56	4
5	200	44	16
6	350	44	16
7	200	56	16
8	350	56	16
9	149	50	10
10	401	50	10
11	275	40	10
12	275	60	10
13	275	50	0
14	275	50	20
15	275	50	10
16	275	50	10
17	275	50	10
18	275	50	10

^a Gramos de cosolvente (etanol) por 100 gramos de solvente (CO₂).

Tabla 3.4 Tratamientos experimentales aplicados en la extracción supercrítica de flavonoides de cáscara de naranja (*Citrus sinensis*).

EXPERIMENTO	PRESIÓN (bar)	TEMPERATURA (°C)	COSOLVENTE (%) ^a
1	200	44	2.67
2	350	44	2.41
3	200	56	2.92
4	350	56	3.80
5	200	44	18.79
6	350	44	17.15
7	200	56	17.35
8	350	56	17.61
9	149	50	10.58
10	401	50	9.69
11	275	40	9.90
12	275	60	11.12
13	275	50	0.00
14	275	50	23.35
15	275	50	10.25
16	275	50	10.36
17	275	50	10.30
18	275	50	10.31

^a Gramos de cosolvente (etanol) por 100 gramos de solvente (CO₂).

cosolvente) en el proceso de extracción, así como predecir la respuesta Y (rendimiento del flavonoide de interés extraído), para distintos valores de presión, temperatura y porcentaje de cosolvente, dentro del rango experimental. La forma del modelo propuesto es la siguiente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad \text{Ec (3.2)}$$

Donde:

β_0 es una constante.

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ son los coeficientes lineales.

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ son los coeficientes cuadráticos.

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ son los coeficientes de interacción.

3.2.7 Extracción de Flavonoides con Solventes Orgánicos

Para determinar la concentración de los flavonoides de interés presentes en la cáscara de naranja y tener un punto de comparación con el método de extracción supercrítica, se realizó la extracción con solventes convencional.

Los flavonoides se obtuvieron de acuerdo a la técnica de extracción con solventes descrita por Manthey y Grohmann (1996), con algunas modificaciones. La muestra de cáscara de naranja seca se molió a polvo fino en un molino para café y especias. A 500 mg de cáscara de naranja seca y molida se le adicionaron 3.75 ml de metanol grado HPLC y 3.75 ml de dimetil sulfóxido (DMSO). La solución, contenida en un vial color ámbar con tapa, se colocó en una placa con agitación magnética por un período de 24 horas. Al término de este tiempo el extracto de la muestra se decantó, se filtró y se

guardó en congelación. El residuo sólido remanente se extrajo una segunda vez, adicionándole la misma cantidad de metanol y DMSO y manteniéndolo en agitación por otras 24 horas. El mismo tratamiento se repitió una tercera vez. El segundo y tercer extracto se combinaron con el primero. Finalmente a los extractos combinados se les agregó 1.25 ml de metanol y 1.25 ml de DMSO, para llevar la solución a un volumen final de 25 ml.

3.2.8 Análisis HPLC

Los extractos de cáscara de naranja obtenidos tanto con la técnica de extracción supercrítica, como con la de solventes convencional, se analizaron usando un equipo HPLC, Marca Varian proStar, Modelo 210, equipado con una columna Varian Microsob-MV 100-5 C18 de 10 cm x 4.6 mm de D.I., y un detector UV Visible proStar 320 para la identificación y cuantificación de los principales flavonoides presentes. Previo a su inyección, los extractos se pasaron a través de filtros de membrana con tamaño de poro 0.47 μm (Millex-GV).

Las plantas cítricas contienen un amplio grupo de sustancias flavonoides, entre las que destacan dos clases principales: glicósidos de flavanona y flavonas polimetoxiladas. El análisis HPLC de los compuestos flavonoides presentes en los extractos de cáscara de naranja requirió de dos técnicas de determinación.

En el análisis de glicósidos de flavanona se usó un sistema de elución con gradiente de dos solventes: ácido fórmico al 5 % como solvente A y metanol grado HPLC como solvente B. El programa de elución inició con una relación de solventes de 0 % de B (100 % de A), hasta alcanzar un 30 % de B a los 10 min, permaneciendo en esa proporción hasta el minuto 15. Se continuó con el incremento lineal en la proporción del solvente B, hasta un 40 % del mismo en el minuto 20. Se siguió hasta un incremento a 45 % de B en el minuto 30, 60 % de B en el minuto 50 y 80 % de B en el minuto 52, y se mantuvo en esta proporción hasta el minuto 56, tiempo en que se incrementó

nuevamente para alcanzar un 100 % de B en el minuto 58. La columna se operó a temperatura ambiente. El flujo se estableció en 1.5 ml/min y el volumen de inyección de la muestra fue de 20 μ l. Los compuestos se detectaron a 285 nm.

Por su parte, la determinación de flavonas polimetoxiladas se llevó a cabo aplicando la técnica descrita por Wang *et al.* (2008), con modificaciones. Los solventes usados fueron agua grado HPLC (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). Se trabajó en una relación de solventes de 40 % de B y 60 % de A y la duración del análisis fue de 15 minutos. La columna se operó a temperatura ambiente. El flujo se estableció en 1.25 ml/min y el volumen de inyección de la muestra fue de 20 μ l. Los compuestos fueron analizados a una longitud de onda de 340 nm.

La identificación de los principales flavonoides contenidos en los extractos se realizó comparando sus tiempos de retención con los tiempos de retención presentados por los estándares adquiridos comercialmente. Para la cuantificación de los flavonoides identificados se elaboraron curvas de calibración de los estándares a diferentes concentraciones.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de la Materia Prima

El pH es uno de los parámetros químicos que permite expresar la acidez de la naranja. Se le considera un indicador de madurez, ya que su valor tiende a aumentar a medida que el estado fisiológico del fruto pasa de verde a maduro. El pH de naranja Valencia varía por lo general entre 2.9 y 3.9 (Ting y Attaway, 1980). La naranja recolectada para este estudio presentó un valor de 3.59, el cual se encuentra dentro del rango de pH estimado adecuado para la cosecha de la naranja variedad Valencia (Bringas y Morales, 1988).

Las mediciones que proporcionan más información referente al estado de madurez de la naranja son el contenido de sólidos solubles totales (SST) y la acidez titulable (AT). La relación entre estos dos parámetros, conocida como índice de madurez, es el método más usado para estimar el nivel de madurez en los frutos cítricos (Olmo *et al.*, 2000).

En la naranja, los sólidos solubles se componen principalmente de azúcares. A medida que la naranja madura, el contenido de azúcares en la fruta se incrementa y el contenido ácido disminuye. En consecuencia, la relación SST/AT tiende a incrementarse durante la madurez del fruto. De acuerdo a Sinclair (1984), el contenido de azúcares en la maduración de la naranja puede variar entre 7 y 12 %. Buslig (1991), maneja una variación de contenido de azúcares de 7.17 a 10.72 g por cada 100 ml de jugo. El contenido de ácido también varía gradualmente a medida que transcurre la maduración del fruto, en este caso disminuyendo de un 1.2 a un 0.7 % (Sinclair, 1984).

Los resultados experimentales de la caracterización química de la naranja recolectada

para este trabajo, indicaron un contenido promedio de sólidos solubles totales de 11.6 % y un porcentaje de acidez de 0.95.

En los frutos cítricos, la madurez se define comúnmente en términos de la madurez comercial o madurez de consumo. El índice de madurez de la naranja en estudio, calculado como la relación sólidos solubles totales/acidez titulable, fue de 12.23. Este valor se encuentra en el rango de índice de madurez de 9.7 a 17.7, establecido por las normas de calidad internacionales de comercialización de este fruto (Buslig, 1991), y cumple con el requerimiento de un índice de madurez mínimo de 7 para la comercialización en territorio nacional de naranja fresca *Citrus sinensis Osbeck*, especificado en la norma oficial mexicana NMX-FF-027-SCFI-2007.

En lo referente a la caracterización proximal de la materia prima, la cáscara de naranja fresca presentó 65 % de contenido de humedad, 1.65 % de proteína (N x 6.25), 1.60 % de cenizas totales, 4.0 % de grasa cruda y 3.26 % de fibra cruda.

4.2 Contenido de Humedad de la Cáscara de Naranja Seca

Para la determinación del contenido de humedad de cáscara de naranja seca, se tomó una muestra representativa de cáscara de cada una de las mallas del secador. El material se molió usando un molino de martillos Wiley con malla 10. La humedad se determinó gravimétricamente por secado de las muestras en una estufa a 105 °C, durante un periodo de 24 horas. El contenido de humedad de la muestra seca fue de 12.5 %.

4.3 Caracterización del Sustrato

De la cáscara obtenida en el proceso de molienda, se seleccionó la fracción -10 / +18 malla Tyler (1 mm < dp < 2 mm), como sustrato a utilizar en las corridas de extracción supercrítica. Tomando esta fracción como el cien por ciento de la carga en el extractor, se determinó la siguiente distribución de tamaño de partícula:

- Malla Tyler No. 10 (dp = 2.00 mm): 16 %.
- Malla Tyler No. 12 (dp = 1.70 mm): 17 %.
- Malla Tyler No. 14 (dp = 1.40 mm): 35 %.
- Malla Tyler No. 16 (dp = 1.18 mm): 17 %.
- Malla Tyler No. 18 (dp = 1.00 mm): 15 %.

La densidad aparente del lecho empacado fue de 296.8 kg/m^3 y la densidad verdadera del sustrato sólido fue de 606 kg/m^3 . Esto dió una porosidad de lecho empacado de 0.5102.

4.4 Extracción Supercrítica de Flavonoides

En las Figuras 4.1 y 4.2 se muestran los perfiles de los compuestos flavonoides presentes en los extractos obtenidos con la técnica de extracción con fluidos supercríticos. Los principales compuestos detectados pertenecen al grupo de las flavonas polimetoxiladas.

4.4.1 Selección de Compuestos con Aplicación Potencial

De acuerdo a la literatura científica, las flavonas polimetoxiladas contenidas en el aceite de naranja son principalmente seis: a) sinensetina (5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona), b) hexametil éter quercetagetina (3,5,6,7,3',4'-hexametoxiflavona), c) nobiletina (5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona), d) tetrametil escutellareina (5,6,7,4'-tetrametoxiflavona), e) 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona y f) tangeretina (5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona) (Manthey, 2006). En el análisis HPLC de los extractos supercríticos de cáscara de naranja, los picos correspondientes a la sinensetina, nobiletina, tetrametil escutellareina y tangeretina fueron identificados y cuantificados con las áreas de los picos de estándares comerciales. La hexametil éter quercetagetina (3,5,6,7,3',4'-hexametoxiflavona) y la 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona fueron tentativamente identificadas comparando su orden de elución en el cromatograma (Figuras 4.1 y 4.2), con el orden de elución de flavonas polimetoxiladas reportado por

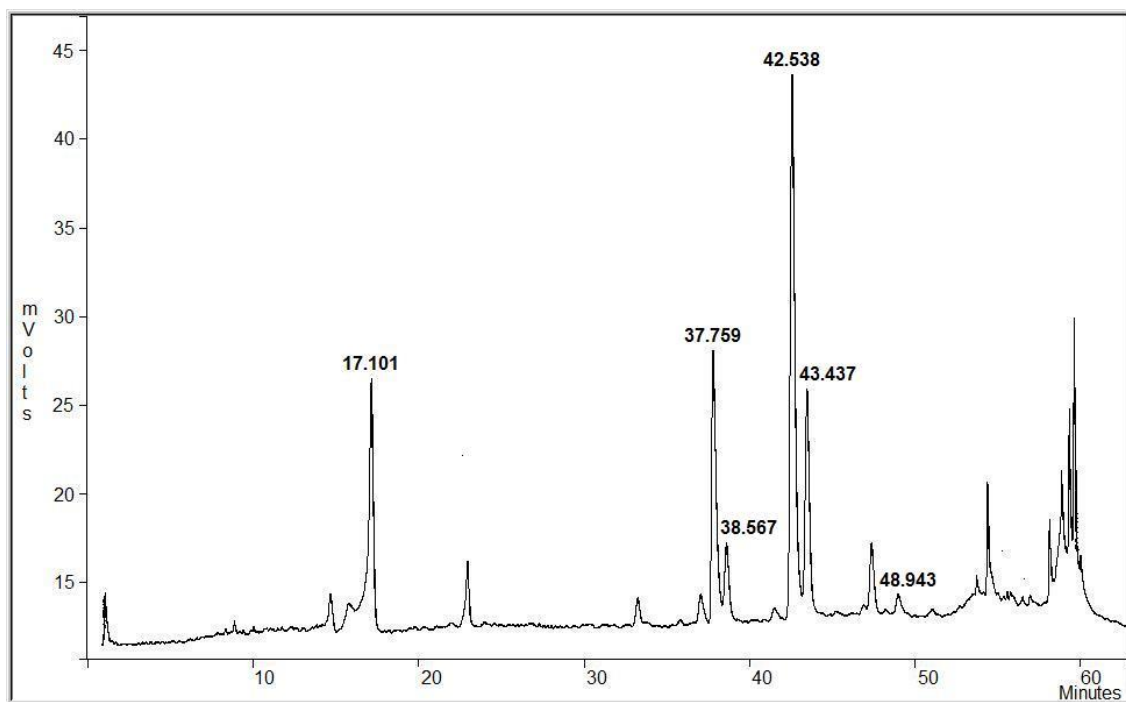


Figura 4.1 Perfil HPLC de flavonoides identificados en extractos supercríticos, determinados a 285 nm: hesperidina (17.101 min); sinensetina (37.759 min); hexametil éter quercetagina (38.567 min); nobiletina / tetrametil escutellareina (42.538 min); 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona (43.437 min); tangeretina (48.943 min). Cromatograma de extracto obtenido a P = 350 bar, T = 44 °C y cosolvente = 16 %.

