

**REVISIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE ALGUNOS  
FLAVONOIDES AISLADOS DE FRUTOS DE MANDARINA (*CITRUS  
RETICULATA*)**

Ana Patricia Bautista Medina  
Yonatan Alexander Cristancho Rodríguez

Universidad Nacional Abierta y a Distancia  
CEAD José Acevedo y Gómez  
Química  
Bogotá, Colombia  
2021



**REVISIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE ALGUNOS  
FLAVONOIDES AISLADOS DE FRUTOS DE MANDARINA (*CITRUS  
RETICULATA*)**

Ana Patricia Bautista Medina  
Yonatan Alexander Cristancho Rodríguez

Monografía presentada como requisito parcial para obtener el título de  
Químico

Asesor:  
MSC. Rafael Andrés Ramírez Alvarado

Línea de investigación:  
Química de productos naturales

Universidad Nacional Abierta y a Distancia  
CEAD José Acevedo y Gómez

Química  
Bogotá, Colombia

2021



## **Dedicatoria**

*Dedico este trabajo a Dios, por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.*

*A mis padres, por su comprensión y ayuda, que me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Dando todo lo que soy como persona, valores, principios, perseverancia y empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio.*

*A mis hermanos, porque sin el equipo que formamos, no hubiera logrado esta meta.*

*Ana Patricia*



## **Dedicatoria**

*A mi hijo, que fue el motor, que sin pensarlo y sin planearlo se convirtió en el engranaje para hoy culminar y cumplir una meta que veía lejos y hasta difícil de cumplir.*

*A mis padres, mis hermanos que me brindan su ayuda incondicional, a mi mona quien me apoyo y me acompañó en muchos momentos en los que veía difícil continuar con mis estudios, y sobre todo a DIOS por darme la capacidad, fortaleza y perseverancia para hoy culminar un logro de los tantos planeados en mi vida.*

*Yonatan Alexander*



## **Agradecimientos**

Agradecemos a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD por la formación profesional que nos brindó.

A nuestro director de tesis MSC. Rafael Andrés Ramírez quien desde un principio confió en nuestro proyecto y que nos aportó durante el desarrollo de este, todo su conocimiento, experiencia, motivación, y paciencia para así hoy lograr culminar nuestra tesis.

Al profesor MSC. Yamid Ortiz Rojas por su asesoría y colaboración.

Gracias a cada uno de ustedes por su dedicación y a todas las personas que nos apoyaron de una forma u otra.

Muchas gracias.

## Objetivos

### Objetivo general

- Elaborar un estado del arte relacionado con los principales flavonoides aislados de frutos de mandarina (*Citrus reticulata*) mediante la revisión metodológica de contenidos académicos actuales con el fin de ponderar la actividad hipoglucemiante y sus posibles aplicaciones en la industria farmacológica.

### Objetivos específicos

- Identificar fuentes literarias en el periodo 2010 – 2020 en diferentes bases de datos, que permitan una comprensión adecuada de los efectos hipoglucemiantes de los flavonoides de la mandarina (*Citrus reticulata*) y las variedades y/o especies más empleadas para investigación y obtención de los flavonoides más representativos.
- Describir las rutas biosintéticas y estructuras de los flavonoides identificados, con el fin de recopilar teóricamente los mecanismos asociados al metabolismo secundario de las plantas de mandarina (*Citrus reticulata*).
- Recopilar algunos usos farmacológicos y funcionales para los flavonoides identificados provenientes del exocarpio de la mandarina (*Citrus reticulata*) con el fin de estimar las potencialidades en la industria farmacológica.

---

## Resumen

Se ha identificado que en Colombia se emplea la infusión del exocarpio o cascara de mandarina (*Citrus reticulata* Var Arrayana) para el control de la diabetes como un tratamiento de medicina alternativa para el manejo de esta condición.

Generalmente se ha atribuido el efecto benéfico del consumo de esta infusión a la presencia de flavonoides en este tejido de los frutos, sin embargo, no se han realizado estudios sistemáticos para identificar la presencia de flavonoides y su relación con el control de la diabetes en el país.

Esta monografía surge como respuesta a la necesidad de establecer un marco de referencia para el desarrollo de posteriores investigaciones con base a las experiencias reportadas por autores alrededor del mundo que han realizado investigaciones sobre *Citrus reticulata* y otras especies del género *Citrus*.

La metodología seguida para el desarrollo del presente trabajo consistió en la identificación de palabras clave de búsqueda, su consulta en diferentes bases de datos de revistas indexadas, el filtrado y clasificación de los artículos y materiales bibliográficos encontrados y la organización de la información sobre tres ejes básicos; las características del género *Citrus* y de la especie *Citrus reticulata*, los avances en la identificación de las rutas de biosíntesis de flavonoides haciendo énfasis en los estudios sobre la síntesis de flavonoides en cítricos y estudios sobre la relación entre flavonoides identificados en el exocarpio de frutos cítricos y el manejo de la diabetes.

Se encontró una gran cantidad de información sobre las características físicas, químicas y biológicas de las muchas variedades de *Citrus reticulata* que se han identificado en el mundo, de las cuales se escogieron las variedades con mayor mercado para analizar sus características. Con respecto a la biosíntesis de flavonoides se identificó que ha habido avances importantes en la identificación de las rutas metabólicas relacionadas con los flavonoides, tanto en la identificación de enzimas y pasos clave como en la relación de ciertos genes en la síntesis de distintos flavonoides.

Igualmente, se lograron identificar artículos de investigación que reportan resultados sobre el efecto de flavonoides aislados de frutas cítricas en una amplia variedad de condiciones que afectan la salud humana, desde problemas de circulación, normalización y manejo de niveles de azúcar y lípidos, capacidad anticancerígena hasta

síndromes metabólicos, lo que aumenta el espectro de posibles aplicaciones de estas moléculas en farmacología.

**Palabras claves:** diabetes mellitus, glucosa, hiperglicemia, nobiletina, hesperidina, naringina, flavonoides cítricos

## Abstract

It has been identified that in Colombia the infusion of the exocarp or mandarin peel (*Citrus reticulata* Var Arrayana) is used for the control of diabetes as an alternative medicine treatment for the management of this condition.

Generally, the beneficial effect of the consumption of this infusion has been attributed to the presence of flavonoids in this fruit tissue, however, no systematic studies have been conducted to identify the presence of flavonoids and their relationship with diabetes control in the country.

This monograph response to the need to establish a framework of reference for the development investigations based on the experiences reported by authors around the world who have studied the *Citrus reticulata* and other species of the genus *Citrus*.

The methodology followed in this work consist of the identification of key words, their search in different indexed journals databases, filtering and classification the articles and bibliographic materials found and organization of the information on three basic axes; the characteristics of the genus *Citrus* and the species *Citrus reticulata*, the advances in the identification of flavonoid biosynthesis routes with emphasis on studies on the synthesis of flavonoids in citrus fruits and studies on the relationship between flavonoids identified in the exocarp of citrus fruits and the management of diabetes.

A large amount of information was found on the physical, chemical, and biological characteristics of the many varieties of *Citrus reticulata* that have been identified in the world, from which the varieties with the largest market were chosen to analyze their characteristics. With respect to flavonoid biosynthesis, it was identified that there have been important advances in the identification of the metabolic pathways related to flavonoids, both in the identification of enzymes and key steps and in the relationship of certain genes in the synthesis of different flavonoids.

In addition, research articles were identified that report results on the effect of flavonoids isolated from citrus fruits on a wide variety of conditions that affect human health, from circulation problems, normalization and management of sugar and lipid levels, anticarcinogenic capacity to metabolic syndromes, which broadens the spectrum of possible applications of these molecules in pharmacology.

**Keywords:** diabetes mellitus, glucose, hyperglycemia, nobiletin, hesperidin, hesperidin, naringin, citrus flavonoids



---

## Contenido

|  | <b>Pag.</b> |
|--|-------------|
| <b>Objetivos .....</b>   | <b>1</b>    |
| <b>Resumen .....</b>   | <b>2</b>    |
| <b>Abstract.....</b>   | <b>4</b>    |
| <b>Contenido .....</b>   | <b>7</b>    |
| <b>Lista De Figuras .....</b>  | <b>9</b>    |
| <b>Introducción .....</b>  | <b>11</b>   |
| <b>Metodología.....</b>  | <b>13</b>   |
| <b>Introducción Al Género Citrus .....</b>                           | <b>15</b>   |
| <b>Citrus Reticulata.....</b>  | <b>16</b>   |
| <b>Principales Variedades Comerciales De Citrus Reticulata .....</b> | <b>18</b>   |
| Ponkan .....   | 18          |
| Dancy .....  | 18          |
| Mediterráneo .....   | 19          |
| King .....   | 20          |
| Satsuma .....  | 20          |
| <b>Citrus Reticulata Blanco (Arrayana) .....</b>                     | <b>21</b>   |
| <b>Los Flavonoides.....</b>  | <b>23</b>   |
| <b>Rutas Sintéticas De Los Flavonoides.....</b>                      | <b>26</b>   |
| Visión General De La Biosíntesis De Los Flavonoides.....             | 26          |
| Precusores De Los Flavonoides.....                                   | 27          |

---

|   |           |
|---|-----------|
| Formación De Flavonas Y Flavonoles.....                                   | 29        |
| Biosíntesis De 5-Deoxiflavonoides .....                                   | 30        |
| Isoflavonoides Y Sus Derivados .....                                      | 31        |
| <b>Flavonoides En Citrus Reticulata.....</b>                              | <b>31</b> |
| Biosíntesis De Flavonoides En Cítricos.....                               | 34        |
| <b>Flavonoides En Citrus Reticulata Y Actividad Hipoglucemiante .....</b> | <b>36</b> |
| Hesperidina .....   | 37        |
| Naringina.....  | 40        |
| Flavonas Polimetoxiladas.....   | 43        |
| <b>Conclusiones Y Recomendaciones.....</b>                                | <b>49</b> |
| <b>Conclusiones.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>Recomendaciones .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>Bibliografía .....</b>   | <b>52</b> |

### Lista De Figuras

|   |    |
|---|----|
| Fig. 1 Estructura general de los flavonoides y el sistema de numeración empleado para su nomenclatura ..... | 23 |
| Fig. 2 Subclases de flavonoides, .....  | 25 |
| Fig. 3 Rutas generales de biosíntesis de fenilpropanoides y flavonoides.....                                | 28 |
| Fig. 4 Estructura de la hesperidina glicosilada.....  | 33 |
| Fig. 5 Ruta sintética resumida de los flavonoides en los cítricos .....                                     | 35 |
| Fig. 6. Estructura de la naringina.....   | 51 |
| Fig 7. Estructura de la Nobiletina.....   | 54 |



## Introducción

Problemas de salud como la obesidad y la diabetes pueden estar asociados con la ingesta inadecuada de alimentos y factores genéticos hereditarios entre otros factores diversos (Shah et al., 2011). La diabetes mellitus, comúnmente conocida como diabetes, es un grupo de trastornos metabólicos que se caracterizan por un nivel elevado de azúcar en la sangre durante un periodo de tiempo prolongado (Murillo Sevillano, 2018).

Si no es tratada a tiempo, la diabetes puede causar muchas complicaciones de salud. Las complicaciones agudas pueden incluir la cetoacidosis diabética, el estado hiperglucémico hiperosmolar o la muerte (Bursać Kovačević et al., 2020). Las complicaciones graves a largo plazo incluyen enfermedades cardiovasculares, derrames cerebrales, enfermedad renal crónica, úlceras en los pies, daños en los nervios, daños en los ojos y deterioro cognitivo (Raut et al., 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la diabetes provocó 1,5 millones de muertes en 2012, lo que la convierte en la octava causa de muerte (WHO, 2016). Sin embargo, otros 2,2 millones de muertes en todo el mundo pueden ser atribuibles a la hiperglucemia y a los mayores riesgos de enfermedad cardiovascular y otras complicaciones asociadas (por ejemplo, insuficiencia renal), que a menudo conducen a una muerte prematura y figuran como causa subyacente en los certificados de defunción en lugar de la diabetes (Wild et al., 2004). Por esta razón, la búsqueda de fuentes promisorias de compuestos con capacidad hipoglucemiante que contribuyan en el manejo o tratamiento de estas enfermedades comunes es fundamental para el desarrollo de nuevos y más eficaces tratamientos para esta condición.