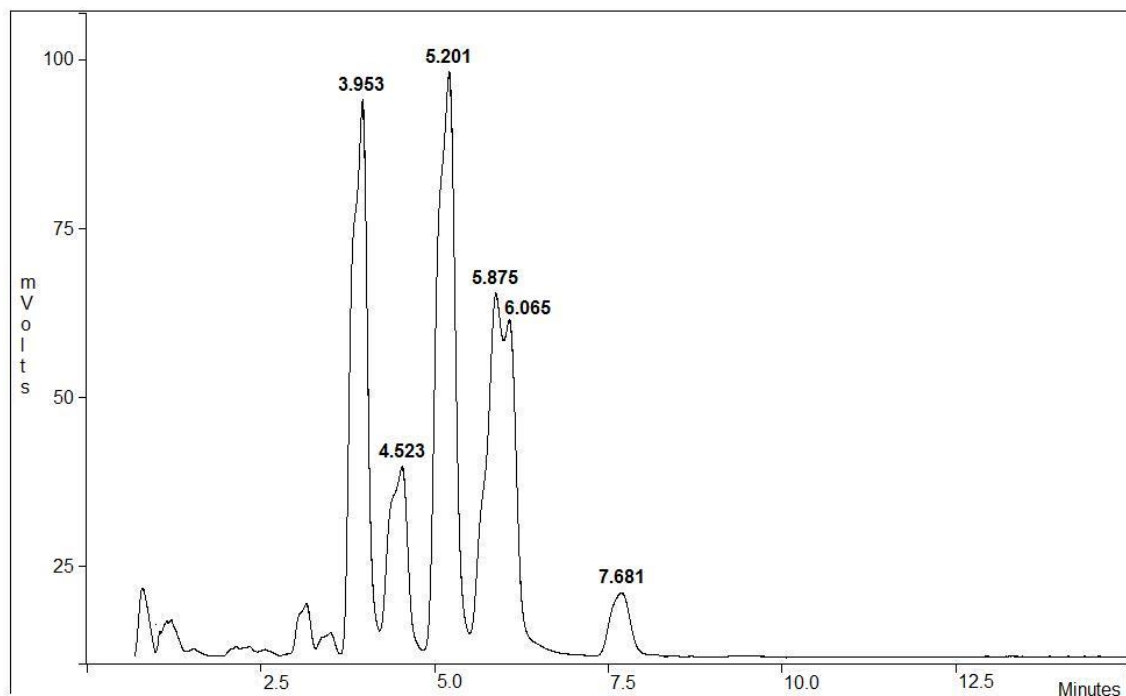


Figura 4.2 Perfil HPLC de flavonas polimetoxiladas identificadas en extractos supercríticos, determinados a 340 nm: sinensetina (3.953 min); hexametil éter quercetagina (4.523 min); nobiletina (5.201 min); tetrametil escutellareina (5.875 min); 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona (6.065 min); tangeretina (7.681 min). Cromatograma de extracto obtenido a $P = 401$ bar, $T = 50$ °C y cosolvente = 10 %.

Manthey y Buslig (2003).

En el cromatograma de la Figura 4.1 se observa también la presencia de hesperidina, una flavanona glicosilada. Sin embargo, la cantidad de hesperidina extraída con la técnica supercrítica fue considerablemente menor que la que se obtuvo con la técnica convencional de extracción con solventes llevada a cabo en el presente estudio. Los rendimientos de hesperidina en la extracción supercrítica variaron desde cantidades traza hasta 35.87 mg por 20 g de muestra.

Dada la actividad terapéutica reportada de los flavonoides identificados en los extractos supercríticos de cáscara de naranja, se puede destacar a la nobiletina y a la tangeretina como dos de los flavonoides que han resultado de mayor interés en la investigación pre-clínica y clínica contra el cáncer y otras importantes enfermedades. Son varias las investigaciones que se han dedicado a documentar las actividades biológicas terapéuticas de estos dos compuestos en particular. En base a lo anterior se aplicó el análisis de superficie de respuesta a la extracción de nobiletina y tangeretina, compuestos obtenidos con la técnica de fluidos supercríticos, identificados con potencial de aplicación.

4.4.2 Diseño Experimental de Extracción Supercrítica de Compuestos Seleccionados

Los valores experimentales de rendimiento de nobiletina obtenidos con los diferentes tratamientos del diseño, se ajustaron a un modelo cuadrático (Ec.3.2), con la finalidad de generar la ecuación que predijera el rendimiento de nobiletina. La ecuación cuadrática obtenida como modelo de predicción fue la siguiente:

$$Y_1 = 44.50139 - 0.13042X_1 - 0.13767X_2 - 2.07021X_3 + 0.83015 \times 10^{-4} X_1^2 + 0.00626X_2^2 + 0.05700X_3^2 - 0.23543 \times 10^{-3} X_1X_2 + 0.01043X_1X_3 - 0.02622X_2X_3 \quad \text{Ec. (4.1)}$$

Donde:

Y_1 es el rendimiento de extracción de nobiletina (mg de nobiletina extraídos de 20 g de cáscara de naranja);

X_1 es la presión de extracción (bar);

X_2 es la temperatura de extracción ($^{\circ}\text{C}$);

X_3 es el porcentaje en masa de cosolvente (%).

La Tabla 4.1 muestra los rendimientos de nobiletina obtenidos experimentalmente y los correspondientes rendimientos de nobiletina estimados por el modelo de regresión. El análisis de varianza del modelo cuadrático de predicción reportó un valor de p de 0.005, indicando que el ajuste del modelo fue adecuado ($p < 0.05$), y un coeficiente de correlación, R^2 , de 0.89, lo que sugiere que el modelo explica de manera adecuada el comportamiento real del proceso.

En la Tabla 4.2 se da la significancia de los términos del modelo. Un valor de $p < 0.05$ indica que el término es significativo. De acuerdo a ello, la interacción entre presión y porcentaje de cosolvente afectó significativamente el rendimiento de la extracción. En general, los rendimientos experimentales más altos de nobiletina se obtuvieron cuando se trabajó a altas presiones, con altos porcentajes de cosolvente (Tabla 4.1). El término cuadrático del porcentaje de cosolvente también tuvo una influencia significativa en la extracción.

La ecuación cuadrática obtenida (Ec. 4.1), se usó para obtener las superficies de respuesta de las interacciones entre la presión de extracción, la temperatura de extracción y el porcentaje de cosolvente.

La temperatura de extracción en el rango experimental de 40 a 60 $^{\circ}\text{C}$ no afectó significativamente la cantidad de nobiletina extraída, la cual varió de 21 a 26 mg por

Tabla 4.1 Rendimientos experimentales y rendimientos estimados por el modelo de superficie de respuesta de extracción supercrítica de nobiletina.

Tratamiento	CONDICIONES DE EXTRACCIÓN			RENDIMIENTO ^b	
	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Cosolvente ^a (%)	Experimental (mg)	Estimado (mg)
1	200	44	2.67	23.81	23.18
2	350	44	2.41	14.93	12.82
3	200	56	2.92	26.52	27.26
4	350	56	3.80	19.29	17.58
5	200	44	18.79	21.92	24.47
6	350	44	17.15	35.27	35.54
7	200	56	17.35	19.37	22.98
8	350	56	17.61	33.68	35.98
9	149	50	10.58	24.10	20.97
10	401	50	9.69	21.36	22.71
11	275	40	9.90	19.38	19.94
12	275	60	11.12	26.09	23.73
13	275	50	0.00	16.85	20.44
14	275	50	23.35	43.52	39.54
15	275	50	10.25	19.30	21.17
16	275	50	10.36	19.83	21.24
17	275	50	10.30	22.84	21.20
18	275	50	10.31	23.90	21.21

^a Gramos de cosolvente (etanol) por 100 gramos de solvente (CO₂).

^b Cantidad de nobiletina extraída de 20 gramos de cáscara de naranja.

Tabla 4.2 Coeficientes de regresión y significancia de los términos del modelo de superficie de respuesta de extracción supercrítica de nobiletina.

TÉRMINO DEL MODELO	COEFICIENTE ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	t	p
Constante	44.50139	81.00519	0.54936	0.597752
X ₁ - Presión	-0.13042	0.16666	-0.78251	0.456449
X ₂ - Temperatura	-0.13767	2.81127	-0.04897	0.962144
X ₃ - % de Cosolvente	-2.07021	1.52856	-1.35435	0.212633
X ₁ ²	0.83015x10 ⁻⁴	0.00017	0.48498	0.640691
X ₂ ²	0.00626	0.02712	0.23081	0.823259
X ₃ ²	0.05700	0.01894	3.01045	0.016802
X ₁ X ₂	-0.23543x10 ⁻³	0.00271	-0.08699	0.932818
X ₁ X ₃	0.01043	0.00219	4.76064	0.001426
X ₂ X ₃	-0.02622	0.02741	-0.95659	0.366782

carga del extractor (Figura 4.3). Adil *et al.* (2007), hacen referencia al comportamiento reportado del efecto de la temperatura en la extracción con CO₂ supercrítico de compuestos fenólicos: a presiones superiores a 15 MPa, el efecto de la temperatura en la extracción supercrítica de este tipo de compuestos es positiva, es decir, el rendimiento de la extracción se incrementa con un aumento de temperatura; sin embargo, a presiones bajas, de entre 10 y 15 MPa, el efecto de la temperatura en la extracción es negativo, por lo que un incremento de la temperatura a estas presiones conlleva a una disminución del rendimiento. La solubilidad de un compuesto en un fluido supercrítico depende de un balance complejo entre la densidad del fluido supercrítico y la presión de vapor del soluto a extraer. Operando por debajo de una presión determinada (presión “crossover”), el incremento de la temperatura, por la consecuente disminución de la densidad del fluido, disminuye el poder solvente del mismo, lo que afecta de manera negativa la extracción. Por el contrario, operando por arriba de la presión “crossover”, el efecto dominante por el aumento de la temperatura es el incremento de la presión de vapor del soluto, lo que incrementa la transferencia de masa y en consecuencia la extracción.

En la Figura 4.3 se puede observar que un incremento en la temperatura de extracción conlleva a un aumento en el rendimiento de extracción en gran parte del rango de presiones. Esto parece indicar que el trabajo experimental se llevó a cabo a presiones cercanas superiores a la presión “crossover” de la mezcla supercrítica (CO₂ supercrítico-etanol).

La Figura 4.4 muestra el efecto de la presión y el porcentaje de cosolvente en el rendimiento de nobiletina. Los mayores rendimientos estimados de nobiletina se pueden obtener operando a los valores más altos de presión y de porcentaje de etanol. No obstante, se observa en la superficie de respuesta que buenos rendimientos de nobiletina (40 mg), se alcanzan operando en el valor más alto de porcentaje de etanol (23 %) en regiones de presión moderadas (220 a 300 bar), lo mismo que trabajando a la presión más alta (400 bar) con valores de porcentaje de cosolvente moderados. Un incremento en la presión supercrítica puede conducir a un aumento en la densidad del CO₂, y

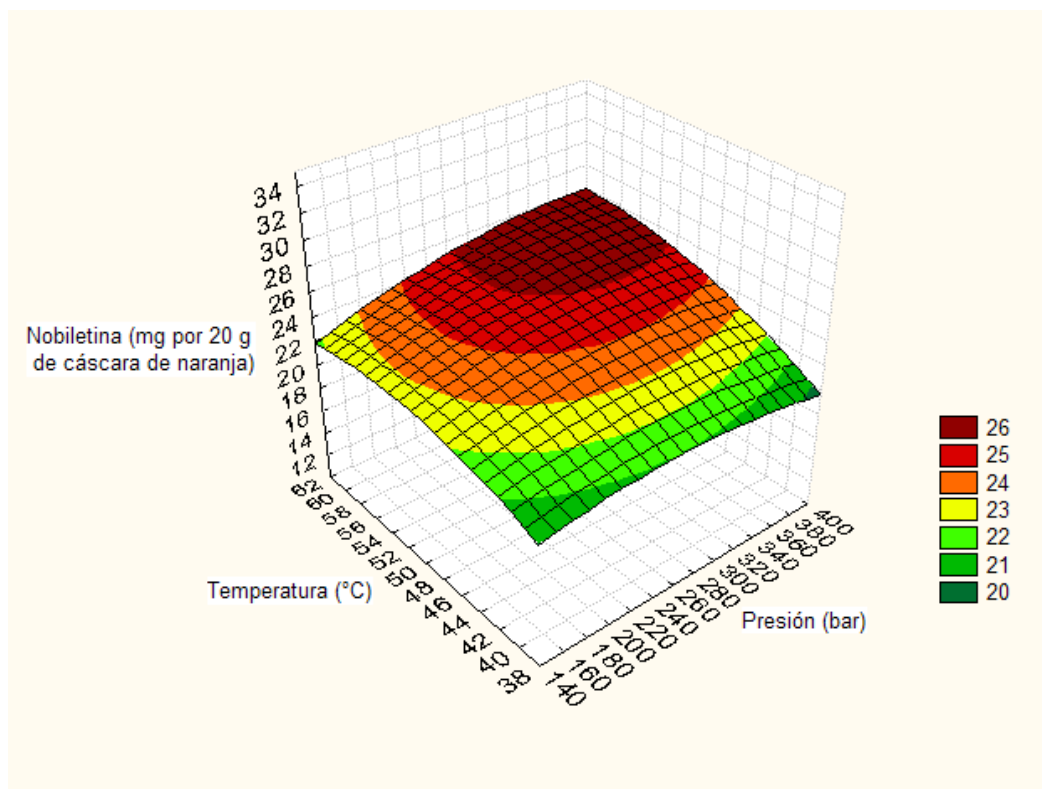


Figura 4.3. Efecto de la presión y temperatura de extracción en el rendimiento de nobiletina, con 10 % de cosolvente. Gráfica de superficie de respuesta.

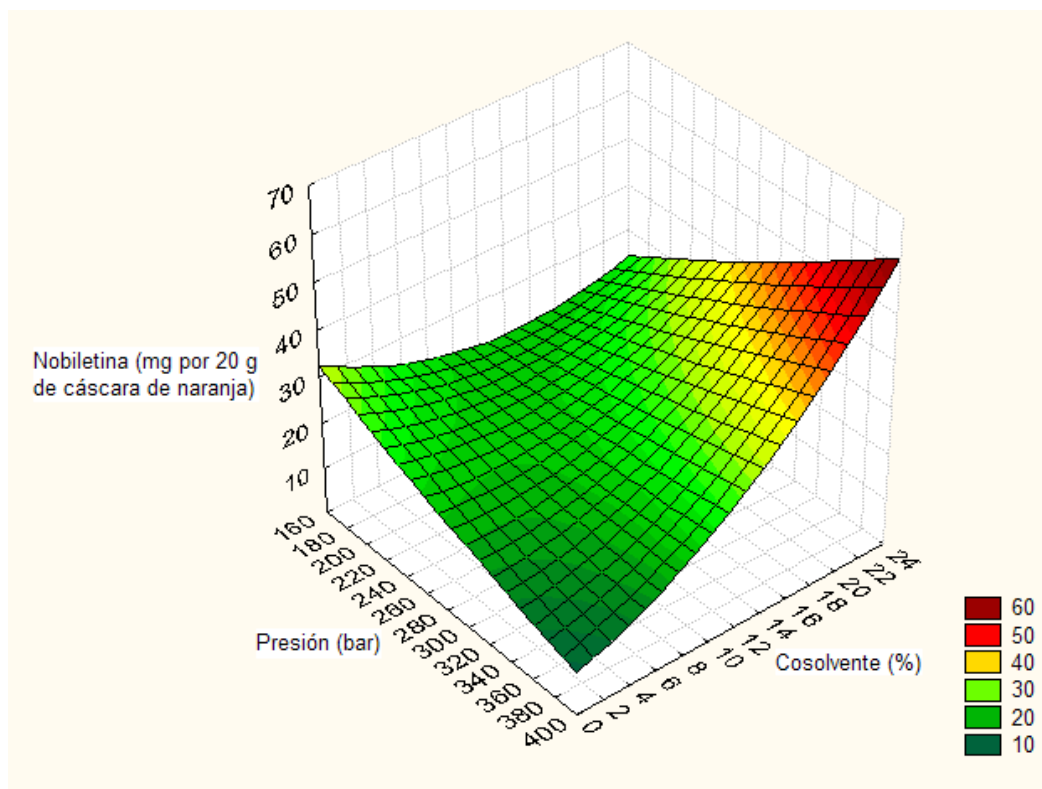


Figura 4.4 Efecto de la presión y porcentaje de cosolvente en el rendimiento de nobiletina, a una temperatura de 50 °C. Gráfica de superficie de respuesta.

contribuir de esta manera a un incremento en el poder solvente de la mezcla CO₂ supercrítico-etanol.

El efecto del porcentaje de cosolvente sobre el rendimiento de nobiletina, en el rango experimental de temperatura, se muestra en la Figura 4.5. Como se puede observar, un incremento en el porcentaje de cosolvente conduce a un mayor rendimiento de extracción, independientemente de la temperatura aplicada. El uso de etanol como un cosolvente efectivo en el mejoramiento de la extracción supercrítica de compuestos fenólicos, ha sido recientemente reportado (Wang *et al.*, 2008; Adil *et al.*, 2007; Pinelo *et al.*, 2007). El mayor rendimiento obtenido en la extracción de compuestos fenólicos con la adición de etanol como cosolvente, se ha atribuido principalmente a la formación de interacciones entre el soluto y las moléculas de cosolvente, las cuales incrementan la solubilidad del soluto en la mezcla supercrítica (CO₂-etanol) (Adil, *et al.*, 2007). La adición de cosolvente, por su carácter polar, tiene también el efecto de incrementar la densidad del solvente, con el consecuente incremento de la solubilidad.

Los resultados experimentales de rendimiento de tangeretina, el segundo de los flavonoides de interés en la extracción supercrítica de cáscara de naranja, se muestran en la Tabla 4.3. Al igual que en la extracción de nobiletina, el mayor rendimiento experimental de tangeretina se obtuvo a condiciones de 275 bar, 50 °C y 23.35 % de cosolvente. En la Tabla 4.3 se pueden ver también los rendimientos de tangeretina estimados por el modelo de predicción.

Los coeficientes del modelo de predicción y la significancia de los términos del modelo se presentan en la Tabla 4.4. La ecuación de predicción generada es la siguiente:

$$Y_2 = -3.01164 - 0.00420X_1 + 0.20354X_2 - 0.01576X_3 + 0.1038 \times 10^{-5} X_1^2 - 0.00183X_2^2 + 0.00360X_3^2 - 0.40924 \times 10^{-3} X_1X_2 + 0.00041X_1X_3 - 0.00188X_2X_3 \quad \text{Ec. (4.2)}$$

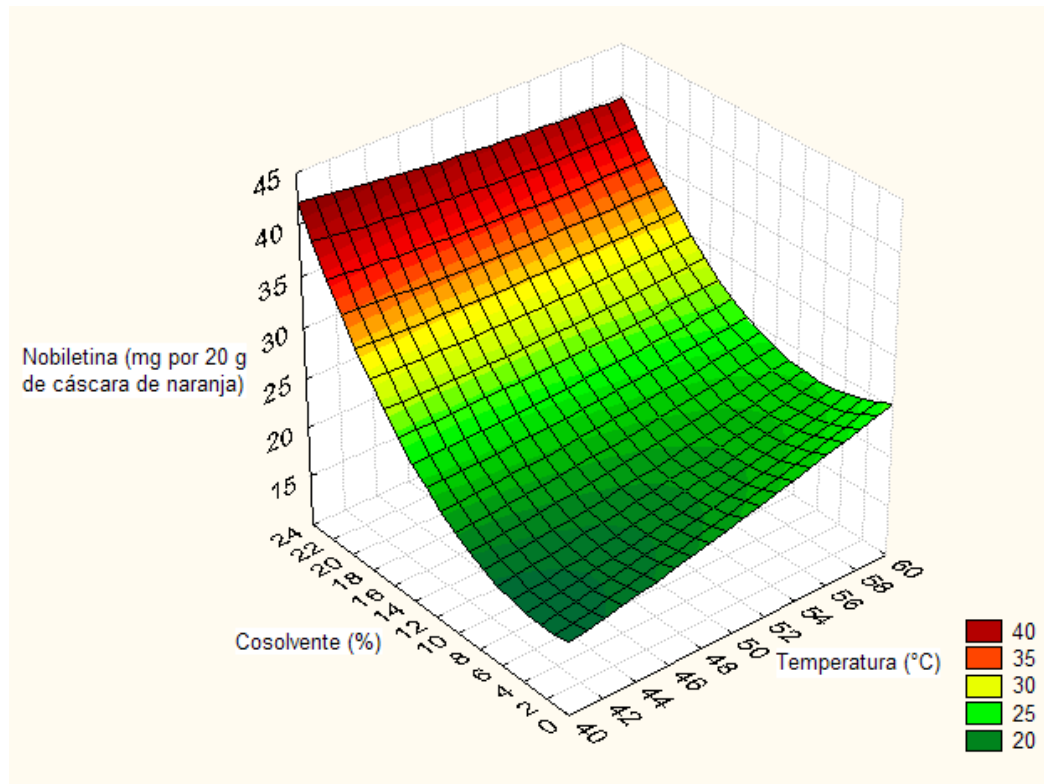


Figura 4.5 Efecto de la temperatura y porcentaje de cosolvente en el rendimiento de nobiletina, a una presión de 275 bar. Gráfica de superficie de respuesta.

Tabla 4.3 Rendimientos experimentales y rendimientos estimados por el modelo de superficie de respuesta de extracción supercrítica de tangeretina.

Tratamiento	CONDICIONES DE EXTRACCIÓN			RENDIMIENTO ^b	
	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Cosolvente ^a (%)	Experimental (mg)	Estimado (mg)
1	200	44	2.67	1.62	1.50
2	350	44	2.41	1.06	1.04
3	200	56	2.92	1.59	1.66
4	350	56	3.80	1.36	1.26
5	200	44	18.79	2.24	2.47
6	350	44	17.15	2.66	2.74
7	200	56	17.35	1.94	2.14
8	350	56	17.61	2.30	2.63
9	149	50	10.58	1.95	1.80
10	401	50	9.69	1.84	1.75
11	275	40	9.90	1.61	1.59
12	275	60	11.12	1.86	1.65
13	275	50	0.00	1.15	1.39
14	275	50	23.35	3.78	3.41
15	275	50	10.25	1.75	1.79
16	275	50	10.36	1.86	1.80
17	275	50	10.30	1.77	1.79
18	275	50	10.31	1.85	1.79

^a Gramos de cosolvente (etanol) por 100 gramos de solvente (CO₂).

^b Cantidad de tangeretina extraída de 20 gramos de cáscara de naranja.

Donde:

Y_2 es el rendimiento de extracción de tangeretina (mg de tangeretina extraídos de 20 de cáscara de naranja);

X_1 es la presión de extracción (bar);

X_2 es la temperatura de extracción (°C);

X_3 es el porcentaje en masa de cosolvente (%).

El valor de R^2 del modelo de predicción fue de 0.91. El análisis de varianza para el modelo reportó un efecto significativo ($p = 0.001$) del modelo ajustado.

Como en el caso de la nobiletina, la presión asociada con el porcentaje de cosolvente y el término cuadrático del porcentaje de cosolvente, son los factores que tuvieron un efecto significativo en el rendimiento de extracción del flavonoide (Tabla 4.4).