En Colombia se ha reportado el uso de infusiones de cascara de mandarina (*Citrus reticulata* Var Arrayana) como tratamiento alternativo para el manejo de la diabetes (Arguero Aulestia, 2018). Se ha relacionado el efecto positivo de la ingesta de dichas infusiones con la presencia de algunos flavonoides con propiedades hipoglucemiantes entre otras como las flavonas polimetoxiladas (Nobiletina, por ejemplo), hesperidina y naringina.

La presente monografía es el fruto de una revisión sistemática y elaboración del estado del arte de la investigación sobre flavonoides presentes en las cascara de algunas

especies del género *Citrus*, en especial de variedades de *Citrus reticulata*, en el cual se buscaron, identificaron y clasificaron artículos de investigación, reportes de investigación y otros documentos científicos disponibles en diversas bases de datos con el fin de desarrollar un marco de investigación que sirva como base para la formulación de futuros proyectos de investigación en este campo en el escenario del país.

La monografía se divide en tres grandes secciones; la primera corresponde a la recopilación de información sobre la especie *Citrus reticulata*, sus características particulares y su explotación a nivel mundial, así como la ubicación de la variedad *Citrus reticulata* Var Arrayana con respecto a las especies de mandarina explotadas a nivel mundial.

La segunda sección condensó los avances sobre el estudio de las diversas rutas de biosíntesis de flavonoides haciendo énfasis en la información disponible sobre este tema en el caso de cítricos. Por último, la tercera sección reúne la información publicada en diferentes revistas científicas sobre el estudio de flavonoides provenientes del exocarpo de la mandarina en el tratamiento de diferentes enfermedades entre las que se destaca el manejo de los niveles de azúcar en modelos biológicos.

## Metodología

Para el desarrollo de la presente monografía se aplicó una metodología de búsqueda sistemática definida por los siguientes pasos:

- Definición de palabras clave para la búsqueda de información. A partir de palabras base como actividad hipoglucemiante se buscaron palabras relacionadas que ampliaran el espectro de búsqueda. Estas palabras fueron combinadas con los términos *Citrus reticulata*, flavonoides, biosíntesis y ruta metabólica.
- Empleando los términos generados en el anterior paso, se realizaron consultas en la E-Biblioteca de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), en las diversas bases de datos de revistas indexadas y motores de búsqueda de texto académicos como Science Direct, Web of Science, entre otras (Google Scholar), tomando como periodo de tiempo de consulta los documentos publicados a partir del año 2010 en adelante. Se realizaron las búsquedas empleando los términos en español y en inglés.
- Los resultados obtenidos se organizaron empleando la herramienta de manejo bibliográfico Mendeley, se depuraron los resultados eliminando las entradas duplicadas y artículos poco relacionados con las temáticas de investigación.
- Se realizó la lectura de cada uno de los artículos científicos identificados. Algunos artículos se obtuvieron directamente de las bases de datos gracias a herramientas *Open Access* y *Crossref*. Otros fueron consultados gracias a la generosidad de los autores al colocarlos a disposición de la comunidad en general en sus perfiles en redes sociales como Academia.edu y para consultar otros se solicitó el apoyo de del docente asesor, así como de otros profesores.
- Los artículos se clasificaron de acuerdo con los tres ejes principales de la monografía (Características del género *Citrus* y *Citrus reticulata*, biosíntesis de flavonoides y aplicación de flavonoides) para facilitar la composición del escrito.
- Durante la redacción de la monografía, se realizaron consultas de diferentes fuentes bibliográficas (artículos, libros, reportes estadísticos) para fortalecer las

ideas que se deseaban transmitir, así como contrastar y complementar la información vertida por los autores de los artículos consultados.

- Por último se realizó una revisión y ajuste de estilo del escrito generado.

Empleando esta metodología se pudo crear un marco lógico para el desarrollo de la monografía de manera estructurada asegurando un escrito con las mejores cualidades posibles y una fuente de información fiable para futura referencia.

## Introducción Al Género Citrus

La palabra "cítrico" se deriva del latín "*Kedros*", la palabra griega que se utilizaba para denominar árboles, como cedro, pino y ciprés. Según el sistema Engler, los cítricos y géneros relacionados son principalmente especies de hoja perenne, pertenecientes al orden *Geraniales* y *Brassicaceae*. Las *Rutaceae* y otras 11 familias forman el suborden *Gerrniiineae*. La familia *Rutaceae* se divide en seis subfamilias, incluida la subfamilia *Diamond*, de la cual forman parte el verdadero género de cítricos y los géneros relacionados.

En general, hay cuatro características fenotípicas de especies dentro de la familia *Rutaceae* (Oueslati et al., 2017). Primero, la fruta y la hoja contenían glándulas sebáceas; segundo, el ovario se convirtió en néctar; tercero, las hojas generalmente tenían manchas pálidas; y cuarto, placentación axilar en la fruta. Además, muchas especies tenían semillas poliembrionarias que contenían embriones cigóticos y de núcleo.

Desafortunadamente, el estado taxonómico de la familia *Rutaceae* siguió siendo controvertido, complejo y a veces confuso, particularmente para los phyla, subgrupos y géneros dentro de *Aurantioideae*. Las frutas cítricas y los géneros relacionados se hibridan fácilmente, y este proceso ha llevado miles de años en la naturaleza (Curk et al., 2014). La falta de una separación reproductiva rigurosa entre las diversas especies y la mayor fuerza del nucelar en comparación con los embriones cigóticos en muchas especies combinadas aumentaron el desafío de clasificar adecuadamente las especies de *Aurantioideae*.

Comúnmente, las especies de *Aurantioideae* se pueden definir como árboles pequeños, arbustos o lianas que producen frutos con piel correosa o de piel dura y, a menudo, con una pulpa jugosa. Las hojas y frutos se caracterizan por glándulas sebáceas esquizolisigénicas que liberan un aroma cuando se tocan; Las flores eran típicamente blancas o lavanda con aroma. Los frutos son redondos con estructuras especiales y vesículas de savia, lo que da como resultado plantas dentro de las *Aurantioideae* con propiedades únicas. La mayoría de las especies de *Aurantioideae* son de hoja perenne, con la excepción de tres géneros monotípicos (*Poncirus*, *Aegle* y *Feronia*), tres especies de *Clausena* y una especie de *Murraya* (Schwartz et al., 2016).

Los cítricos son pequeños árboles o grandes arbustos con brotes espinosos y hojas perennes dispuestas alternativamente. Las ramas cambian de angulares a cilíndricas a

medida que crecen de jóvenes a maduros. La mayoría de las especies tienen numerosas espinas en las axilas de las hojas, pero las espinas pueden ser menos prominentes a medida que los árboles maduran. Las hojas suelen ser unifoliadas con láminas y el tamaño del pecíolo varía de grande (pomelos y sus parientes, algunos cítricos) a moderado (naranjas y limones) a pequeño (principalmente mandarinas y algunos cítricos) (Ancillo & Medina, 2014).

Las flores de los cítricos son pentámeras y normalmente hermafroditas. Las flores nacen solitarias o en pequeños corimbos. Cada flor tiene cinco pétalos blancos y numerosos estambres. Los frutos cítricos son bayas modificadas conocidas como hesperidios. Las formas de los frutos son variadas, desde esferoides (naranja) hasta oblongas (pomelo y mandarina) y prolatas (limones y limas). Los cítricos pueden tener semillas o no. La forma de las semillas varía de obovoide a redondeada, y las semillas contienen uno o varios embriones. La diferencia más destacada en la formación de una semilla es la característica de poliembrionía, ya que las semillas contienen varios pares de cotiledones, incluyendo un embrión cigótico y varios embriones nucelares también.

### ***Citrus Reticulata***

La mandarina (*Citrus reticulata*) es una de las tres especies parentales originales de todas las variedades modernas de cítricos. El grupo actual de mandarinas es muy complejo porque se cruzan con especies de cítricos compatibles (especialmente pomelo), así como cruces entre otras mandarinas. Como resultado, no hay una mandarina "pura" entre las variedades de *Citrus reticulata* comerciales contemporáneas (Wu et al., 2014).

Los intentos anteriores de clasificar varios tipos de mandarín en grupos o especies se basaron en gran medida en la clasificación de Swingle propuesta en 1943 y la de Tanaka de 1954. Con la reclasificación reciente en mandarina tipo 1, tipo 2 y tipo 3 en función de su relación de mezcla relativa con pomelo (Wu et al., 2018), se espera obtener una uniformidad en la clasificación de las muchas variedades de mandarinas que se encuentran en todo el mundo.

La clasificación actual de las mandarinas se resume en las siguientes categorías (Dorji & Yapwattanaphun, 2011); Mandarinas de tipo 1: mandarinas puras sin mezcla interespecífica, por ejemplo, las mandarinas Indica, Tachibana y Sun Chu Sha Kat (típicamente de fruto pequeño y agrio/ácido, tipos prácticamente primitivos). Mandarinas

de tipo 2a: mandarinas de mezcla temprana que contienen una pequeña cantidad de alelos de pomelo que se remontan a un ancestro común de esta especie, representado por las mandarinas agrias o ácidas, por ejemplo, las mandarinas Cleopatra y Sunki (Quiroga-Cardona et al., 2010).

Mandarinas de tipo 2b: mandarinas de mezcla temprana que contienen alelos adicionales de pomelo, representadas por las mandarinas no ácidas o dulces, por ejemplo, las mandarinas Ponkan, Dancy y Mediterranean. Mandarinas de tipo 3: mandarinas de mezcla tardía que contienen introgresiones adicionales de pomelo en las mandarinas de tipo 2, y los cruces posteriores entre naranjas dulces y mandarinas o entre mandarinas de mezcla tardía produjeron las variedades modernas de mandarina, por ejemplo, King, Satsuma, Clementine y Nadorcott. Además, las hibridaciones de mayor nivel han dado lugar posteriormente a tangores naturales y artificiales (híbridos de mandarina x naranja) y tangelos (híbridos de mandarina x pomelo) (Velasco & Licciardello, 2014).

Para el análisis filogenético se utiliza una secuencia de genes nucleares que puede ser más informativo para poder investigar las relaciones entre los diferentes genotipos de cítricos. Encontrando así varios tipos de moléculas marcadoras. Uno de estos es el marcador de repetición de secuencia simple (SSR) y que son a su vez codominantes, altamente poliformicos, específicos del locus, muy abundantes y distribuidos en el todo el genoma. (Yuan et al., 2018).

En los últimos 20 años ha evolucionado el diseño de los marcadores moleculares empleados en cítricos para estudios de diversidad y filogenia es así que de ellos podemos citar los siguientes ejemplos: AFLP (Amplification Fragment length Polymorphism) polimorfismo de Longitud de fragmento de amplificación, que se cimientan en la detección de fragmentos de restricción de ADN mediante la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa PCR, gracias uso de cebadores homologos en la secuencia de los adaptadores y de las dianas de restricción de las enzimas utilizadas para digerir el ADN. RAPD (Random Amplified Polymorphic) polimórfico amplificado aleatorio, este tipo de marcadores se basan en la amplificación del ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR, usando un solo cebador (10 nucleotidos) con secuencia aleatoria. Logrando obtenerse en grandes cantidades y en un corto tiempo ya que no necesitan información de secuencia previa. Es así que son los primeros marcadores de ADN usados en cítricos. (García Lor, Andrés; Navarro Lucxas, Luis; Ollitraul, Patrick, 2013)

## ***Principales Variedades Comerciales De Citrus Reticulata***

### ***Ponkan***

Sinónimos: Batanga (Filipinas), Chinese Honey orange (China), Nagpur suntara o santra (India) y Swatow orange (Hong Kong).