En la Figura 4.6 se muestra la superficie de respuesta del efecto de la presión y la temperatura sobre el rendimiento de extracción de tangeretina. Si se hace una comparación con la correspondiente superficie de respuesta de nobiletina (Figura 4.3), se advierte que los máximos rendimientos de tangeretina se pueden alcanzar operando a presiones un poco más bajas (210 a 310 bar), que las requeridas para los mayores rendimientos de nobiletina (260 a 400 bar). A diferencia de la nobiletina, la operación a presiones superiores a 310 bar disminuye el rendimiento de tangeretina. Un comportamiento similar se presenta en el análisis del efecto de la presión y el porcentaje de cosolvente sobre el rendimiento. De acuerdo a la Figura 4.7, manejando el mayor porcentaje de cosolvente (23 %), es posible obtener rendimientos aceptables de tangeretina (3 mg), aún trabajando a presiones bajas de 140 bar. Como se mencionó anteriormente, un rendimiento aceptable de nobiletina (40 mg), requiere de un suministro de 23 % de cosolvente y valores de presión de 220 a 300 bar, los cuales son mayores a los de la tangeretina.

Tabla 4.4 Coeficientes de regresión y significancia de los términos del modelo de superficie de respuesta de extracción supercrítica de tangeretina.

TÉRMINO DEL MODELO	COEFICIENTE ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	t	P
Constante	-3.01164	5.982937	-0.503372	0.628268
X ₁ - Presión	-0.00420	0.012310	-0.341034	0.741862
X ₂ - Temperatura	0.20354	0.207637	0.980272	0.355662
X ₃ - % de Cosolvente	-0.01576	0.112898	-0.139577	0.892444
X ₁ ²	0.1038 x 10 ⁻⁵	0.000013	0.082115	0.936573
X ₂ ²	-0.00183	0.002003	-0.914571	0.387152
X ₃ ²	0.00360	0.001399	2.572143	0.033017
X ₁ X ₂	-0.00001	0.000200	-0.045266	0.965005
X ₁ X ₃	0.40924 x 10 ⁻³	0.000162	2.529074	0.035306
X ₂ X ₃	-0.00188	0.002024	-0.930891	0.379145

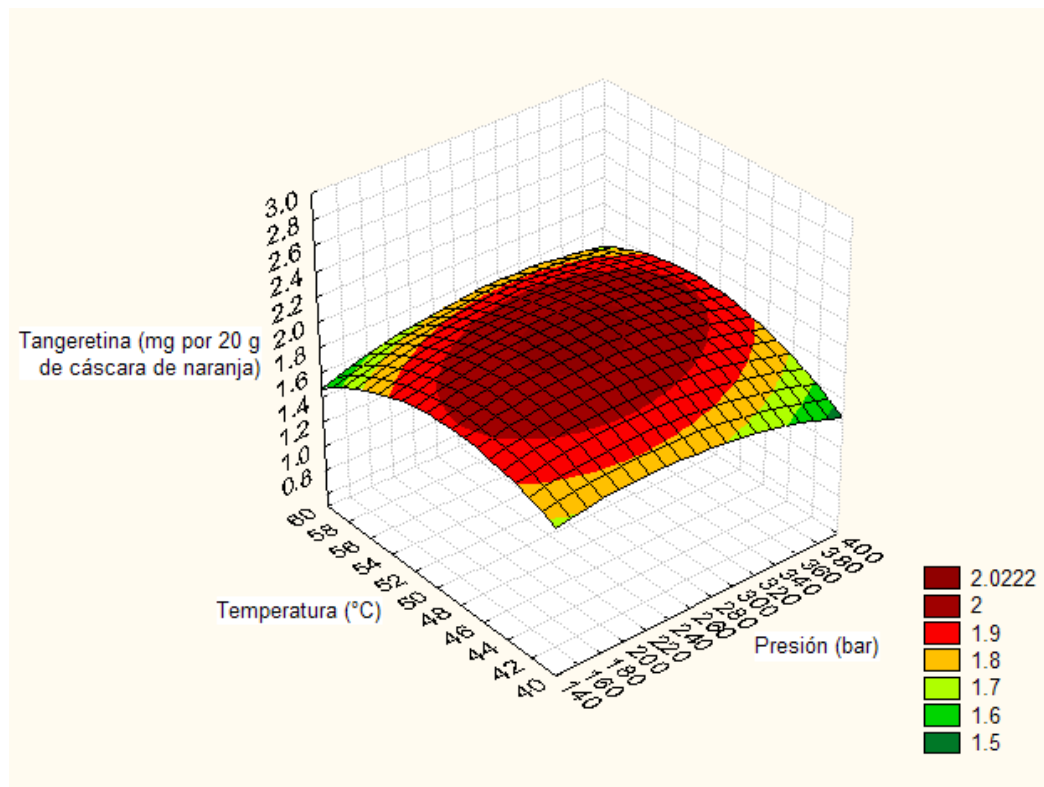


Figura 4.6 Efecto de la presión y temperatura de extracción en el rendimiento de tangeretina, con 10 % de cosolvente. Gráfica de superficie de respuesta.

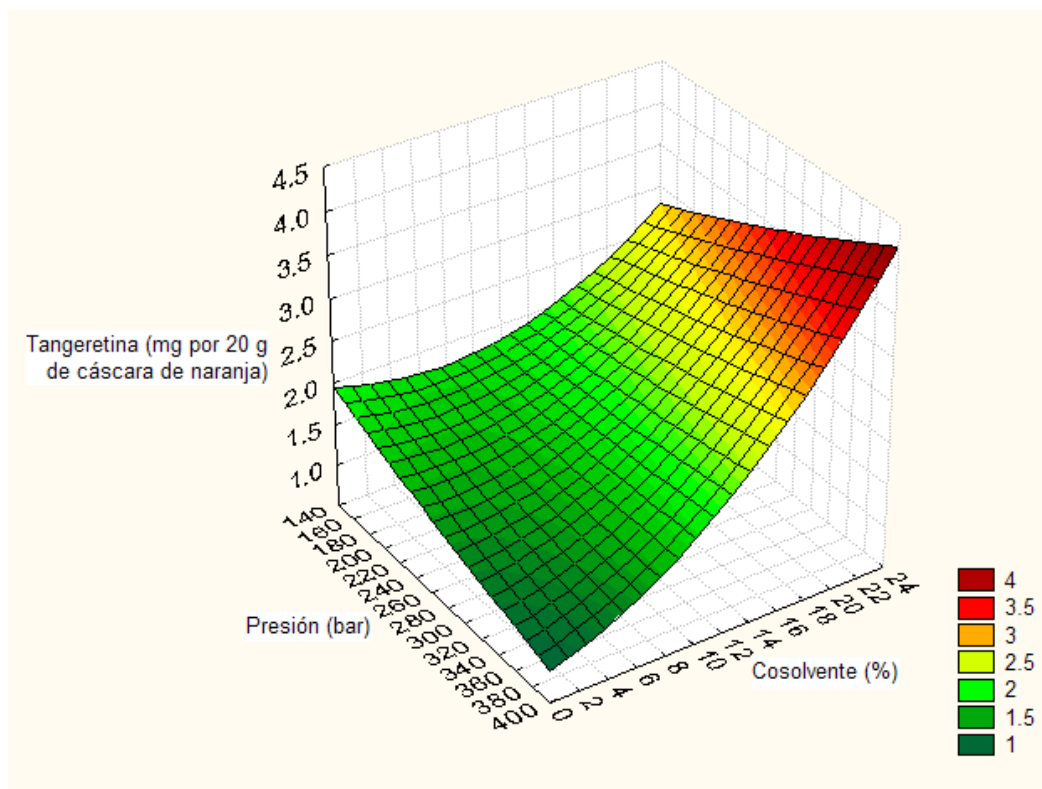


Figura 4.7 Efecto de la presión y porcentaje de cosolvente en el rendimiento de tangeretina, a una temperatura de 50 °C. Gráfica de superficie de respuesta.

La nobiletina contiene en su estructura química seis grupos polares metoxilo, uno más que la tangeretina. La presencia de este grupo adicional incrementa la polaridad de la nobiletina, haciéndola más polar que la tangeretina (Dugo *et al.*, 1996). Esto podría explicar el requerimiento de presiones mayores en la extracción de nobiletina con respecto a la tangeretina.

El efecto de la temperatura y el porcentaje de cosolvente sobre el rendimiento de tangeretina (Figura 4.8), fue similar al presentado por la extracción de nobiletina (Figura 4.5).

Finalmente, las condiciones óptimas de operación determinadas por el análisis de superficie de respuesta para obtener el máximo rendimiento, tanto para nobiletina como para tangeretina, fueron 400 bar, 60 °C y 23.35 % de cosolvente. Los rendimientos óptimos estimados bajo estas condiciones de extracción, fueron 57.66 mg de nobiletina y 3.65 mg de tangeretina por cada 20 g de cáscara de naranja.

4.5 Extracción de Flavonoides con Solventes Orgánicos

La extracción con metanol-DMSO (1:1 v/v), ha sido la técnica comúnmente usada en la extracción de flavonoides de sustratos cítricos (Ozaki *et al.*, 2006). En los extractos de cáscara de naranja *Citrus sinensis* obtenidos con estos solventes, se identificaron los siguientes flavonoides: narirutina, hesperidina, sinensetina, nobiletina, tetrametil escutellareina y tangeretina (Figuras 4.9 y 4.10). Las flavonas polimetoxiladas: hexametil éter quercetagetina (3,5,6,7,3',4'-hexametoxiflavona) y 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona, fueron tentativamente identificadas dado su orden de elución en el cromatograma.

En la Tabla 4.5 se compara la eficiencia de la técnica de extracción con fluidos supercríticos con la de extracción con solventes orgánicos, en base a los rendimientos de flavonoides obtenidos experimentalmente. Como puede observarse, la solución solvente

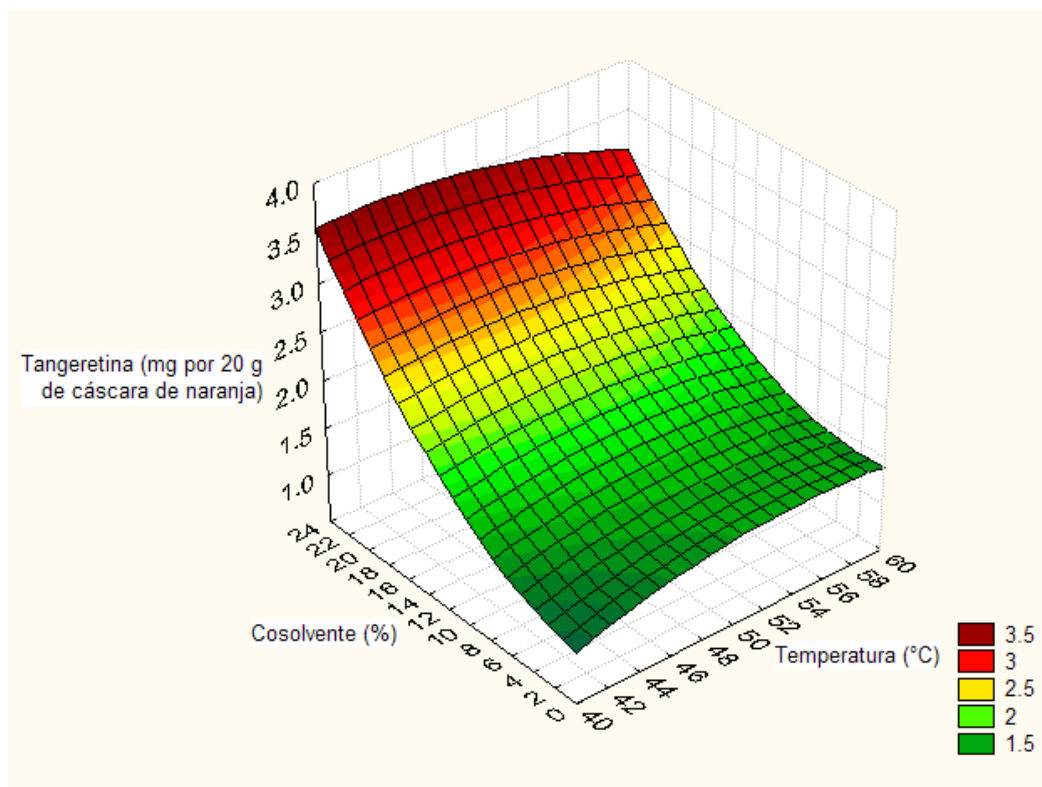


Figura 4.8 Efecto de la temperatura y porcentaje de cosolvente en el rendimiento de tangeretina, a una presión de 275 bar. Gráfica de superficie de respuesta.