La variedad Ponkan está bien adaptada a los climas tropicales y se produce en Asia (centro de la India, sur de China, Japón, Taiwán, Filipinas, Indonesia y Malasia y otros estados más cálidos del sur) y São Paulo (Brasil), por lo que se convierte a la variedad Ponkan en la variedad más productiva de las *Citrus reticulata* del mundo. El árbol tiene un hábito de crecimiento compacto y erguido; el fruto es grande en comparación a otras variedades (70-80 mm, 120-140 g), ligeramente aplanado, con un cuello corto, y la punta de la cáscara está hundida, generalmente con un ombligo pequeño. La piel es suave, pero ligeramente voluminosa, no muy pegajosa y fácil de pelar, de color amarillo anaranjado, con un aroma único, pero diferente a la mandarina mediterránea (Colodel et al., 2018).

La pulpa es crujiente, anaranjada, ligeramente dulce y fragante, pero las paredes son duras y contienen varias semillas poliembriónicas. La fruta madura temprano (noviembre), la capacidad de retención en el árbol es pequeña y la fruta tiende a hincharse cuando madura. Los árboles son propensos a un crecimiento bianual irregular y son sensibles a la mancha marrón de *Alternaria*.

### ***Dancy***

Sinónimos: Obeni-mikan (Japón), Ladu, Keonla (India) y Hongju (China).

La variedad Dancy es una de las variedades de mandarina más antiguas introducidas en Florida, se originó en el árbol de semillas Morane "Orange Peel" en 1867 y se dice que fue importada de Tánger, Marruecos. El nombre de la variedad Dancy se utilizó por primera vez en 1877. Dancy se convirtió en la principal variedad mandarín en Florida en la década de 1890, pero declinó en la década de 1980 debido a la aparición de variedades superiores. Aunque se ha introducido en otras partes del mundo de los cítricos, Dancy aún no puede competir con éxito con otras variedades más adaptables. Estudios moleculares recientes indican que la variedad Ponkan es uno de los padres de la Dancy (Darjazi, 2011).

Dancy y algunos de sus descendientes son muy sensibles a las manchas marrones de *Alternaria*. En todo el mundo, Dancy ha sido un antepasado importante de muchas variedades recientemente desarrolladas de mandarinas. Por ejemplo, Dancy es parte de la calidad de los híbridos de naranjas y su progenie desarrollado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). También es parte del programa de mejoramiento del Centro Volcani en Israel. Se cree que las variedades actuales de Michal son híbridos naturales de Clementine y de un desconocido progenitor masculino del polen, aunque ha sido ampliamente aceptado que desciende de la variedad Dancy. También se ha utilizado para producir muchos híbridos de Dancy de segunda generación, como Temple x Michal (Rishon, Tami), Wilking x Michal (Shani, Mama, Merav, Edit), Satsuma x Michal (Vered) y los híbridos Dancy de tercera generación de gama alta, como Orah x Shani (Odem) y Edit x Nova (Dina).

### ***Mediterráneo***

La mandarina en la cuenca mediterránea tiene muchos nombres diferentes, la mayoría de los cuales son nombres locales, en referencia a su origen o sinónimo de la palabra "común". Se cree que la mandarina variedad mediterráneo o de hoja de sauce fue la primera mandarina introducida desde China a la cuenca mediterránea a principios del siglo XIX. Es posible que haya pasado por el Reino Unido, Malta y luego por Italia y finalmente se haya distribuido por toda la región mediterránea y luego por todo el mundo.

La mandarina mediterránea está adaptada a los climas cálidos y secos, pero presenta importantes desventajas, como la alternancia en el porte y las escasas cualidades de conservación y transporte. Sus características más distintivas son (i) el tamaño pequeño y las hojas estrechas, (ii) el aroma de las hojas, (iii) el sabor suave y agradablemente aromático del zumo, (iv) la fragancia distintiva del aceite de la corteza, (v) el hábito de crecimiento de los brotes que se extiende y cae, y (vi) el grado muy alto de poliembriónía de las semillas.

El fruto es de tamaño mediano, moderadamente plano, con piel fina y suelta, y de color naranja-anaranjado cuando está maduro. La fruta generalmente tiene un cuello fuertemente arrugado y, a veces, un pequeño ombligo oculto, pero sin areola. La fruta se puede pelar fácilmente. Hay muchas semillas (> 20 semillas por fruto) y muchos embriones. El color de la pulpa es naranja claro y el jugo tiene un rico sabor y aroma. La mayoría de

las cosechas de mandarina mediterránea madurarán temprano o temprano en la temporada, aunque algunas cosechas madurarán más tarde. Con el exceso de maduración de la fruta, la separación de la cáscara aumenta bruscamente y se produce un "hinchamiento", acompañado de una pérdida significativa de acidez y jugo (Duarte et al., 2016).

Si no se recolecta a tiempo esta fruta perderá su calidad; la capacidad de retención en el árbol es muy baja y su capacidad de almacenamiento también es muy baja. Además de consumirse como fruta fresca, existen dos subproductos importantes, el aceite de corteza y el aceite de grano pequeño, que es destilado de la poda de las hojas, que son comercializados para la industria cosmética y de aromas.

### **King**

La mandarina King es probablemente un tangor natural, es decir, una mandarina de tipo 2 introgresada con naranja dulce. Fue descubierta en Saigón, Vietnam, en 1880, y es una selección de maduración tardía (de marzo a mayo) que produce frutos grandes con una forma ligeramente aplanada a redonda y una textura de la corteza áspera y llena de baches, y una corteza fácil de pelar (Altaf et al., 2008). Fuera del sudeste asiático, la producción comercial es escasa o nula. La Kunenbo de Japón es similar a la King, aunque el tamaño de la fruta es menor y tiene una corteza más suave. La variedad King fue padre de muchos cultivares y progenitores de cultivares como Kara, Kincy, Kinnow, Wilking y Encore.

### **Satsuma**

El origen de las mandarinas Satsuma o Wenzhou se remonta a Japón a principios del siglo XV. Aunque todavía hay disputas sobre el origen exacto, es posible que haya llegado a Japón desde Wenzhou, China. El análisis de secuencia no puede responder a la pregunta de su origen con certeza, pero respaldando esta relación está Huanglingmiao (un mutante somático de Kishu) × Kunenbo (una variedad de cítricos que se encuentra en Japón) (Zhang et al., 2014).

Muchas mutaciones generaron muchas de las opciones de satsuma descritas hoy, y esta situación es similar a la reproducción de naranjas dulces, pomelos y cítricos. Su tiempo de maduración varía desde muy temprano (agosto a septiembre) hasta muy tarde

(enero). La mayoría de estas selecciones de Satsuma se han comercializado y vendido en Japón y otros países / regiones donde se producen Satsuma, como Estados Unidos, España, Argentina, Uruguay y, por supuesto, China. Entre ellas se encuentran las selecciones ultra tempranas [Iwasaki, Hashimoto, Miyamoto, Temprana, Wakayama (también conocida como Xie Shan)], las selecciones tempranas (Miyagawa Wase, Okitsu Wase, Miho Wase, Guoching No. 1, y varias otras selecciones locales de Luisiana, EE.UU), de madurez media (Owari, la variedad más cultivada, Clausellina de España, Silverhill de Estados Unidos, y Dobashi Beni), y las selecciones tardías (Aoshima, Ohtsu No.4, Picaña y Bela/Lola de España) (Kikuchi et al., 2017).

El árbol Satsuma es una de las especies más resistentes de todos los cítricos (especialmente cuando se cultiva en el patrón empleado en naranjas). En las regiones climáticas frías de otoño / invierno, producen frutos de la más alta calidad. Los frutos de Satsuma casi siempre no tienen semillas y son fáciles de pelar, con atractivas capas externas y capas internas muy oscuras. Su sabor es simple y cremoso, pero es agradable cuando se cultiva en el ambiente adecuado. Los árboles de selección de maduración temprana son menos vigorosos que los árboles de selección de maduración tardía, pero todos tienden a crecer temprano y producir rendimientos más altos. Las variedades de Satsuma, que crecen en áreas subtropicales con temperaturas otoñales más altas, como el sureste de los Estados Unidos, tienden a producir frutos más grandes con color de piel deficiente, hinchazón y, en general, bajo contenido de azúcar y ácidos (Usman & Fatima, 2018).

### ***Citrus Reticulata Blanco (Arrayana)***

La variedad Arrayana es la principal variedad de mandarina (*Citrus reticulata Blanco*) cultivada en Colombia, especialmente en la región de los Llanos Orientales, donde aproximadamente 1.000 hectáreas son dedicadas a su cultivo y se encuentran casi en su totalidad en las estribaciones del piedemonte llanero (Orduz-Rodríguez et al., 2011). El fruto de la Arrayana es grande, pesa entre 160 y 190 g, tiene semillas y es fácil de pelar. Es un cultivar tardío con periodos de cosecha alternativos debido a las lluvias inesperadas durante la estación seca.

Se han realizado varias investigaciones sobre *Citrus reticulata blanco* en Colombia durante el presente siglo, donde se ha estudiado su uso como injerto sobre diversos patrones, rendimiento de cultivo durante años, la influencia del estrés hídrico en la floración

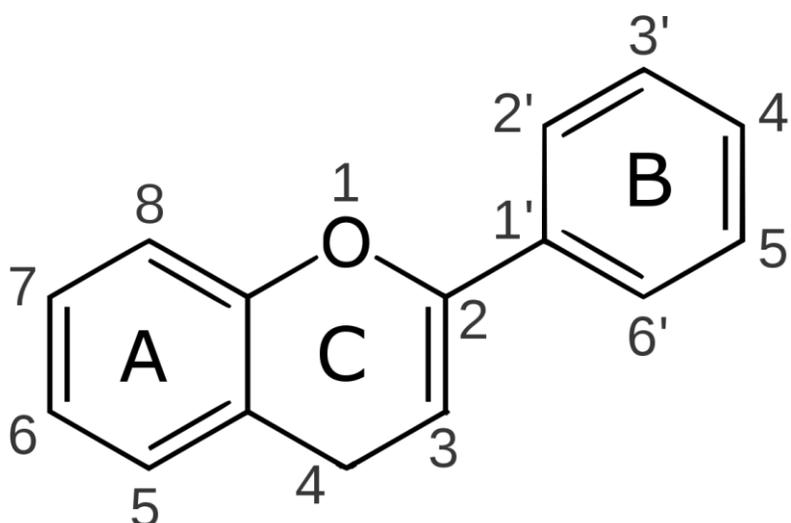
y el efecto de tratamientos poscosecha en la vida útil de la fruta (Helber Enrique & Edgar Alfonso, 2018).

En esta región de cultivo, la variedad arrayana florece solo una vez al comienzo de la temporada de lluvias y se cosecha a finales de año (noviembre a enero), lo que provoca una fuerte caída de los precios al productor y escasez durante el resto del año, limitando el abastecimiento de este fruto a las poblaciones cercanas durante el resto del año (Ordúz-Rodríguez et al., 2010).

## Los Flavonoides

Los flavonoides son una clase de compuestos bioactivos con estructuras químicas y propiedades variadas. Se encuentran en las frutas, las verduras, las hierbas, el cacao, el chocolate, el té, la soja, el vino tinto y otros alimentos y bebidas de origen vegetal.

Fig. 1 Estructura general de los flavonoides y el sistema de numeración empleado para su nomenclatura.



Representan una gran clase de no menos de 6000 compuestos fenólicos que comprenden 15 carbonos, con 2 anillos aromáticos A y B (Ver Fig.1). El anillo A se condensa con el anillo heterocíclico de seis miembros C, generando una estructura fenilbenzopirano. Este grupo puede dividirse en términos generales en flavonoides (2-fenilbenzopiranos), isoflavonoides (3-benzopiranos) y neoflavonoides (4-benzopiranos) sobre la base de la posición de unión del anillo aromático a la fracción de benzopirano (Manach et al., 2004).