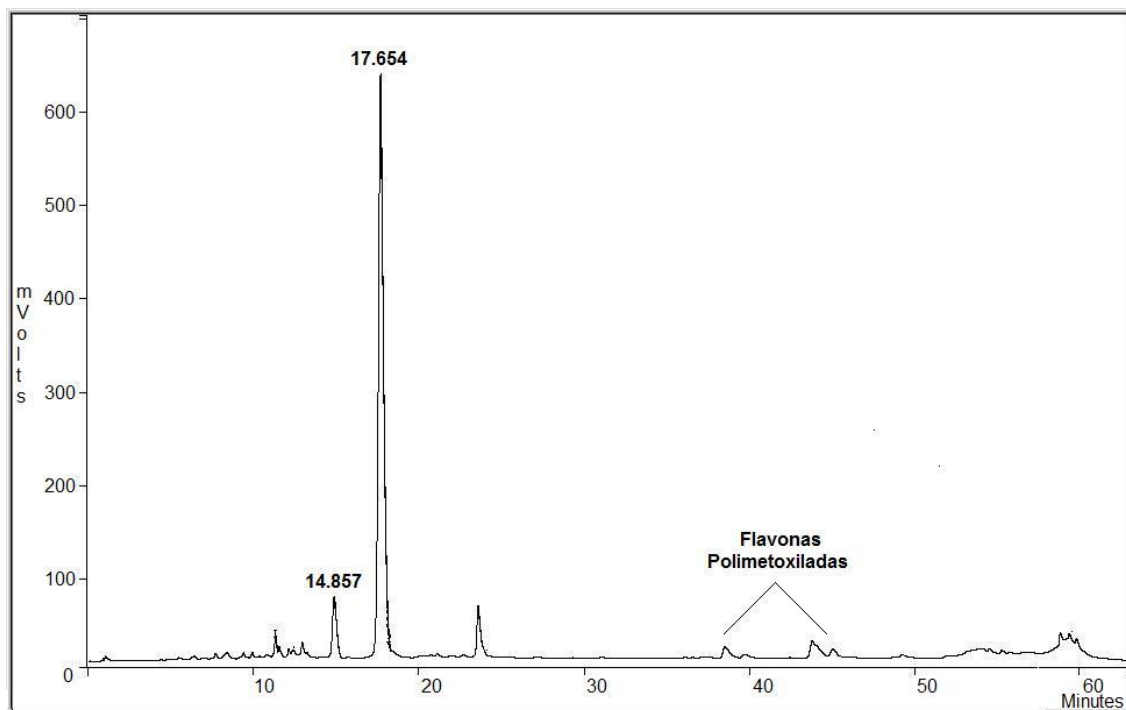


Figura 4.9 Perfil HPLC de flavonoides identificados en extractos obtenidos con la técnica convencional de solventes, determinados a 285 nm: narirutina (14.857 min); hesperidina (17.654 min). Cromatograma de extracto obtenido con metanol-DMSO (1:1 v/v).

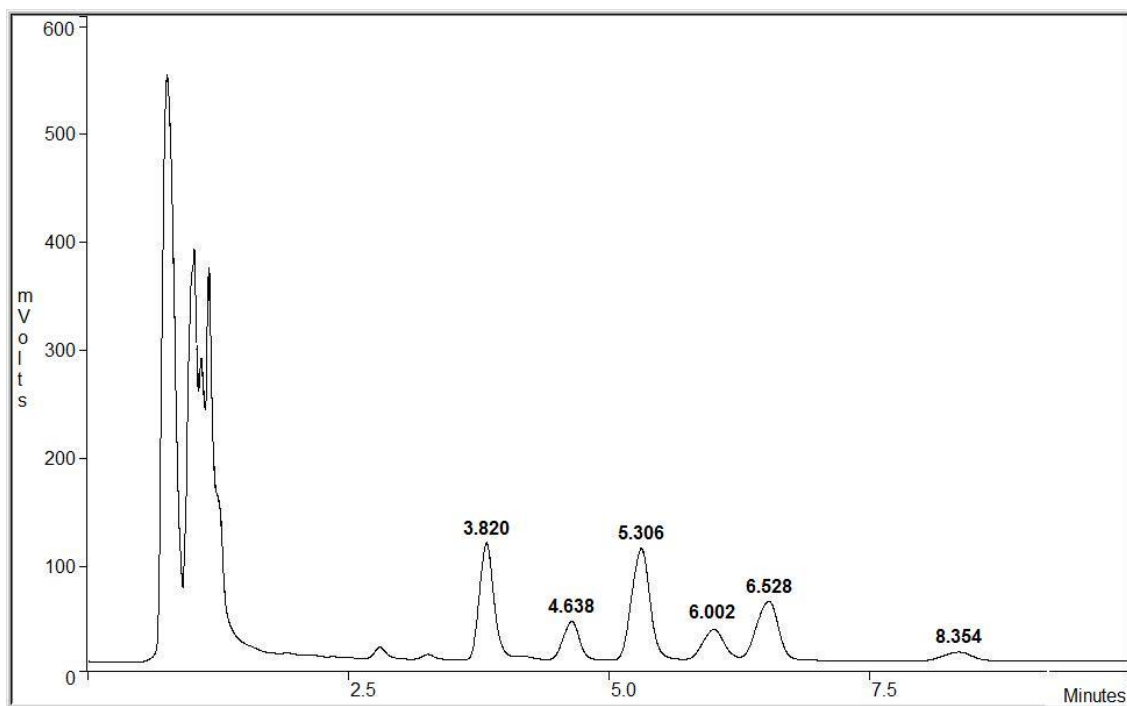


Figura 4.10 Perfil HPLC de flavonas polimetoxiladas identificadas en extractos obtenidos con la técnica convencional de solventes, determinadas a 340 nm: sinensetina (3.820 min); hexametil éter quercetagetina (4.638 min); nobiletina (5.306 min); tetrametil escutellareina (6.002 min); 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona (6.528 min); y tangeretina (8.354 min). Cromatograma de extracto obtenido con metanol-DMSO (1:1 v/v).

Tabla 4.5 Rendimientos de flavonoides obtenidos con la técnica de extracción con fluidos supercríticos y con la técnica de extracción con solventes orgánicos (mg por 100 g de cáscara de naranja *Citrus sinensis* variedad Valencia).

FLAVONOIDE	EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS ^a	EXTRACCIÓN CON SOLVENTES ORGÁNICOS ^b	EXTRACCIÓN CON SOLVENTES ORGÁNICOS ^c
Narirutina	cantidades traza	531.55	199.8
Hesperidina	179.35	2174.71	1917.0
Sinensetina	181.88	70.45	30.5
Nobiletina	217.58	81.60	51.3 ^d
Tetrametil escutellareina	65.22	33.77	
Tangeretina	18.91	8.79	10.9 ^e

^a Extraídos con CO₂SC (275 bar, 50 °C y 23.35 % de cosolvente).

^b Resultados obtenidos en este trabajo. Extraídos con metanol-DMSO (1:1 v/v)

^c Resultados reportados en la literatura (Manthey y Grohmann, 1996). Extraídos con metanol-DMSO (1:1 v/v|).

^d Nobiletina/Tetrametil escutellareina.

^e Tangeretina/5-hidroxi-3,7,8,3',4'-Pentametoxiflavona.

metanol-DMSO fue más efectiva en la extracción de las flavanonas hesperidina y narirutina, en tanto que con la extracción con fluidos supercríticos (CO₂ supercrítico-etanol) se obtuvieron mayores rendimientos de nobiletina, sinensetina, tetrametil escutellareina y tangeretina.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la técnica de extracción supercrítica demostró ser más selectiva para la obtención de flavonas polimetoxiladas. Estos compuestos son los flavonoides menos polares y se encuentran localizadas principalmente en el flavedo, como componentes del aceite esencial de la cáscara de naranja (Ozaki *et al.*, 2006; Mouly *et al.*, 1999). Lo anterior favorece su solubilidad en CO₂ supercrítico.

Los contenidos de flavonoides en cáscara de la misma especie de cítricos, pueden variar de manera importante dependiendo del estado de madurez del fruto, así como de la región de cultivo. A esto puede deberse la diferencia entre el contenido de flavonoides obtenido experimentalmente con la extracción convencional de solventes y el reportado en la literatura (Tabla 4.5).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se identificaron y cuantificaron los principales flavonoides presentes en la cáscara de naranja *Citrus sinensis*, variedad Valencia, de Guaymas, Sonora, México, con la técnica de extracción con solventes orgánicos (metanol-DMSO), convencionalmente usada en la extracción de flavonoides cítricos. Los compuestos detectados fueron las flavanonas glicosiladas: hesperidina y narirutina; y las flavonas polimetoxiladas: sinensetina, nobiletina, tangeretina y tetrametil escutellareina. Concordando con lo reportado en la literatura científica para cáscara de naranja *Citrus sinensis*, la hesperidina fue el flavonoide más abundante.

Se obtuvieron extractos de cáscara de naranja regional con la técnica de extracción con CO₂ supercrítico, a diferentes condiciones de presión, temperatura y porcentaje de cosolvente (etanol), siguiendo el diseño de experimentos establecido. Se identificaron y cuantificaron los principales flavonoides contenidos en los extractos. En todos los extractos supercríticos se encontraron presentes las flavonas polimetoxiladas: sinensetina, nobiletina, tangeretina y tetrametil escutellareina. En los extractos supercríticos con mayor porcentaje de cosolvente se detectaron pequeñas cantidades de hesperidina. De acuerdo a su estructura y propiedades químicas, los compuestos flavonoides poseen de moderada a alta polaridad. La extracción supercrítica resultó altamente efectiva para la obtención de los flavonoides cítricos menos polares (flavonas polimetoxiladas), al recuperar más de dos veces la cantidad obtenida con la técnica de solventes metanol-DMSO. Por otra parte, los rendimientos de extracción de flavonoides de mayor polaridad y peso molecular (flavanonas glicosiladas), fueron considerablemente menores con la técnica de extracción supercrítica, que con la técnica

de extracción con solventes metanol-DMSO.

Los resultados obtenidos en el trabajo experimental permitieron identificar los principales flavonoides obtenidos con los diferentes métodos de extracción. De acuerdo a ellos, con la técnica de extracción con solventes metanol-DMSO es posible obtener extractos de cáscara de naranja con mayores cantidades de flavanonas glicosiladas (hesperidina y narirutina), en tanto que con la técnica de extracción con CO₂ supercrítico y etanol como cosolvente se obtienen extractos más concentrados de flavonas polimetoxiladas (sinensetina, nobiletina, tangeretina y tetrametil escutellareina).

La nobiletina y la tangeretina son dos de los flavonoides de mayor interés farmacológico y potencial de aplicación presentes en la cáscara de naranja *Citrus sinensis*. La técnica de extracción supercrítica resultó una mejor opción que la extracción convencional con solventes metanol-DMSO, para la obtención de extractos con estos compuestos.

La interacción entre la presión de extracción y el porcentaje de cosolvente, fue determinada por la metodología de superficie de respuesta como el factor de mayor influencia en el rendimiento de extracción de nobiletina y tangeretina ($p < 0.001$ y $p < 0.035$, respectivamente). El término cuadrático del porcentaje de cosolvente también tuvo un efecto significativo, aunque menor, en la obtención de estos compuestos ($p < 0.016$ para nobiletina y $p < 0.033$ para tangeretina). Las condiciones óptimas de extracción determinadas por los modelos de extracción de nobiletina y tangeretina fueron 400 bar, 60 °C y 23.35 % de cosolvente. Bajo estas condiciones fue posible extraer 57.66 mg de nobiletina y 3.65 mg de tangeretina por cada 20 g de cáscara de naranja.

El extracto de cáscara de naranja obtenido con solventes orgánicos (metanol-DMSO) en la experimentación, presentó un mayor contenido de flavonas polimetoxiladas que extractos de cáscara de naranja de la misma variedad, obtenidos con el mismo sistema de solventes, reportados en la literatura. El contenido de flavonoides en frutos de plantas de

la misma especie y variedad, puede variar en función del origen geográfico y el estado de madurez del fruto, entre otros factores. La cáscara de naranja usada en el presente trabajo experimental fue una buena fuente de flavonas polimetoxiladas.

5.2 Recomendaciones

La extracción de compuestos de sustratos vegetales en un proceso supercrítico se caracteriza por: a) un periodo inicial de velocidad de extracción constante, en el que la transferencia de masa se da por convección en la fase fluida, alrededor de las partículas del sustrato, y en donde se extrae el soluto más accesible; y b) un periodo de extracción final en el que la transferencia de masa se ve limitada por la difusión del soluto en el interior de las partículas del sustrato, por lo que la velocidad de extracción tiende a alcanzar un valor mínimo. El periodo final de extracción ocurre una vez que se ha agotado el soluto fácilmente accesible (Rosa y Meireles, 2005). Se estima que del 70 al 90 % de la cantidad total de compuesto presente en el sustrato se extrae en el primer periodo de extracción supercrítica (Meireles, 2003). Desde el punto de vista económico, un proceso de extracción comercial con un 90 % de extracción de los compuestos de interés puede resultar más recomendable que la opción de extender el tiempo de proceso hasta completar el 100 % de recuperación. Dados los puntos anteriores, como continuación de la investigación se recomienda estudiar el comportamiento cinético de la extracción supercrítica de nobiletina y tangeretina, con la finalidad de obtener información del porcentaje de rendimiento acumulado de extracción de estos compuestos a diferentes tiempos de proceso, y poder determinar en función de costos de operación y valor del producto, un tiempo de procesamiento óptimo.

La extracción supercrítica es una técnica de interés para diversas industrias. No obstante, una limitación de esta técnica en la extracción de sustratos sólidos es el costo de procesamiento, el cual se ve incrementado por ser una operación por lotes, debido al requerimiento de altas presiones de operación. Una alternativa propuesta para superar esta limitación es compactar la materia prima, peletizándola, de manera que sea posible

incrementar la carga de sustrato en el extractor (del Valle *et al.*, 2003). Por lo tanto, resulta recomendable incluir en el pretratamiento de la cáscara de naranja, una etapa de peletización, la cual incrementaría el rendimiento volumétrico del proceso de extracción (masa de extracto recuperado por unidad de tiempo y unidad de volumen del recipiente de extracción). Además, la operación de peletización podría dar origen a una nueva microestructura en la materia prima que favoreciera la velocidad de extracción, al destruir paredes celulares y otras barreras de transferencia de masa dentro del sustrato (del Valle *et al.*, 2003 b).

De acuerdo a resultados de investigaciones publicadas en la literatura científica (Choi *et al.*, 2007; Del Río *et al.* (1998), el contenido de flavonoides presentes en la cáscara de los frutos cítricos puede variar significativamente con el estado de madurez de los frutos. En la presente investigación se recomienda estudiar el efecto del estado de madurez de la naranja (frutos maduros e inmaduros), en los rendimientos de nobiletina y tangeretina obtenidos con la técnica de extracción supercrítica.

ANEXOS

Anexo A. Patentes Relativas a Aplicaciones Biomédicas de Hesperidina.

PATENTE	TÍTULO	TITULAR / INVENTOR
US 5,849,786 ^a	Process for the treatment or prevention of herpes.	Inventores: Bidel, Christian-Georges (FR) Poirson, Jean (FR)
US 5,763,414 ^b	Hesperidin and hesperetin as 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase inhibitor.	Titular: Korea Institute of Science and Technology (KR) Inventores: Bok, Song-Hae (KR) Son, Kwang-Hee (KR) Jeong, Tae-Sook (KR) Kwon, Byoung-Mog (KR) Kim, Young-Kook (KR) Choi, Doil (KR) Kim, Sung-Uk (KR) Bae, Ki-Hwan (KR) Park, Yong-Bok (KR) Choi, Myung-Sook (KR) Hwang, Ingyu (KR) Moon, Surk-Sik (KR) Kwon, Yong-Kook (KR) Ahn, Jung-Ah (KR) Lee, Eun-Sook (KR)
US 4,559,224	Tooth and mouth care agent.	Titular: Blendax-Werke R. Schneider GmbH & Co. (DE) Inventor: Raaf, Helmut (DE)

^a Invención protegida también como Patente EP 0 722 325 B1^b Invención protegida también como Patente EP 0 957 911 B1

Anexo A. Patentes Relativas a Aplicaciones Biomédicas de Hesperidina. (cont.)

PATENTE	TÍTULO	TITULAR / INVENTOR
EP 1 721 613 B1	Hesperidin for the treatment of epilepsy.	Titular: Mewicon med. wiss. Beratung GmbH (AT) Inventor: Dimpfel, Wilfried (DE)
EP 1 536 806 B1	Use of hesperidine or one of its derivatives for making a medicine for bone formation stimulation.	Titular: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) (FR) Inventores: Horcajada, Marie-Noelle (FR) Coxam, Véronique (FR) Morand, Christine (FR) Davicco, Marie-Jeanne (FR)
EP 0 883 408 B1	Ophthalmologically useful composition, products containing the composition and process for disinfecting and/or cleaning contact lenses.	Titular: De Bruijn, Christianus Hendrikus M. M. (DE) Inventor: De Bruijn, Christianus Hendrikus M. M. (DE)
JP 2005-132791	Antiallergic agent.	Titular: Univ Kinki Inventores: Kubo, Michitoku Matsuda, Hideaki

Fuente: Elaboración propia con base en datos de: Free Patents Online, 2009, www.freepatentsonline.com; EPO Online Services, 2009, European Patent Office, www.epoline.org; esp@cenet, 2009, European Patent Office, www.espacenet.com; Patent Abstracts of Japan, 2009, Japan Patent Office, www.ipdl.inpit.go.jp/homepg_e.ipdl.

Anexo B. Solicitudes de Patente Relativas a Aplicaciones Biomédicas de Hesperidina.

SOLICITUD DE PATENTE (Número de Publicación)	TÍTULO	SOLICITANTE / INVENTOR
PCT/MX2008/000119 (WO 2009/031878 A1)	Pharmaceutical composition combining various venotonic and vasoprotective agents for the treatment of chronic venous insufficiency.	Inventores: Espinosa Abdala, Leopoldo de Jesús (MX) García, Armenta María Elena (MX) Santos Murillo, Josefina (MX) Álvarez Ochoa, Victor Guillermo (MX)
PCT/IB2008/053566 ^a (WO 2009/031106 A2)	Use of a combination of hesperidin and of a microorganism for influencing the barrier function of the skin.	Solicitantes: L'Oreal (FR) Nestec, S.A. (CH) Inventores: Gueniche, Audrey (FR) Castiel, Isabelle (FR)
PCT/FR2008/051453 (WO 2009/022077 A2)	Use of hesperidin or of a derivative thereof for the prevention and/or treatment of slackened skin.	Solicitantes: L'oreal (FR) Nestec, SA (CH) Inventores: Gueniche, Audrey (FR) Castiel, Isabelle (FR)
PCT/IB2006/004220 ^b (WO 2007/093853 A2)	Compositions and methods for treatment and prevention of metabolic syndrome and its associated conditions with combinations of flavonoids, liminoids and tocotrienols.	Solicitante: KGK Synergize Inc. (CA) Inventor: Guthrie, Najla (CA)

^a Presentada como: Solicitud de Patente US 12/204,437 (US 2009/0068161 A1)^b Presentada como: Solicitud de Patente US 11/595,558 (US 2007/0117763 A1)

Anexo B. Solicitudes de Patente Relativas a Aplicaciones Biomédicas de Hesperidina.
(cont.)

SOLICITUD DE PATENTE (Número de Publicación)	TÍTULO	SOLICITANTE / INVENTOR
PCT/FR2003/002005 ^c (WO 2004/002496 A1)	Use of hesperidin or one of its derivatives for making a medicine for bone formation stimulation.	Solicitante: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) (FR) Inventores: Horcajada, Marie-Noelle (FR) Coxam, Véronique (FR) Morand, Christine (FR) Davicco, Marie-Jeanne (FR)
PCT/IB01/00256 ^d (WO 02/055071 A1)	Compositions and methods for regulating lipoproteins and hypercholesterolemia with limonoids flavonoids and tocotrienols.	Solicitante: KGK, Synergize (CA) Inventores: Guthrie, Najla (CA) Kurowska, Elzbieta (CA)
US 10/504,643 (US 2005/0142092 A1)	Cosmetic or dermatopharmaceutical compositions which are used to reduce bags and circles under the eyes.	Inventor: Lintner, Karl (FR)
JP 2007-300148 (JP 2008-156341)	Agent for reducing waist size.	Solicitante: Daiichi Sankyo Healthcare Co Ltd Inventor: Hanawa, Masaaki

^c Presentada como: Solicitud de Patente US 10/519,386 (US 2006/0034893 A1)

^d Presentada como: Solicitud de Patente US 09/481,724 (US 2001/0055627 A1)

Anexo B. Solicitudes de Patente Relativas a Aplicaciones Biomédicas de Hesperidina.
(cont.)

SOLICITUD DE PATENTE (Número de Publicación)	TÍTULO	SOLICITANTE / INVENTOR
JP 2007-147286 (JP 2008-297279)	Agent for improving vascular endothelial function.	Solicitante: Kao Corp Inventores: Yamamoto, Masateru Suzuki, Atsushi
JP 2003-372431 (JP 2005-132792)	Antipruritic agent.	Solicitante: Univ Kinki Inventores: Kubo, Michitoku Matsuda, Hideaki

Fuente: Elaboración propia con base en datos de: Free Patents Online, 2009, www.freepatentsonline.com; EPO Online Services, 2009, European Patent Office, www.epoline.org; Esp@cenet, 2009, European Patent Office, www.espacenet.com; Patent Abstracts of Japan, 2009, Japan Patent Office, www.ipdl.inpit.go.jp/homepg_e.ipdl.

Anexo C. Patentes Relativas a Aplicaciones Biomédicas de Flavonas Polimetoxiladas.

PATENTE	TÍTULO	TITULAR / INVENTOR
US 7,201,928	Extracts of orange peel for prevention and treatment of cancer.	<p>Titular: Rutgers, The State University of New Jersey (US)</p> <p>Inventores: Huang, Mou Tuan (US) Ho, Chi-tang (US) Rosen, Robert T. (US) Ghai, Geetha (US) Lipkin, Martin (US) Chen, Kuang Yu (US) Telang, Nitin (US) Boyd, Charles (US) Csiszar, Katalin (US)</p>
US 6,987,125	Compositions and methods of treating, reducing and preventing cardiovascular diseases and disorders with polymethoxyflavones.	<p>Titular: The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture (US)</p> <p>Inventores: Guthrie, Najla (CA) Kurowska, Elzbieta Maria (CA) Manthey, John A. (US) Horowitz, Sylvia (US)</p>
US 6,251,400	Compositions and methods of treatment of neoplastic diseases and hypercholesterolemia with citrus limonoids and flavonoids and tocotrienols.	<p>Titular: KGK Synergize INC (CA)</p> <p>Inventores: Guthrie, Najla (CA) Kurowska, Elzbieta Maria (CA) Carroll, Kenneth Kitchener (CA)</p>

Anexo C. Patentes Relativas a Aplicaciones Biomédicas de Flavonas Polimetoxiladas.
(cont.)

PATENTE	TÍTULO	TITULAR / INVENTOR
US 6,239,114	Compositions and methods for treatment of neoplastic diseases with combinations of limonoids, flavonoids and tocotrienols.	Titular: KGK, Synergize (CA) Inventores: Guthrie, Najla (CA) Kurowska, Elzbieta M. (CA)
US 6,184,246	Inhibition of cytokine production by polymethoxylated flavones.	Titulares: The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture (US) Amgen, Inc. (Thousand Oaks, US). Inventores: Manthey, John A. (US) Manthey, Carl L. (US) Montanari, Antonio (US)
US 3,903,266	Compositions and methods for disaggregating blood cells.	Inventor: Robbins; Ralph C. (US)
JP 2000-080035	Matrix metalloprotease production inhibitor.	Titular: National Institute of Fruit Tree Science Inventores: Yano, Akimitsu Ogawa, Kazunori Yoshida, Toshio Nekado, Hirohisa Nonomura, Mutsuko Isawa, Atsushi Sato, Takashi Mimaki, Yoshihiro Sashita, Yutaka Ito, Akira

Fuente: Elaboración propia con base en datos de: Free Patents Online, 2009, www.freepatentsonline.com; EPO Online Services, 2009, European Patent Office, www.epoline.org; esp@cenet, 2009, European Patent Office, www.espacenet.com; Patent Abstracts of Japan, 2009, Japan Patent Office, www.ipdl.inpit.go.jp/homepg_e.ipdl.

Anexo D. Solicitudes de Patente Relativas a Aplicaciones Biomédicas de Flavonas Polimetoxiladas.