En general, se dividen en seis subclases: flavonoles, las flavonas, las flavanonas, los flavan-3-oles (o catequinas), las isoflavonas y las antocianidinas (Fig. 2).

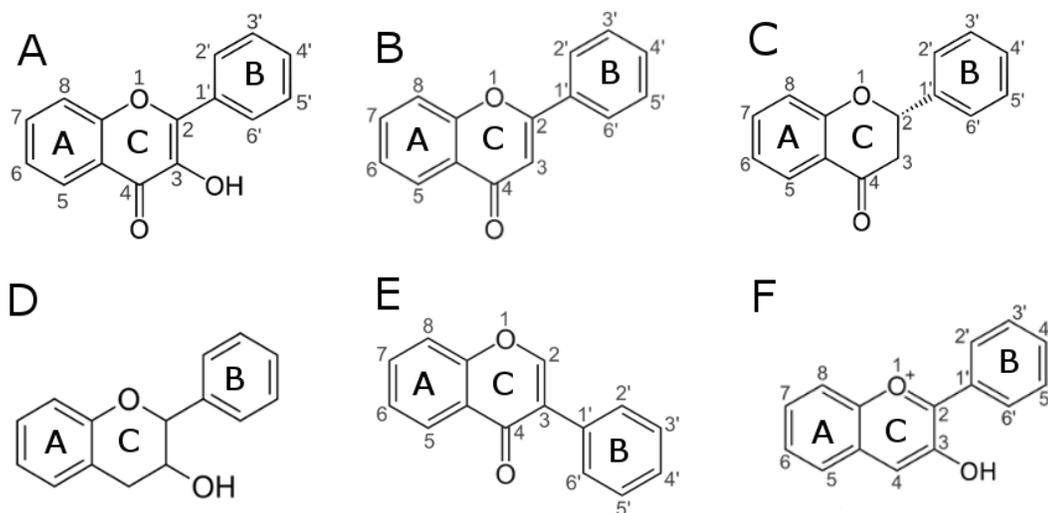
Dentro de cada subclase, los flavonoides e isoflavonas individuales se identifican y caracterizan por la hidroxilación y el patrón de conjugación de los anillos A, B y C. El núcleo básico de los flavonoides posee una gran variedad de sustituyentes con la presencia de

grupos hidroxilos en las posiciones 40-, 5- y 7-. La mayoría de los flavonoides existen como glucósidos con un grupo de azúcar como sustituyente. Los azúcares y los sustituyentes hidroxilos en el esqueleto básico de los flavonoides aumentan la solubilidad en agua, mientras que los sustituyentes metilo y las unidades isopentílicas son responsables de la lipofilia de los flavonoides (Lin & Weng, 2006).

Las flavonas carecen de oxigenación en C-3, pero por lo demás pueden tener una amplia gama de sustituyentes, como hidroxilos, metilos, grupos O y C-alquilos, y glicosilación en diferentes posiciones. Las flavonas están presentes en el apio, el perejil y algunas hierbas, siendo la apigenina y la luteolina las principales flavonas alimentarias. Se han encontrado flavonas polimetoxiladas, como la tangeretina y la nobiletina, en especies de cítricos con 7-O-glicósidos (Bordenave et al., 2014). Aunque es posible sustituir los 10 átomos de hidrógeno de las flavonas, hasta ahora sólo se han descrito 7 sustituyentes. Los compuestos con cuatro, cinco y seis grupos hidroxilos son comunes, y los que tienen cinco son abundantes

Los flavonoides más comunes son los flavonoles, que se encuentran en todas las plantas excepto en las algas y los hongos. Los principales flavonoles de la dieta, como el kaempferol, la quercetina, la fisetina, la isorhamnetina y la miricetina, están presentes en forma de O-glicósidos (Babu et al., 2013). La conjugación se produce en la posición 3 del anillo C y también pueden producirse otras sustituciones en las posiciones 5-, 7-, 30-, 40- y 50-. Existen numerosos flavonoles conjugados con diferentes motivos de azúcar; las agliconas son limitadas. Sólo el kaempferol tiene más de 200 conjugados de azúcar diferentes (Stobiecki & Kachlicki, 2006).

Fig. 2 Subclases de flavonoides, (A) flavonoles, (B) flavonas, (C) flavanonas, (D) flavanoles, (E) isoflavonas y (F) antocianidinas.



Las flavonas y los flavonoles se clasifican en función de la naturaleza del anillo de benceno (A) en la parte de benzopirona de la molécula, ya que contiene cuatro átomos de hidrógeno sustituibles en las posiciones 5, 6, 7 y 8 (Fig. 2). El número de grupos hidroxilos puede variar de cero a cuatro, por lo que existen cinco divisiones principales. En cada división, se puede derivar un número de compuestos dependiendo de la condición del núcleo fenilo lateral (C). las isoflavonas y antocianidinas se diferencian de las demás subclases de flavonoides gracias a la posición de enlace del anillo (B) con la estructura de benzopirona y a la naturaleza del enlace con el oxígeno en la posición 4 para las isoflavonas y 3 para las antocianidinas.

Los flavonoles naturales del grupo de la monohidroxibenzopirona son la fisetina y la robinetina. Los fisetinis o fisetinas se consideran activadores de las sirtuinas e inhibidores de la enzima ADN metiltransferasa (Pandey et al., 2013). Las flavonas de origen natural del grupo de la dihidroxi-benzopirona muestran la orientación más favorecida para dos sustituciones de grupos hidroxilos, es decir, 5:7 y, por lo tanto, están muy ampliamente distribuidas. Entre las flavonas, los tres primeros miembros son la crisina, la apigenina y la luteolina.

### ***Rutas Sintéticas De Los Flavonoides***

La biosíntesis de los flavonoides es probablemente la mejor caracterizada de todas las vías metabólicas secundarias (Tohge et al., 2017). Por lo tanto, es imposible resumir todos los pasos y aspectos descubiertos hasta el momento en pocas líneas. Desde finales del siglo pasado, se han realizado enormes progresos en la identificación y el análisis de genes o ADNc para las enzimas biosintéticas de los flavonoides y los factores reguladores, en el análisis de la estructura y la función de las enzimas y en la manipulación específica de la producción de flavonoides en plantas transgénicas (Ogo et al., 2013).

### ***Visión General De La Biosíntesis De Los Flavonoides***

La ruta sintética de los flavonoides forma parte de la ruta más amplia de los fenilpropanoides, que produce una serie de otros metabolitos secundarios, como los ácidos fenólicos, las ligninas, los lignanos y los estilbenos. Los precursores clave de los flavonoides son la fenilalanina, obtenida a través de las rutas del shikimato y el arogenato, y el malonil-CoA, derivado del citrato producido por el ciclo TCA (Han et al., 2018) (Ver Fig. 3). Se cree que la mayoría de las enzimas biosintéticas de flavonoides caracterizadas hasta la fecha operan en complejos enzimáticos situados en el citosol. Los productos finales de los flavonoides se transportan a varias ubicaciones subcelulares o extracelulares, y los flavonoides que intervienen en la pigmentación suelen ser transportados a la vacuola (Fürtauer et al., 2019).

Las rutas biosintéticas de los flavonoides tienen muchas ramificaciones, siendo las mejor caracterizadas las que conducen a las antocianinas y proantocianidinas (PA) coloreadas y a las flavonas, flavonoles e isoflavonoides, generalmente incoloros. En la actualidad se han identificado genes o ADNc para todos los pasos principales que conducen a la formación de antocianinas, flavonas y flavonoles, así como para muchos pasos de la rama de los isoflavonoides, lo que permite un amplio análisis de las enzimas codificadas. Además, se dispone de varias secuencias de ADN para las enzimas de modificación que producen la variedad de estructuras conocidas dentro de cada clase de compuesto (Nabavi et al., 2020).

Entre los recientes avances significativos en nuestra comprensión de la biosíntesis de los flavonoides se encuentran la caracterización de la formación de antocianidina 3-O-glucósido a partir de leucoantocianidina (Olivas-Aguirre et al., 2016), la aclaración de la

formación de monómeros de PA y el progreso hacia la elucidación de la formación de aurona y 3-deoxiflavonoides (Koopman et al., 2012), la caracterización molecular de varios genes que codifican enzimas que modifican las estructuras del núcleo de los flavonoides, el análisis de la función de las enzimas (Pollastri & Tattini, 2011), la determinación de las estructuras de las enzimas mediante cristalografía de rayos X y modelado de homología, y la identificación de varios grupos diferentes de factores de transcripción que regulan la biosíntesis de antocianinas y AF (Cao et al., 2014). También están empezando a surgir datos sobre la organización subcelular de las enzimas biosintéticas dentro del citosol (y el papel que esto puede desempeñar en la canalización metabólica), y los mecanismos de transporte de los flavonoides dentro de la célula (Qian et al., 2017).

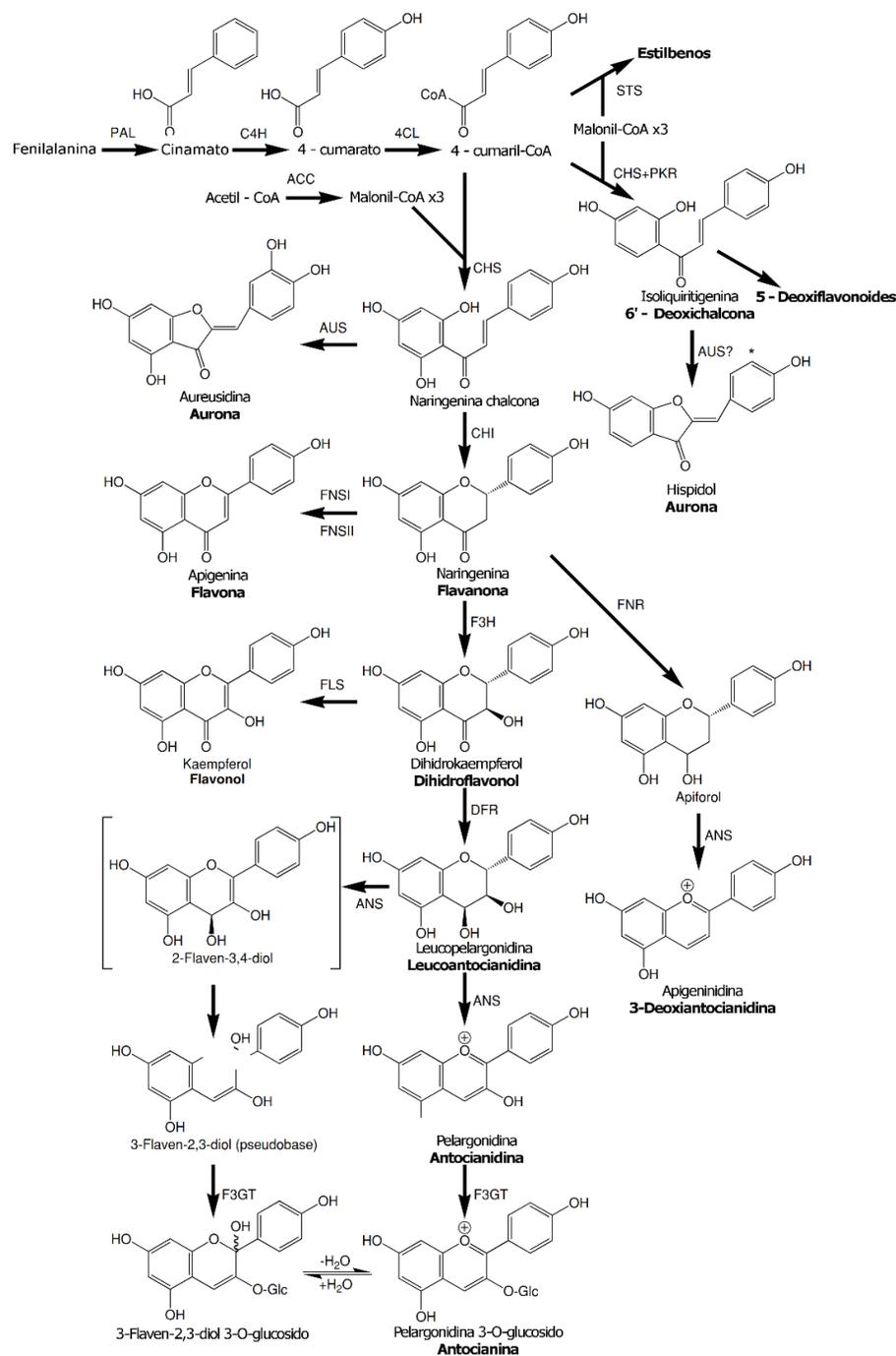
Sin embargo, todavía hay áreas importantes en las que faltan datos. Sólo se dispone de las estructuras terciarias de unas pocas enzimas biosintéticas, se sabe poco sobre el recambio o la degradación de los flavonoides y los detalles de los mecanismos reguladores postranscripcionales son limitados (Zhang & Schrader, 2017). Además, la gama de genes que codifican las enzimas de modificación secundaria que se han caracterizado sigue siendo limitada en comparación con la gran variedad de estructuras de flavonoides conocidas. Tampoco se han publicado ADNc o genes para algunas de las enzimas que llevan a cabo la hidroxilación de la estructura central de los flavonoides, como en las posiciones C-8 y C-2' (Zhen et al., 2017).

A continuación, se analizan en detalle las enzimas clave que intervienen en la formación de los ácidos hidroxicinámicos (HCA) a partir de la fenilalanina y el malonil-CoA, mientras que posteriormente se abordaran las ramas de la vía de los flavonoides que conducen a las antocianinas, las auronas, las flavonas, los flavonoles, los AP y los isoflavonoides.

### ***Precursores De Los Flavonoides***

Los primeros flavonoides, las chalconas, se forman a partir de ésteres de HCA-CoA, normalmente 4-cumaroil-CoA (Fig. 3), en tres reacciones secuenciales en las que interviene la molécula "diluyente" malonil-CoA. En algunas especies, la cafeoil-CoA y la feruloil-CoA también pueden utilizarse como sustratos para la formación de chalcona.

Fig. 3 Rutas generales de biosíntesis de fenilpropanoides y flavonoides. No se muestran los pasos de hidroxilación del anillo B. Para la formación de antocianinas a partir de leucoantocianidinas se representan dos rutas: un esquema simplificado a través de la antocianidina (pelargonidina) y la probable ruta in vivo a través de la pseudobase.



Traducido y adaptado de (Winkel, 2006)

El 4-cumaril-CoA se produce a partir del aminoácido fenilalanina mediante la vía general de los fenilpropanoides, a través de tres conversiones enzimáticas catalizadas por la fenilalanina amoníaco-liasa (PAL), el cinamato 4-hidroxilasa (C4H) y el 4-coumarato: CoA ligasa (4CL).

El malonil-CoA se forma a partir del acetil-CoA mediante la acetil-CoA carboxilasa (ACC) (Figura 3). El acetil-CoA puede producirse en las mitocondrias, los plastos, los peroxisomas y el citosol por diversas vías. El acetil-CoA citosólico es el que se utiliza para la biosíntesis de los flavonoides, y es producido por la enzima de subunidades múltiples ATP-citrato liasa que convierte el citrato, el ATP y el Co-A en acetil-CoA, oxaloacetato, ADP y fosfato inorgánico.

Muchos otros compuestos participan en la biosíntesis de los flavonoides en algunas especies, por ejemplo, como donantes para la metilación o la acilación aromática o alifática.

La ruta de síntesis de los flavonoides comienza con la formación de la columna vertebral C15 por parte de la CHS (Chalcona sintasa). A continuación, las chalconas suelen convertirse directa o indirectamente en una serie de otros flavonoides en una vía de intersección de ramas, en la que los compuestos intermedios participan en la formación de más de un tipo de producto final, como se puede observar en la Figura 3. Las antocianinas comunes más sencillas como los 3-O-glicósidos requieren un mínimo de cinco pasos enzimáticos posteriores a la formación de chalconas (Azuma et al., 2012).

### **Formación De Flavonas Y Flavonoles**

Una eliminación de hidrógenos que forma un doble enlace entre C-2 y C-3 del anillo C está implicada en la formación tanto de flavonas como de flavonoles, y los respectivos sustratos implicados, las (2S) flavanonas y los (2R,3R)-DHF, difieren únicamente en la presencia o ausencia del 3-hidroxilo (Falcone Ferreyra et al., 2012).

Se han caracterizado dos actividades distintas de la FNS (Flavona sintasa) que convierten las flavanonas en flavonas. En la mayoría de las plantas la FNS es una enzima P450 (FNSII), pero se ha descubierto que las especies de las *Apiaceae* contienen la 2OGD FNSI. Los ADNc del FNSII se aislaron por primera vez de *G. hybrida*, basándose en una visualización diferencial profunda L centrada en el sitio de unión al hemo del P450 conservado, y de *A. majus* y *T. fournieri* utilizando otro ADNc del P450 como sonda. El

aislamiento de un cDNA para FNSI se informó por primera vez a partir de *P. crispum*. Aunque las FNSI y FLS catalizan la reacción de desaturación 2,3 equivalente, se cree que es más probable que la FNSI haya evolucionado a partir del F3H en las *Apiaceae* (Harborne et al., 2013).

Los flavonoles se forman a partir de los (2R,3R)-dihydroflavonoles (DHF) por la Flavonol sintasa (FLS). Se aisló por primera vez un ADNc para la FLS de *P. hybrida* utilizando cebadores de PCR degenerados para secuencias conservadas de 2OGD, 145 y de hecho todos los ADNc de FLS identificados hasta la fecha codifican enzimas de 2OGD. Sin embargo, la FLSII encontrada en *Torenia* muestra actividad FLS, planteando la sugerencia de que, análogamente a la formación de flavona, hay dos tipos de FLS. La FLS recombinante en *Citrus unshiu* (mandarina Satsuma) tenía valores de  $K_m$  de 45 y 272 mM para Dihidro-kaempferol (DHK) y Dihidro-quercetina (DHQ), respectivamente.

Las flavonas y los flavonoles son sustratos para una serie de reacciones de modificación, como la glicosilación, la metilación, la acilación y la sulfatación. Hasta la fecha, se han clonado genes y ADNc que representan actividades específicas de las flavonas o los flavonoles para todas estas modificaciones, excepto la acilación (Harborne, 2013). También se han aislado varios ADNc cuyas proteínas codificadas aceptan una serie de sustratos flavónicos, e incluso no flavónicos.

Sin embargo, las actividades in vitro de las proteínas recombinantes pueden no reflejar su función in vivo. Factores como la abundancia de la proteína (temporal o espacialmente) en relación con el sustrato potencial, y la participación de la canalización metabólica, afectan a la actividad in vivo. No obstante, en varios experimentos transgénicos se ha demostrado que las enzimas flavonoides endógenas aceptan sustratos que no están normalmente presentes en la especie receptora, como las 6'-desoxiconas y los isoflavonoides, apoyando la amplia aceptación de sustratos de algunas enzimas de modificación (Wang et al., 2018).

### ***Biosíntesis De 5-Deoxiflavonoides***

Una característica de las legumbres es la biosíntesis de 6'-desoxiconas (chalconas que carecen de un hidroxilo en la posición C-6'), que son los sustratos para la producción de 5-deoxiflavonoides (Jaganath & Crozier, 2011). La formación de 6'-desoxiconas requiere la actividad de la policétido reductasa (PKR) (también conocida como chalcona

reductasa o chalcona cétido reductasa) junto con la Chalcona sintasa (CHS). Se cree que los policétidos intermedios ligados a CoA se difunden dentro y fuera del sitio activo de la CHS, y mientras no se unen son reducidos a alcoholes por la PKR. Los grupos hidroxilos resultantes se eliminan entonces de los productos de la PKR en los pasos finales de ciclización y aromatización catalizados por la CHS.

La PKR es una enzima monomérica dependiente de NADPH de 34 a 35 kDa que pertenece a la superfamilia de las aldo y ceto-reductasas. El primer aislamiento y caracterización de un ADNc de PKR fue de *G. max* (Gal-Ben *et al.*, 2019). El cDNA encontrado en *G. max*, y los cDNAs de otras especies, se han utilizado para confirmar la actividad PKR de la proteína recombinante, y para producir mayores cantidades de proteína para el análisis estructural. Los estudios de la proteína recombinante, y el análisis de las plantas transgénicas 35SCaMV:PKR, también han demostrado que la PKR es capaz de funcionar con proteínas CHS de especies no leguminosas que sintetizan sólo los 5-hidroxi flavonoides comunes.

### ***Isoflavonoides Y Sus Derivados***

Los isoflavonoides, que se encuentran principalmente en las legumbres, son un grupo de compuestos que tienen su origen en las flavanonas. El factor que diferencia a los isoflavonoides de otros flavonoides es la unión del anillo B a la posición C-3 en lugar de la C-2 del anillo C (Harborne *et al.*, 2013). Las modificaciones posteriores pueden dar lugar a una amplia gama de variaciones estructurales, incluida la formación de anillos heterocíclicos adicionales. Los anillos adicionales son principalmente del tipo metilendioxi o dimetilcromeno, formados a partir de la ciclación entre grupos vicinales de hidroxilo y metoxilo o monoprenilo, respectivamente.

Los pasos iniciales de la biosíntesis de isoflavonoides están ahora bien caracterizados a nivel molecular, pero hay un progreso limitado en los pasos enzimáticos posteriores que producen la amplia gama de derivados complejos que se encuentran en diferentes especies de leguminosas.

### ***Flavonoides En Citrus Reticulata***

Las catequinas, los flavonoles y las proantocianidinas son abundantes en las frutas. En cambio, las flavanonas y las flavonas están restringidas a las variedades de cítricos

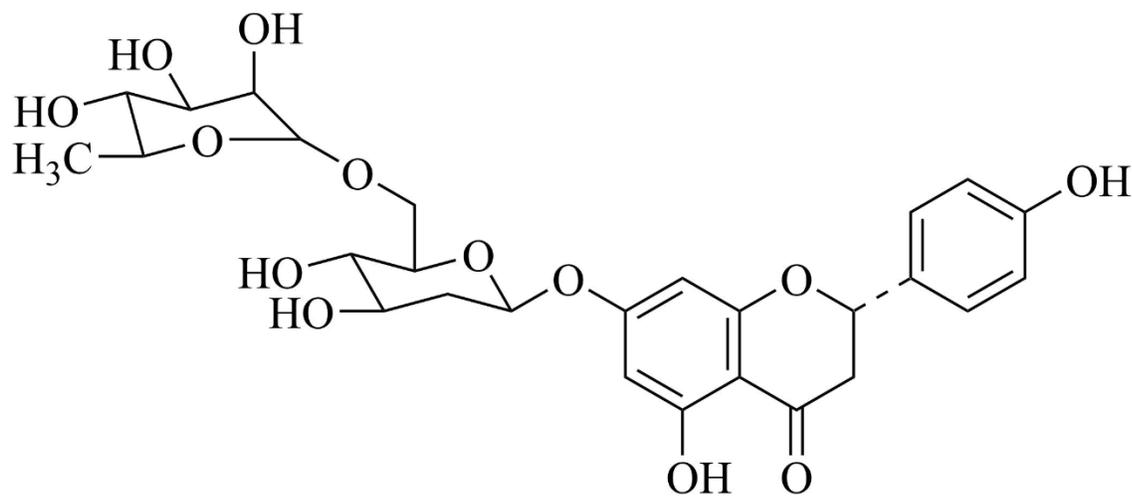
como las naranjas y los limones (F. Wang et al., 2019). En algunas frutas (por ejemplo, las manzanas), los flavonoles están presentes principalmente en la piel y, por tanto, el pelado reduce significativamente los niveles, a diferencia de las catequinas, que se encuentran en la pulpa de las frutas.