SOLICITUD DE PATENTE (Número de Publicación)	TÍTULO	SOLICITANTE / INVENTOR
PCT/IB2007/003174 (WO 2008/035208 A2)	The use of flavonoids for the inhibition of cellular growth.	Solicitante: KGK Synergize Inc. (CA) Inventores: Morley, Karen (CA) Koropatnick, James (CA) Guthrie, Najla (CA)
PCT/IB2006/004220 ^a (WO 2007/093853 A2)	Compositions and methods for treatment and prevention of metabolic syndrome and its associated conditions with combinations of flavonoids, liminoids and tocotrienols.	Solicitante: KGK Synergize Inc. (CA) Inventor: Guthrie, Najla (CA)
PCT/US2006/032972 ^b (WO 2007/024982 A2)	Methods for managing adipocyte fat accumulation.	Solicitante: Well-Gen, Inc. (US) Inventores: Dushenkov, Slavik (US) Evans, David (US)
PCT/US2006/027265 ^c (WO 2007/011674 A2)	Compositions and methods for treating and preventing inflammatory and/or degenerative processes in humans and other animals.	Solicitante: Baker, Donald J. (US) Inventor: Baker, Donald J. (US)

^a Presentada como: Solicitud de Patente US 11/595,558 (US 2007/0117763 A1)

^b Presentada como: Solicitud de Patente US 11/508,587 (US 2007/0088078 A1)
Solicitud de Patente EP20060813681 (EP1928480 A2)
Solicitud de Patente CA2620013 (CA 2 620 013 A1)

^c Presentada como: Solicitud de Patente US 11/884,170 (US 2008/0317885 A1)
Solicitud de Patente CA 261544 (CA 2 615 444)

Anexo D. Solicitudes de Patente Relativas a Aplicaciones Biomédicas
de Flavonas Polimetoxiladas. (cont.)

SOLICITUD DE PATENTE (Número de Publicación)	TÍTULO	SOLICITANTE / INVENTOR
PCT/US2006/025588 ^d (WO 2007/002897 A2)	Compositions to improve the bioavailability of polymethoxyflavones and tocotrienols for treatment of cardiovascular disease.	Solicitante: KGK Synergize Inc. (CA) Inventores: Guthrie, Najla (CA) Wenderoth, Sondra (US)
PCT/US2006/021079 ^e (WO 2006/132879 A2)	Soft gel capsules containing polymethoxylated flavones and palm oil tocotrienols.	Solicitante: Soft Gel Technologies, Inc. (US) Inventor: Udell, Ronald G. (US)
PCT/US2006/020441 ^f (WO 2006/127996 A2)	Compositions and methods for optimizing exercise recovery.	Solicitante: Rutgers, The State University Of New Jersey (US) Inventores: McKeever, Kenneth H. (US) Franke, William C. (US) Rosen, Robert (US) Streltsova, Jennifer (US) Liburt, Nettie (US)

^d Presentada como: Solicitud de Patente US 11/478,970 (US 2007/0111953 A1)

^e Presentada como: Solicitud de Patente US 11/176,593 (US 2006/0003947 A1)

^f Presentada como: Solicitud de Patente US 11/439,718 (US 2007/0042972 A1)
Solicitud de Patente EP 06771289.3 (EP 1 883 300 A2)
Solicitud de Patente CN 200680027108.3 (CN 101227818A)
Solicitud de Patente CA 2608657 (CA 2 608 657 A1)
Solicitud de Patente AU 2006249825 (AU 2006249825 A1)

Anexo D. Solicitudes de Patente Relativas a Aplicaciones Biomédicas
de Flavonas Polimetoxiladas. (cont.)

SOLICITUD DE PATENTE (Número de Publicación)	TÍTULO	SOLICITANTE / INVENTOR
PCT/IB2005/001427 ^g (WO 2005/115378 A1)	Compositions comprising flavonoids and tocotrienols and methods thereof.	Solicitante: KGK Synergize, Inc. (CA) Inventor: Guthrie, Najla (CA)
PCT/IB2005/001424 ^h (WO 2005/115377 A1)	Functional foods comprising flavonoids and tocotrienols and methods thereof.	Solicitante: KGK Synergize, Inc. (CA) Inventor: Guthrie, Najla (CA)
PCT/IB2005/001420 ⁱ WO 2005/115376 A1	Pharmaceutical products for treating neoplastic disease and inflammation.	Solicitante: KGK Synergize Inc. (CA) Inventor: Guthrie, Najla (CA)

- ^g Presentada como: Solicitud de Patente US 11/135,693 (US 2006/0013901 A1)
Solicitud de Patente EP 05 74 3969 (EP 1748774 A1)
Solicitud de Patente CA 2567969 (CA 2 567 969 A1)
Solicitud de Patente CN 200580025359.3 (CN 101001624 A)
Solicitud de Patente KR 1020067027108 (KR 1020070088325 A)
Solicitud de Patente AU 2005247162 (AU 2005247162 A1)
- ^h Presentada como: Solicitud de Patente US 11/135,675 (US 2006/0013861 A1)
Solicitud de Patente EP 20050743956 (EP 1748773 A1)
Solicitud de Patente CA 2567963 (CA 2 567 963 A1)
Solicitud de Patente CN 200580025406.4 (CN 1988902 A)
Solicitud de Patente KR 1020067027105 (KR 1020070088324 A)
Solicitud de Patente AU 2005247160 (AU 2005247160 A1)
- ⁱ Presentada como: Solicitud de Patente US 11/135,694 (US 2006/0013902 A1)
Solicitud de Patente EP 05 75 2904 (EP 1748775 A1)
Solicitud de Patente CA 2567959 (CA 2 567 959)
Solicitud de Patente CN 200580025391.1 (CN 1988901 A)
Solicitud de Patente KR 1020067027110 (KR 1020070088326 A)
Solicitud de Patente AU 2005247159 (AU 2005247159 A1)

Anexo D. Solicitudes de Patente Relativas a Aplicaciones Biomédicas
de Flavonas Polimetoxiladas. (cont.)

SOLICITUD DE PATENTE (Número de Publicación)	TÍTULO	SOLICITANTE / INVENTOR
PCT/CA02/00662 ^j (WO 02/087567 A2)	Use of polymethoxylated flavones for treating insulin resistance.	Solicitante: KGK Synergize Inc. (CA) Inventores: Guthrie, Najla (CA) Kurowska, Elzbieta (CA)
PCT/IB01/00256 ^k (WO 02/055071 A1)	Compositions and methods for regulating lipoproteins and hypercholesterolemia with limonoids flavonoids and tocotrienols.	Solicitante: KGK, Synergize (CA) Inventores: Guthrie, Najla (CA) Kurowska, Elzbieta (CA)
US 11/690,754 US 2007/0224300 A1	Weight loss compositions using citrus peel extract and <i>Eurycoma longifolia</i> .	Inventor: Talbot, Shawn M. (US)
US 11/690,714 US 2007/0224299 A1	Weight loss with citrus flavonoids.	Inventor: Talbot, Shawn M. (US)
US 11/690,683 US 2007/0224298 A1	Inhibiting 11(beta)-HSD1 with citrus flavonoids.	Inventor: Talbot, Shawn M. (US)
US 11/116,997 US 2006/0116334 A1	Folate based composition for treatment of the cardiovascular system.	Inventor: Hendrix, Curt (US)
US 11/102,278 (US 2005/0227930 A1)	Cholesterol lowering combination.	Solicitante: KGK, Synergize Inc. (CA) Inventor: Guthrie, Najla (CA)

^j Presentada como: Solicitud de Patente US 10/697,563 (US 2004/0152641 A1)

^k Presentada como: Solicitud de Patente US 09/481,724 (US 2001/0055627 A1)

Anexo D. Solicitudes de Patente Relativas a Aplicaciones Biomédicas
de Flavonas Polimetoxiladas. (cont.)

SOLICITUD DE PATENTE (Número de Publicación)	TÍTULO	SOLICITANTE / INVENTOR
JP 2002-304609 (JP 2004-137218)	Lipolysis promoter, and skin care preparation for external use and food and drink product using the same.	Solicitante: Nagase & Co. Ltd. Inventores: Ito, Hisatomi Hidano, Naoko Miyazaki, Toshitsugu

Fuente: Elaboración propia con base en datos de: Free Patents Online, 2009, www.freepatentsonline.com; EPO Online Services, 2009, European Patent Office, www.epoline.org; esp@cenet, 2009, European Patent Office, www.espacenet.com; Patent Abstracts of Japan, 2009, Japan Patent Office, www.ipdl.inpit.go.jp/homepg_e.ipdl.

BIBLIOGRAFÍA

Adil, İ.H., Çetin, H.İ., Yener, M.E., Bayındırlı, A., 2007. Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *J. Supercrit. Fluids* 43, 55-63.

AOAC, 1997. *Official Methods of Analysis*, 16th Ed., Association of Official Agricultural Chemists, Washington D.C.

AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis*, 12 Ed. Edition, Association of Official Agricultural Chemistry, Washington, D.C.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99, 191-203.

Began, G., Goto, M., Kodama, A., Hirose, T., 2000. Response surfaces of total oil yield of turmeric (*Curcuma longa*) in supercritical carbon dioxide. *Food Res. Int.* 33, 341-345.

Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuño, A., Del Río, J.A., 1997. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4505-4515.

Brachet, A., Mateus, L., Cherkaoui, S., Christen, P., Gauvrit, J.-Y., Lantéri, P., Veuthey, J.-L., 1999. Application of central composite designs in the supercritical fluid extraction of tropane alkaloids in plant extracts. *Analisis* 27, 772-778.

Bringas, T.E., Morales, H.E., 1988. Análisis de los Cambios Físicos y Químicos de Tres Variedades de Naranja *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Para la Determinación de Tiempos Óptimos de Cosecha Bajo Condiciones de la Costa de Hermosillo. Tesis de Licenciatura.

Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. pp. 65.

Brunner, G., 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *J. Food Eng.* 67, 21-33.

Brunner, G., 1994. Gas Extraction. An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. Springer, Germany, pp. 179-250.

Buslig, B.S., 1991. The orange. En: N.A.M. Eskin (ed.). *Quality and Preservation of Fruits*. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A., pp. 1-15.

Canalón, P.F., 1994. Changes in the saccharide composition of citrus juice and anatomical fractions during fruit maturation. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 107, 253-256.

Choi, S.Y., Ko, H.C., Ko, S.Y., Hwang, J.H., Park, J.G., Kang, S.H., Han, S.H., Yun, S.H., Kim, S.J., 2007. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 772-778.

Clifford, A.A., Williams, J.R., 2000. Introduction to Supercritical Fluids and Their Applications. En: J.R. Williams y A.A. Clifford (eds.). *Supercritical Fluid Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ., pp. 1-16.

Davies, F.S., Albrigo, L.G., 1994. Citrus. *Crop Production Science in Horticulture*. CAB International, Gran Bretaña, pp. 52-82, 202-224.

Del Río, J.A., Gómez, P., Baidez, A.G., Arcas, M.C., Botía, J.M., Ortuño, A., 2004. Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense mechanism of *Citrus sinensis* (Cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora*

citrophthora. J. Agric. Food Chem. 52, 1913-1917.

Del Río, J.A., Arcas, M.C., Benavente-García, O., Sabater, F., Ortuño, A., 1998. Changes of polymethoxylated flavones levels during development of *Citrus aurantium* (cv. Sevillano) fruits. Planta Med. 64, 575-576.

del Valle, J.M., de la Fuente, J.C., 2006. Supercritical CO₂ extraction of oilseeds: Review of kinetic and equilibrium models. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 46, 131-160.

del Valle, J.M., de la Fuente, J.C., Cardarelli, D.A., 2005. Contributions to supercritical extraction of vegetable substrates in Latin America. J. Food Eng. 67, 35-57.

del Valle, J.M., Godoy, C., Asencio, M., Aguilera, J.M., 2004. Recovery of antioxidants from boldo (*Peaumus boldus* M.) by conventional and supercritical CO₂ extraction. Food Res. Int. 37, 695-702

del Valle, J.M., Rivera, O., Mattea, M., Ruetsch, L., Daghero, J., Flores, A., 2004b. Supercritical CO₂ processing of pretreated rosehip seeds: Effect of process scale on oil extraction kinetics. J. Supercrit. Fluids 31, 159-174.

del Valle, J.M., Jiménez, M., Napolitano, P., Zetzl, C., Brunner, G., 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of pelletized Jalapeño peppers. J. Sci. Food Agr. 83, 550-556.

del Valle, J.M., Jiménez, M., de la Fuente, J.C., 2003b. Extraction kinetics of pre-pelletized Jalapeño peppers with supercritical CO₂. J. Supercrit. Fluids 25, 33-44.

del Valle, J.M., Napolitano, P., Fuentes, N., 2000. Estimation of relevant mass transfer parameters for the extraction of packed substrate beds using supercritical fluids. Ind. Eng. Chem. Res. 39, 4720-4728.

del Valle, J.M., Aguilera, J.M., 1999. Extracción con CO₂ a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos. *Food Sci. Technol. Int.* 5, 1-24.