En general, las catequinas son los flavonoides más abundantes en las frutas, siendo la ( $\beta$ )-catequina (C) y la ( $\gamma$ )-epicatequina (EC) especialmente prevalentes. Las uvas negras (4,9 y 4,7 mg/100 g, C y EC, respectivamente) son una de las frutas más ricas en catequinas, seguidas de las manzanas (0,8 y 6,3 mg/100 g, C y EC, respectivamente). Las procianidinas de tipo B también están presentes en las frutas, siendo las manzanas (3,8 a 15,4 mg/100 g), las ciruelas (16,1 mg/100 g) y los melocotones (3,2 mg/100 g) las que contienen las mayores concentraciones. Sin embargo, los cítricos no parecen contener niveles detectables de catequinas o procianidinas de tipo B (Owens & McIntosh, 2011).

Las flavanonas (también denominadas flavonoides cítricos) son los principales flavonoides acumulados masivamente en los cítricos. Las flavanonas de los cítricos están presentes en forma de agliconas y glucósidos (Tundis et al., 2019). El eriodictiol, la hesperetina, la naringenina y la isosakuranetina son las principales agliconas de flavanona identificadas en los cítricos.

En comparación con las agliconas de flavanona, los glucósidos de flavanona son más abundantes en la mayoría de los cítricos. En las formas glucósidas, las agliconas de flavanona se conjugan con la rutinosa y la neohesperidosa, respectivamente. La composición del glucósido de flavanona varía entre las distintas variedades de cítricos (Shin et al., 2013). Las dos principales flavanonas rutinósidas, la hesperidina (que se puede ver en la Fig. 4 en forma de glucosido) y la narirutina, se acumulan en la naranja dulce, los tangores, las mandarinas y el limón. En cambio, la naringina, la neohesperidina y la neoeriocitrina, que son las principales flavanonas neohesperidosidas, se acumulan predominantemente en el pomelo, la naranja agria y el Natsudaidai. Además, como las flavanonas neohesperidosidas tienen un sabor amargo, la acumulación de naringina y neohesperidina da un sabor único a los cítricos (Alam et al., 2014).

Fig. 4 Estructura de la hesperidina glicosilada.



Hesperidina

Las flavonas son un subgrupo de los flavonoides, que se diferencian de las flavanonas por un doble enlace C2-C3. Las flavonas también están presentes en forma de agliconas y glucósidos en los cítricos. La flavona 7-O-rutinósido y la flavona 7-O-neohesperidósido son los principales glucósidos de flavona acumulados en los cítricos (Roowi & Crozier, 2011). Además, algunas de las flavonas están altamente metoxiladas en los cítricos, y las flavonas polimetoxiladas (PMF) (nobiletina, tangeretina y sinensetina) se acumulan específicamente en el flavedo de los cítricos (Liu et al., 2018).

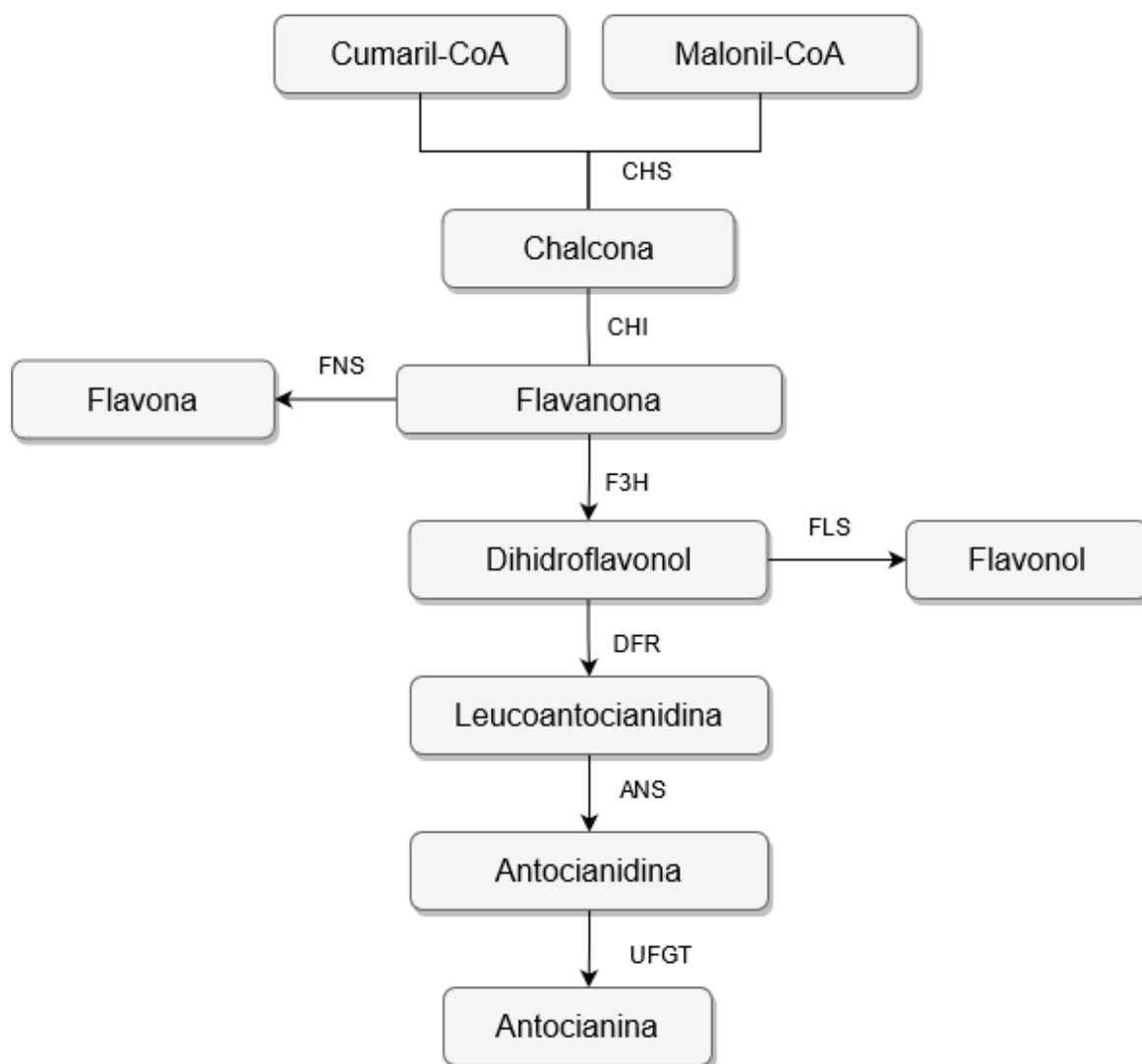
Los flavonoles están ampliamente presentes en las plantas. En los cítricos, el kaempferol, la quercetina y la rutina se identifican como los principales flavonoles de los cítricos, que se acumulan preferentemente en las hojas de la mayoría de las variedades de cítricos. En los cítricos, una cantidad muy pequeña de flavonoles se acumula específicamente en unas pocas especies, como el limón y la lima (Wang et al., 2016).

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles sintetizados a través de la vía fenilpropanoide. En los cítricos, las antocianinas se acumulan específicamente en la corteza y las vesículas de zumo de varios cultivares de naranja sanguina como Tarocco, Moro y Sanguinello. Las principales antocianinas de la naranja sanguina se han identificado como cianidina 3-glucósido y cianidina 3-(6"-malonilglucósido) (Lo Piero, 2015). En los cítricos, la acumulación de antocianina está muy regulada por las condiciones climáticas imperantes durante la maduración de la fruta.

### ***Biosíntesis De Flavonoides En Cítricos***

En los cítricos, se han aislado algunas de las enzimas clave y se caracterizaron sus funciones en la acumulación de flavonoides (Khan et al., 2014). Un esquema simplificado de la biosíntesis de flavonoides en el género *Citrus* se puede observar en la Figura 5. La chalcona sintasa (CHS), que es la primera enzima comprometida en la biosíntesis de los flavonoides, condensa tres moléculas de malonil-CoA y una de 4-Cumaril-CoA para producir las estructuras básicas de las chalconas de los que derivan los flavonoides. En el siguiente paso, la chalcona flavonoide es isomerizada por la chalcona isomerasa (CHI) para formar la flavanona naringenina. La flavanona se convierte además en flavona por la flavona sintasa (FNS), y en dihidroflavonol (dihidrokaempferol) por la flavonona 3-hidroxilasa (F3H). El dihidroflavonol, que es el sustrato para la biosíntesis del flavonol y la antocianina, se encuentra en un importante punto de ramificación en la biosíntesis de los flavonoides.

Fig. 5 Ruta sintética resumida de los flavonoides en los cítricos. CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; FNS, flavona sintasa; FLS, flavonol sintasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; ANS, antocianidina sintasa; UFGT, UDP-glucosa flavonoide 3-O glucosiltransferasa.



Traducido y adaptado de (Khan et al., 2014).

La flavonol sintasa (FLS) cataliza la oxidación del dihidroflavonol para producir flavonol. En la biosíntesis de las antocianinas, la dihidroflavonol reductasa (DFR) compite por el sustrato, los dihidroflavonoles, con la FLS, y reduce el dihidroflavonol a su correspondiente leucoantocianidina. La leucoantocianidina se convierte además en antocianina catalizada por la leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX) y la antocianidina reductasa (ANR) (Najmanová et al., 2020).

En plantas superiores, la biosíntesis de los flavonoides no sólo está controlada por los genes estructurales, sino también por los factores de transcripción MYB. En los cítricos, un factor de transcripción R2R3-MYB, *Ruby*, fue aislado y estudiado (Butelli et al., 2012). Este factor de transcripción es responsable de la biosíntesis de antocianina, y la inserción de un retrotransposón tipo Copia adyacente a Ruby activaba la producción de antocianina en *Citrus x sinensis*. En los cítricos, los flavonoides se sintetizan en la etapa de maduración temprana, y la acumulación masiva de flavonoides junto con la alta expresión génica de CHS, CHI y F3H se observó en los tejidos jóvenes (Sharma et al., 2019).

### ***Flavonoides En Citrus Reticulata Y Actividad Hipoglucemiante***

Los cítricos, ampliamente cultivados en climas tropicales y subtropicales, son uno de los cultivos más importantes del mundo. Cada año se producen aproximadamente 130 millones de toneladas de cítricos en más de 140 países. Entre ellos, China, Brasil y Estados Unidos son los mayores productores de cítricos, seguidos de México, India y España (Duarte et al., 2016). Los cítricos han sido consumidos por el ser humano desde la antigüedad. Como se pueden pelar fácilmente y su pulpa es blanda y jugosa con un sabor característico, los cítricos representan una parte importante de la dieta diaria hoy en día. Los cultivares de cítricos como naranjas (*Citrus sinensis*), mandarinas (*Citrus reticulata*, *Citrus clementina* y *Citrus unshiu*), limones (*Citrus limon*) y pomelos (*Citrus x paradisi*) son populares en todo el mundo, y se consumen principalmente como frutas frescas o procesadas en zumos y mermeladas (Kundu et al., 2020).

Los frutos de los cítricos se han utilizado como hierbas medicinales en la medicina tradicional durante miles de años. La cáscara seca de diferentes tipos de cítricos consumidos en china, conocida como *chen pi* o *ju pi*, es una hierba medicinal comestible no tóxica, y se ha utilizado para mejorar la digestión, aliviar gases intestinales y la hinchazón en la medicina tradicional china. En las últimas décadas, un número creciente de estudios epidemiológicos y clínicos han demostrado que el consumo de cítricos está asociado a la reducción de los riesgos de enfermedades relacionadas con el estilo de vida, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la osteoporosis, la diabetes de tipo 2, entre otras enfermedades (Wu et al., 2013).

Los diferentes cítricos son una de las fuentes más ricas en flavonoides, que están ampliamente distribuidos en la semilla, la hoja, la raíz y los frutos. Hasta la fecha, se han

identificado más de 100 flavonoides en los cítricos, que están presentes principalmente como compuestos conjugados de azúcar (Wang et al., 2017).

Los flavonoides son una de las familias de compuestos importantes de los medicamentos a base de hierbas, y se han utilizado durante mucho tiempo en la medicina tradicional. Los flavonoides tienen una gran actividad antioxidante y de eliminación de radicales, y los flavonoides de la dieta protegen al cuerpo humano contra los radicales libres y otros compuestos prooxidantes. Además, los flavonoides son capaces de quelarse con los metales y unirse a las proteínas. Investigaciones recientes sugieren que la formación de complejos con iones metálicos y proteínas puede aumentar el potencial de los flavonoides para prevenir algunos trastornos cardiovasculares (Selvaraj et al., 2014).

Los cítricos acumulan grandes cantidades de flavonoides en el flavedo, el albedo, la semilla y los sacos de zumo. En *Citrus reticulata*, la hesperidina, la naringina y los PMF son los flavonoides característicos que se acumulan específicamente en los frutos (Harborne et al., 2013). En las últimas décadas, se ha investigado ampliamente el papel de estos flavonoides de los cítricos en la salud humana, y sus propiedades farmacológicas y terapéuticas están bien documentadas (Cirimi et al., 2016).

### **Hesperidina**

La hesperidina (el 7-O-rutinósido de la hesperetina) (Fig. 4), miembro del grupo de flavonoides de las flavanonas, puede aislarse en grandes cantidades de la pulpa y la corteza de los frutos de algunas especies de cítricos, en especial de *Citrus sinensis* y *Citrus reticulata*. La hesperidina se acumula en un alto nivel en diversas variedades de naranja, mandarina, limón, lima y pomelo. Esta molécula fue aislada por primera vez por Lebreton en 1927 y en los primeros estudios, se informó de que la hesperidina poseía una actividad similar a la de las vitaminas y que disminuía la permeabilidad, la filtración y la fragilidad capilar (Nandakumar et al., 2011).

La deficiencia de hesperidina se ha relacionado con problemas vasculares periféricos y el dolor en manos, pies y calambres en las piernas por la noche. En las últimas décadas, se han realizado numerosas investigaciones sobre la bioactividad de la hesperidina y se han identificado numerosas propiedades biológicas, principalmente actividades anticancerígenas y antiinflamatorias (Roohbakhsh et al., 2015).

La hesperidina posee una importante actividad antiinflamatoria. En estudios realizados en los últimos 20 años, se ha informado de que la hesperidina disminuía la expresión genética de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y proporcionaba efectos antiinflamatorios en múltiples modelos experimentales (Devi et al., 2015). La hesperidina también es un prometedor agente anticancerígeno cuya actividad se ha reportado en múltiples tipos de cáncer, incluyendo el gástrico, de colon, de mama, de pulmón y de hígado (Devi et al., 2015).

A su vez, Roohbakhsh y colaboradores reportaron que las propiedades quimiopreventivas del cáncer de la hesperidina se atribuían principalmente a sus actividades antioxidantes y antiinflamatorias. La hesperidina inhibe el crecimiento de los tumores al aumentar el sistema de defensa antioxidante, inducir la apoptosis en las células cancerosas, disminuir las citoquinas y enzimas inflamatorias e inhibir la angiogénesis y la metástasis (Roohbakhsh et al., 2015).

Además de las actividades anticancerígenas y antiinflamatorias, también hay variados informes sobre los efectos hipoglucemiantes de la hesperidina (Ahmed et al., 2012). La alimentación con un 1% de hesperidina evitó la elevación del nivel de glucosa en sangre y de insulina sérica en ratas Goto-Kakizaki. La administración de hesperidina a este modelo de rata diabética redujo no sólo los niveles de HbA1c (hemoglobina glucosilada) y de glucosa, sino también el colesterol total y los triglicéridos (Kakadiya et al., 2010). En las ratas tratadas con hesperidina, el nivel de LDL (lipoproteínas de baja densidad) disminuyó, mientras que el nivel de HDL (lipoproteínas de alta densidad) aumentó. Mientras tanto, la hesperidina activó el receptor activado por el proliferador de peroxisomas- $\gamma$  en la rata diabética y provocó una reducción de los niveles de peróxido de lípidos en sangre (Agrawal et al., 2014).

Una de las enfermedades crónicas más comunes que pueden tratarse con este flavonoide es la diabetes. En un estudio reportado por Park *et al.* los autores utilizaron un modelo animal de diabetes inducida por Streptozotocina (STZ) para evaluar el efecto de la hesperidina sobre los marcadores bioquímicos, las enzimas reguladoras de la glucosa y los parámetros de pérdida ósea en ratas diabéticas de tipo 1. La hesperidina redujo la glucosa en sangre y la insulina sérica y normalizó las actividades enzimáticas de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), la glucoquinasa (GK) y otras enzimas hepáticas importantes en el control glucémico (Park et al., 2013). Además, se ha demostrado que el tratamiento con hesperidina podía atenuar el estrés oxidativo mediado por la hiperglucemia

y suprimir la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- $\alpha$  y la IL-6, en ratas diabéticas de tipo 2 inducidas por HFD/STZ (Mahmoud et al., 2012). Estos resultados coinciden con los reportados por Salma *et al.*, que informaron de que la administración oral de hesperidina reducía la glucosa en sangre, disminuía los niveles de MDA e IL-6 y aumentaba los niveles de GSH y del factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) en el cerebro de ratas con diabetes. La hesperidina también normalizó los niveles de monoaminas en el cerebro, específicamente la norepinefrina y la dopamina, y elevó los niveles cerebrales de serotonina (Salma. et al., 2014). Los resultados obtenidos también se reflejaron en los parámetros físicos y conductuales, ya que la hesperidina redujo el tiempo de inmovilidad de las ratas con diabetes en la prueba de natación forzada.

Para estudiar el mecanismo de acción de la hesperidina como producto natural antidiabético se ha utilizado ratas diabéticas de tipo 2 inducidas por HFD/STZ y estudios *in vitro* (Mahmoud et al., 2015). Se demostró que la administración oral de hesperidina reducía la glucosa en ayunas y atenuaba la resistencia a la insulina en ratas diabéticas, y aumentaba la liberación de insulina en islotes pancreáticos aislados. Además, normalizó las actividades de enzimas metabólicas, como la glucosa-6-fosfatasa, la glucógeno-fosforilasa y la fructosa-1,6-bisfosfatasa. También se comprobó que este flavonoide aumenta la captación de glucosa en células pancreáticas aisladas. Se ha demostrado que los efectos antidiabéticos de la hesperidina se deben principalmente a su capacidad de aumentar la expresión de ARNm y proteínas de GLUT4 en el tejido adiposo, además de disminuir la absorción intestinal de glucosa.

La alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato transaminasa (AST) son dos enzimas hepáticas dependientes del fosfato de piridoxal que participan en la gluconeogénesis y el metabolismo de los aminoácidos y catalizan las reacciones intermedias del metabolismo de la glucosa y las proteínas (Zareei et al., 2017). El aumento de la actividad de estas enzimas se ha observado en el síndrome metabólico hepático, la aterogénesis y la diabetes de tipo I y II. En células de hígado de rata, diferentes concentraciones de hesperidina mostraron efectos inhibitorios contra las actividades de ALT y AST; por lo tanto, puede considerarse un compuesto potencial para diseñar un agente seguro y eficaz para el tratamiento de la lesión hepática asociada a la diabetes mellitus.

En modelos animales diabéticos inducidos por STZ, se han corroborado algunos de los resultados publicados sobre este flavonoide cítrico, y añadieron más hallazgos

moleculares importantes, que mostraron que la hesperidina disminuía de forma significativa los niveles séricos de colesterol total, TG, LDL C, VLDL C y MDA, y aumentaba las concentraciones de glutatión (GSH), pero no modificaba los niveles de HDL-C (Dokumacioglu et al., 2018). Además, el análisis histológico demostró que el tratamiento con hesperidina condujo a una mejora de las células degeneradas de los islotes en las ratas diabéticas. El estudio también informó de una reducción de las citoquinas proinflamatorias en las ratas diabéticas. Los autores especularon que el control de la pérdida de peso en las ratas diabéticas tratadas con hesperidina podría ser el resultado de la regulación organizada de los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 en el tejido adiposo. Los estudios informaron de que el aumento de la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6 por parte del tejido adiposo subcutáneo se correlaciona con la obesidad y la adiposidad, y también se sugirió que se asociaba con el origen de las complicaciones microvasculares diabéticas (Ghavipour et al., 2013).

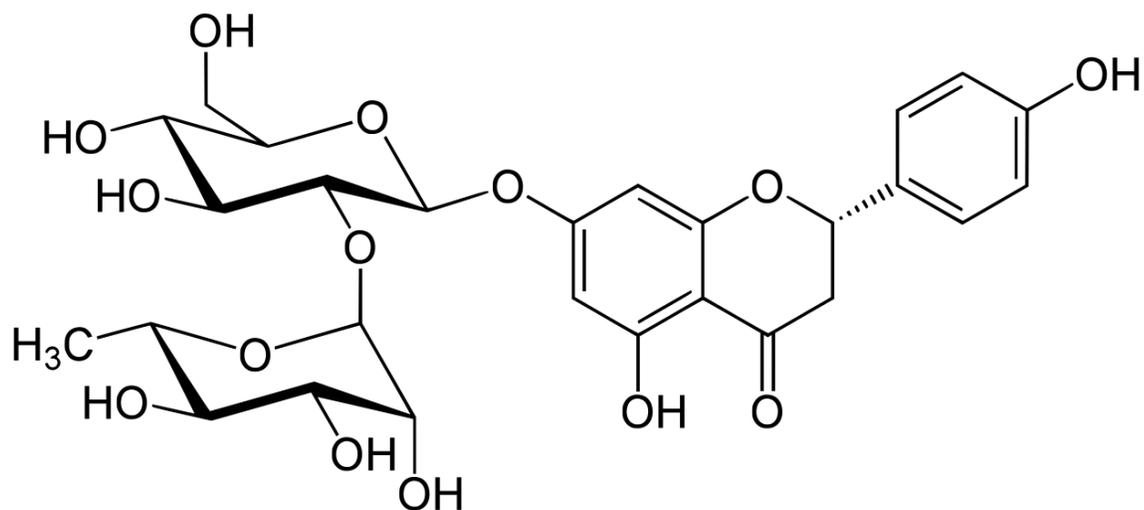
La realización de estudios clínicos con flavonoides purificados como la hesperidina son muy limitados. En sujetos hipertriglicéridémicos, la administración de glucosil hesperidina (500 mg/día durante 24 semanas) redujo los niveles de triglicéridos y apoB en plasma. En cambio, en hombres y mujeres moderadamente hipercolesterolémicos, la suplementación con 800 mg/día de hesperidina durante 4 semanas no tuvo efectos estadísticamente diferentes en los niveles de colesterol total o colesterol LDL en comparación con el grupo de control (Demonty et al., 2010). Con base en estos resultados, cabe pensar que la identificación de grupos de población que se beneficiarían del tratamiento con flavanonas cítricas purificadas no es sencilla, por lo que se requieren más estudios. Un resultado interesante fue reportado por Dallas *et al*, en sujetos con sobrepeso, un extracto de polifenoles de cítricos (900 mg/día durante 12 semanas) disminuyó significativamente el peso corporal y el nivel de glucosa en plasma (Dallas et al., 2014).

### ***Naringina***

La naringina (4',5,7-trihidroxi flavanona 7-rhamnoglucósido), es un glucósido de flavanona que abunda en cítricos como *Citrus reticulata* (Fig. 6). La naringina fue descubierta por primera vez en las flores del pomelo por De Vry en 1857. Más tarde, los investigadores informaron de que la naringina se acumulaba a un alto nivel en varios cítricos, como el pomelo, la naranja agria y algunas especies de mandarinas. En el pomelo, las vesículas del zumo y las semillas tenían la menor concentración de naringina, mientras

que las membranas del segmento, el albedo y la médula tenían la más alta (Alam et al., 2014).