Díaz, S., Espinosa, S., Brignole, E.A., 2005. Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids. Optimal process and solvent cycle design. *J. of Supercrit. Fluids* 35, 49-61.

Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2006. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2441-2469.

Dugo, P., Mondello, L., Dugo, G., Heaton, D.M., Bartle, K.D., Clifford, A.A., Myers P., 1996. Rapid analysis of polymethoxilated flavones from citrus oils by supercritical fluid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3900-3905.

Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J.A.M., 2003. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *P. Nutr. Soc.* 62, 599-603.

Eggers, R., 1996. Supercritical fluid extraction (SFE) of oilseeds/lipids in natural products. En: Jerry W. King y Gary R. List (eds.). *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*. AOACS Press, Champaign, IL, pp. 35-64.

EPO Online Services. EPO Online Services, 2009. European Patent Office. www.epoline.org. Consultado en Abril de 2009.

Escribano-Bailon, M.T., Santos-Buelga, C., 2003. Polyphenol extraction from foods. En: C. Santos-Buelga y G. Williamson (eds.) *Methods in Polyphenol Analysis*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 1-16.

Esp@cenet, 2009. European Patent Office. www.espacenet.com. Consultado en Abril de 2009.

Esquivel, M.M., Bernardo-Gil, M.G., King, M.B., 1999. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. *J. of Supercrit. Fluids* 16, 43-58.

Etcheverry, S.B., Ferrer, E.G., Naso, L., Rivadeneira, J., Salinas, V., Williams, P.A.M., 2008. Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 435-447.

Fálder, R.A., 2003. Enciclopedia de los alimentos: frutas. I. cítricos. Distribución y Consumo 69, 115-140.

FIRA, 2003. Riesgos y oportunidades de la red de valor naranja. Un enfoque competitivo. Boletín Informativo No. 319. Volumen XXXIV. 160 pp.

Free Patents Online, 2009. www.freepatentsonline.com. Consultado en Abril de 2009.

Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J.D., Singla, A.K., 2001. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother. Res.* 15, 655-669.

Germain, J.C., del Valle, J.M., de la Fuente, J.C., 2005. Natural convection retards supercritical CO₂ extraction of essential oils and lipids from vegetable substrates. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44, 2879-2886.

Gianuzzo, A.N., Boggetti, H.J., Nazareno, M.A., Mishima, H.T., 2003. Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of *Citrus paradisi*. *Phytochem. Analysis* 14, 221-223.

Güçlü-Üstündağ, Ö., Temelli, F., 2005. Solubility behavior of ternary system of lipids, cosolvents and supercritical carbon dioxide and processing aspects. *J. Supercrit. Fluids* 36, 1-15.

He, G.Q., Xiong, H.P., Chen, Q.H., Ruan, H., Wang, Z.Y., Traoré, L., 2005. Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Zhejiang Univ. Sci.* 10, 999-1004.

Hevia, F., Tramón, C., 2003. Deshidratado de plantas medicinales. En: H. Vogel y M. Berti (eds). *Cómo Producir y Procesar Plantas Aromáticas y Medicinales de Calidad*. Fundación para la Innovación Agraria, Santiago de Chile, pp. 77-97.

INEGI, 2008. El Sector Alimentario en México. Serie de Estadísticas Sectoriales. Edición 2008. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx>. Consultado el 19 de Marzo de 2009.

Jung, U.J., Lee, M.K., Park, Y.B., Kang, M.A., Choi, M.S., 2006. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int. J. Biochem. Cell B.* 38, 1134-1145.

Kanaze, F.I., Gabrieli, C., Kokkalou, E., Georgarakis, M., Niopas, I., 2003. Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 33, 243-249.

Kandaswami, C., Perkins, E., Soloniuk, D.S., Drzewiecki, G. Middleton, E.J., 1991. Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Lett.* 56, 147-152.

King, J.W., France, J.E., 1992. Basic principles of analytical supercritical fluid extraction. En: B. Wenclawiak (ed.). *Analysis with Supercritical Fluids: Extraction and Chromatography*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 32-60.

Kohno, H., Taima, M., Sumida, T., Azuma, Y., Ogawa, H., Tanaka, T., 2001. Inhibitory

effect of mandarin juice rich in β -cryptoxanthin and hesperidin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary tumorigenesis in mice. *Cancer Lett.* 174, 141-150.

Kurowska, E.M., Manthey, J.A., 2004. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2879-2886.

Leitner, W., 2004. Recent advances in catalyst immobilization using supercritical carbon dioxide. *Pure Appl. Chem.* 76, 635-644.

Li, S., Lo, C.Y., Ho, C.T., 2006. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4176-4185.

Ligor, M., Buszewski, B., 2003. Study of VOC distribution in citrus fruits by chromatographic analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 668-672.

Lin, M.C., Tsai, M.J., Wen, K.C., 1999. Supercritical extraction of flavonoids from *Scutellaria Radix*. *J. Chromatogr. A.* 830, 387-395.

López S., M., 1991. Distribución y química de los metabolitos secundarios de los géneros *tanacetum* y *gonospermum*. Tesis Doctoral. Univ. de las Palmas de Gran Canaria. España. pp. 216.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727-747.

Manthey, J.A., 2006. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of the polymethoxylated flavone content of orange oil residues. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3215-3218.

Manthey, J.A., Buslig, B.S., 2003. HPLC-MS analysis of methoxylated flavanones in orange oil residue. Proc. Fla. State Hort. Soc. 116, 410-413.

Manthey, J.A., Guthrie, N., 2002. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. J. Agric. Food Chem. 50, 5837-5843.

Manthey, J.A., Guthrie, N., Grohmann, K., 2001. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. Curr. Med. Chem. 8, 135-153.

Manthey, J., Grohmann, K., 1996. Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. J. Agric. Food Chem. 44, 811-814.

Meireles, M.A.A., 2003. Supercritical extraction from solid: process design data (2001-2003). Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. 7, 321-330.

Mira, B., Blasco, M., Subirats, S., 1996. Supercritical CO₂ extraction of essential oils from orange peel. J. Supercrit. Fluids 9, 238-243.

Miyagi, Y., Om, A.S., Chee, K.M., Bennink, M.R., 2000. Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice. Nutr. Cancer 36, 224-229.

Molina, M.R., 2005. Diagnóstico del Sistema Producto Cítricos en Sonora. Plan Rector Sistema Producto Cítricos en Sonora.

Molina, E., 2000. Nutrición y fertilización de la naranja. Informaciones Agronómicas No. 40. p. 5-11,13.

Moreno-Álvarez, M.J., Gómez, C., Mendoza, J., Belén, D., 1999. Carotenoides totales en cáscara de naranja (*Citrus sinensis* L. variedad Valencia). Revista Unellez de Ciencia y Tecnología 17, 92-99.

Morley, K.L., Ferguson, P.J., Koropatnick, J., 2007. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Lett.* 251, 168-178.

Mouly, P.P., Gaydou, E.M., Arzouyan, C., 1999. Separation and quantitation of orange juices using liquid chromatography of polymethoxylated flavones. *Analisis* 27, 284-288.

Murga, R., Ruiz, R., Beltrán, S., Cabezas, J.L., 2000. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3408-3412.

Naik, S.N., Lentz, H., Maheshawari, R.C., 1989. Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor equilibrium conditions. *Fluid Phase Equilib.* 49, 115-126.

Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., Ohta, H., 2006. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 178-192.

Olmo, M., Nadas, A., García, J.M., 2000. Nondestructive methods to evaluate maturity level of oranges. *J. Food Sci.* 65, 365-369.

Ozaki, K., Ishii, T., Koga, N., Nogata, Y., Yano, M., Ohta, H., 2006. Quantification of nobiletin and tangeretin in citrus by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Sci. Technol. Res.* 12, 284-289.

Pan, M.H., Chen, W.J., Lin-Shiau, S.Y., Ho, C.T., Lin, J.K., 2002. Tangeretin induces

cell-cycle G₁ arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 23, 1677-1684.

Patent Abstracts of Japan, 2009. Japan Patent Office. [ww.ipdl.inpit.go.jp/homepg_e.ipdl](http://www.ipdl.inpit.go.jp/homepg_e.ipdl). Consultado en Abril de 2009.

Pinelo, M., Ruiz-Rodríguez, A., Sineiro, J., Señoráns, F.J., Reglero, G., Núñez, M.J., 2007. Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 199-205.

Reverchon, E., 1997. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *J. of Supercrit. Fluids* 10, 1-37.

Robards, K., Antolovich, M., 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: A review. *Analyst* 122, 11R-34R.

Rodrigo, M.J., Marcos, J.F., Zacarías, L., 2004. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6724-6731.

Rooprai, H.K., Christidou, M., Pilkington, G.J., 2003. The potential for strategies using micronutrients and heterocyclic drugs to treat invasive gliomass. *Acta Neurochir.* 145, 683-690.

Rosa, P.T.V., Meireles, M.A.A., 2005. Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. *J. Food Eng.* 67, 235-240.

Ross, J.A., Kasum, C.M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 19-34.

Rostagno, M.A., Araujo, J.M.A., Sandi, D., 2002. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour. *Food Chem.* 78, 111-117.

Samaniego-Russo, J.A., Cabrera, F., Madrid, M., Medina, V., 2004. Tecnología de Producción de Naranja y Toronja. En: *Memoria Jornada de Tecnología de Producción de Cítricos*. Fundación Produce Sinaloa, México, pp. 7-54.

Señoráns, F., Ruiz-Rodríguez, A.R., Cavero, S., Cifuentes, A., Ibáñez, E., Reglero, G., 2001. Isolation of antioxidant compounds from orange juice by using countercurrent supercritical fluid extraction (CC-SFE). *J. Agric. Food Chem.* 49, 6039-6044.

SIAP, 2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. SAGARPA. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/>. Consultado en Marzo de 2009.

Sovova, H., 2005. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *J. of Supercrit. Fluids* 33, 35-52.

Tanaka T., Sumida, T., Ogawa, H., 1998. Chemopreventive effects of hesperidin and diosmin, citrus flavonoids, alone and in combination. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan* 177, 43-48.

Ting, S.V., Attaway, J.A., 1980. Citrus Fruits. En: A.C. Hulme (ed.). *The Biochemistry of Fruits and Their Products*. Academic Press, Inc. London, pp. 107-169.

USDA, 2007. National Nutrient Database for Standard Reference. Release 20.

Valencia, O.C., 1995. Fundamentos de Fitoquímica. Ed. Trillas, México. pp: 127-146.

Wang, L., Yang, B., Du, X., Yi, C., 2008. Optimisation of supercritical fluid extraction

of flavonoids from *Pueraria lobata*. *Food Chem.* 108, 737-741.

Wang, L., Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.* 17, 300-312.

Wang, Z., Li, S., Ferguson, S., Goodnow, R., Ho, C.T., 2008. Validated reverse phase LC method for quantitative analysis of polymethoxyflavones in citrus peel extracts. *J. Separ. Sci.* 31, 30-37.

Wells, M.J.M., 2003. Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids. En: S. Mitra (ed.). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. John Willey & Sons: Hoboken, New Jersey, pp. 37-138.

Widmer, W.W., Montanari, A.M., 1994. Citrus waste streams as a source for phytochemicals. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 107, 284-288.

Wilcox, L.J., Borradaile, N.M, de Dreu, L.E., Huff, M.W., 2001. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *J. Lipid Res.* 42, 725-734.

Williams, J.R., Clifford, A.A., Al-Saidi, S.H.R., 2002. Supercritical fluids and their applications in biotechnology and related areas. *Mol. Biotechnol.* 22, 263-286.

Yang, Ch., Xu, Y.R., Yao, W.X., 2002. Extraction of pharmaceutical components from *Ginkgo biloba* leaves using supercritical carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* 50, 846-849.

Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomás-Barberán, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S., 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 59, 113-122.

Yu, J., Dandekar, D.V., Toledo, R.T., Singh, R.K., Patil, B.S., 2007. Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds. Food Chem. 105, 1026-1031.

Ziaková, A., Brandšteterová, E., 2002. Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis. J. Liq. Chrom. Relat. Tech. 25, 3017-3032.