Fig. 6. Estructura de la naringina



Debido a la amargura de la naringina, la acumulación de ésta imparte un sabor amargo distintivo a los zumos de cítricos. La naringina era uno de los compuestos activos ampliamente utilizados en las medicinas herbales chinas. En los últimos años, las funciones de la naringina en la salud humana han suscitado el interés de los científicos, y se han realizado importantes avances en las propiedades biológicas y farmacológicas de esta molécula. En el estudio de Viswanatha *et al.* se descubrió que la naringina era eficaz para mejorar los defectos neuroconductuales producidos por diversos estímulos físicos y químicos sobre el estrés oxidativo en el cerebro de los roedores (Viswanatha et al., 2017). El análisis que se realizó sobre el efecto de la naringina en los marcadores de estrés oxidativo sugirió que la molécula restauró los niveles de todos los marcadores de estrés oxidativo (oxidativo, nitrosativo, enzimas y complejos mitocondriales) en diferentes partes del cerebro de los roedores.

Se ha informado de que la suplementación con naringina fue útil para el tratamiento de la obesidad, la diabetes, la hipertensión y el síndrome metabólico (Alam et al., 2014). Los efectos beneficiosos de la naringina en el síndrome metabólico no sólo se atribuyeron a su elevada actividad antioxidante y antiinflamatoria, sino que también se relacionaron estrechamente con la modificación de la vía de señales moleculares. En el síndrome metabólico, la obesidad y las complicaciones cardiovasculares relacionadas, la naringina

influye en la utilización de la grasa mediada por AMPK, PPAR $\alpha$  y CPT-1 y preserva la función mitocondrial.

Mahmoud *et al.* realizaron dos estudios, en 2012 y 2015, para evaluar el potencial antidiabético de la naringina. Según los autores, la naringina atenuó los parámetros de estrés oxidativo mediados por la hiperglucemia (MDA y NO) y la secreción y producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) en ratas diabéticas de tipo 2 inducidas por HFD/STZ. Los autores confirmaron que la administración oral de naringina normalizaba las actividades de importantes enzimas del metabolismo glucolítico hepático, como la G6Pasa, la glucógeno fosforilasa y la fructosa-1,6-bisfosfatasa. Además, la naringina aumentó la liberación de insulina de islotes aislados en presencia de IL-1 $\beta$  y disminuyó la absorción intestinal de glucosa (Mahmoud *et al.*, 2012). También se verificaron sus efectos antioxidantes debido a la reducción de óxido de nitrógeno (I) (NO) en islotes pancreáticos aislados. El mecanismo de acción responsable de los efectos de la naringina puede estar relacionado con el aumento de la expresión de GLUT4 en el tejido adiposo, que ayuda a la captación de la glucosa libre circulante desde la sangre a los tejidos periféricos.

Se ha investigado el efecto de la naringina sobre la disfunción endotelial inducida por la fructosa en ratas y sus mecanismos fundamentales (Malakul *et al.*, 2018). Las ratas que habían consumido fructosa en el agua de bebida mostraron un aumento significativo de los niveles de glucosa, CT, TG y LDL C en sangre. La fructosa deterioró la función endotelial, pero la función del músculo liso vascular no se vio afectada por el tratamiento con fructosa. Curiosamente, la naringina restauró la función endotelial en los anillos aórticos, confirmando un efecto vasoprotector. Además, la naringina mejoró la expresión de las proteínas nitrato/nitrito (NOx), eNOS y eNOS fosforilada (p-eNOS) en suero. Por lo tanto, los autores concluyeron que el potencial vascular de la naringina se atribuía moderadamente a la mejora de la biodisponibilidad del NO, al aumento de la actividad de la eNOS y a la obstrucción de la acumulación de peroxinitrito en las aortas.

Los resultados de diferentes estudios demuestran el potencial curativo relacionado de la naringina en la atenuación del daño oxidativo y las cascadas inflamatorias. Además, presenta un efecto preservador único sobre la disfunción endotelial, un factor importante en el desarrollo de las complicaciones diabéticas, especialmente la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares.

## ***Flavonas Polimetoxiladas***

Las flavonas polimetoxiladas, entre las que se encuentran la nobiletina, la tangeretina, la 3,3',4',5,6,7,8-heptametoxiflavona y la sinensetina, son abundantes en los tejidos de la piel de ciertos tipos de especies de cítricos. En los cítricos, esta clase de flavonas están presentes como compuestos flavonoides menores, y su contenido es inferior al de la hesperidina y la naringina. Sin embargo, como la estructura polimetoxilada aumenta la estabilidad metabólica y la permeabilidad de las flavonas, las flavonas polimetoxiladas se absorben más fácilmente y presentan una mayor biodisponibilidad que los glucósidos flavonoides.

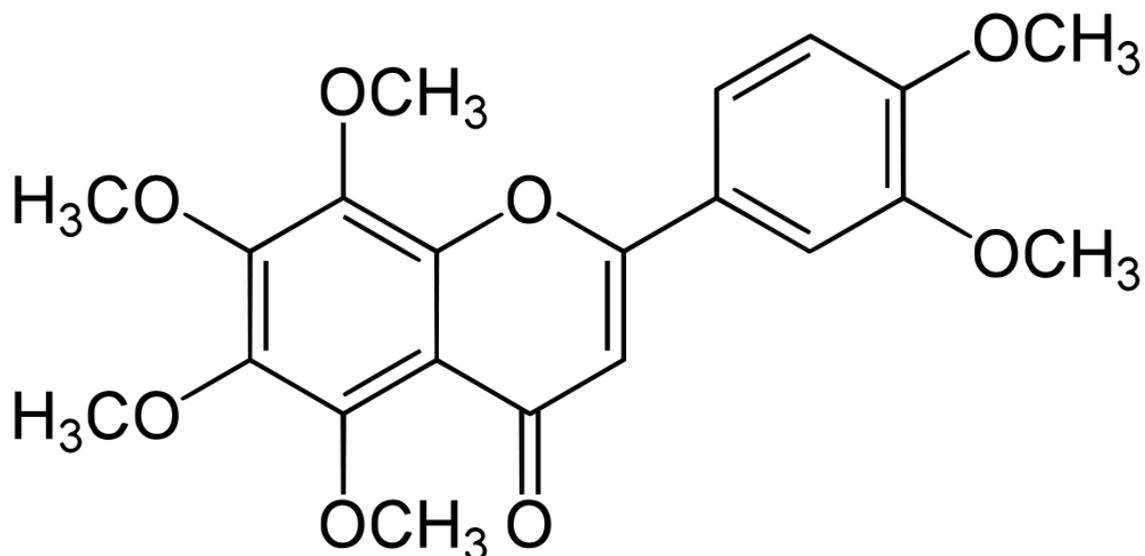
En la actualidad se han aislado e identificado más de veinte flavonas polimetoxiladas a partir de diferentes tejidos de plantas de cítricos, siendo las cáscaras de los cítricos el recurso más abundante. Los isómeros y el contenido de las flavonas polimetoxiladas varían drásticamente entre las distintas variedades de especies de cítricos. Por lo tanto, la variedad y la cantidad de flavonas polimetoxiladas deben estudiarse a fondo y los resultados obtenidos pueden servir para fines taxonómicos en las ciencias botánicas y agrícolas (Gao et al., 2018).

La coexistencia de múltiples polimetoxiflavonas y mono o di-desmetil-polimetoxiflavonas crea obstáculos para la identificación y cuantificación de estos compuestos individuales, incluyendo la nobiletina y sus compuestos relacionados. Afortunadamente, con la ayuda de modernas técnicas analíticas avanzadas, es posible desentrañar la compleja mezcla fitoquímica haciendo posible el aislamiento y caracterización de prácticamente cualquier compuesto en plantas o extractos de plantas. En el análisis de flavonas polimetoxiladas que contienen nobiletina en las cáscaras de los cítricos, hubo varias metodologías reportadas como cromatografía de gases (GC), cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (GC/MS), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas (LC/MS). Pero la investigación estandarizada de la identificación y cuantificación de la nobiletina y su clase de PMFs no ganó su popularidad hasta el informe de un método de análisis de HPLC validado de seis PMFs individuales en extractos de cáscara de cítricos (CPEs) siendo la nobiletina un componente principal en los CPEs medidos (Zhao et al., 2011).

La aplicación de estas técnicas analíticas en combinación con los bioensayos celulares y moleculares permiten la identificación de componentes bioactivos clave como la nobiletina que ayudan a establecer el SAR (relación estructura-actividad), y en consecuencia guían la dirección del estudio hacia componentes químicamente definidos y biológicamente confirmados como cribado dirigido y control estandarizado en la investigación de productos naturales (Seoka et al., 2020).

La Nobiletina (5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona) es un flavonoide, o un flavonoide O-metilado según la definición convencional de flavonoides, en la que los flavonoides son compuestos polifenólicos que tienen un esqueleto básico C6-C3-C6 de 15 carbonos con múltiples grupos hidroxilos en el sistema de tres anillos.

Fig 7. Estructura de la Nobiletina.



Los flavonoides de los cítricos tienen una estructura de benzo-pirona y presentan sustituciones de fenilo en la posición C3. Los flavonoides de cítricos incluyen una clase de glucósidos, concretamente la hesperidina y la naringina, y otra clase de agliconas ometiladas de flavonas como la nobiletina y la tangeretina, que son dos flavonas polimetoxiladas relativamente comunes, ambas presentes en las cáscaras de la mandarina (*Citrus reticulata*), naranja dulce (*Citrus sinensis*) y naranja amarga (*Citrus aurantium*) (Kawahata et al., 2013). Recientemente, amplios estudios epidemiológicos han sugerido que la nobiletina es un candidato prometedor para el desarrollo como agente terapéutico con una amplia gama de actividades farmacológicas (Huang et al., 2016).

Usando como modelo ratones alimentados con una dieta alta en calorías, la nobiletina atenuó la dislipidemia a través de una reducción de la secreción de triglicéridos de VLDL (lipoproteína de muy baja densidad). La nobiletina no activó ningún receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR), lo que indica que los efectos metabólicos de la nobiletina eran independientes del PPAR (Mulvihill et al., 2011).

También se han realizado estudios sobre la relación de la Nobiletina con un posible efecto anti-demencia. La nobiletina mejora la señalización de la proteína quinasa A (PKA)/la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK)/la proteína de unión a elementos de respuesta al AMPc (CREB) en las células PC12D y en los cultivos de neuronas del hipocampo de rata (Chiu et al., 2013). Además, la nobiletina induce la potenciación a largo plazo, que se cree que es la base celular del aprendizaje y la memoria, a través de la activación de la fosforilación dependiente de PKA de la subunidad del receptor GluR1 del ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) en rodajas de hipocampo (Devkota et al., 2021). Estos resultados indican que la nobiletina exhibió efectos de mejora de la memoria en varios modelos animales y ejerció una amplia gama de efectos beneficiosos contra las características patológicas de la enfermedad de Alzheimer, el estrés oxidativo, la neurodegeneración colinérgica y la disfunción de la señalización relacionada con la plasticidad sináptica.

Al igual que otros bioflavonoides, la nobiletina ha demostrado tener propiedades medicinales potenciales en varias patologías y sus causas asociadas, como la prevención de la diabetes tipo 2 (Lee et al., 2013), la protección contra la pérdida de densidad mineral ósea (Y. Wang et al., 2019) y la reducción del colesterol en sangre (Nohara et al., 2019). Los estudios han sugerido que esta flavona puede ser una molécula terapéutica eficaz para el tratamiento de síndromes metabólicos, como las enfermedades cardiovasculares, la obesidad abdominal y el aumento de la presión arterial.

Mulvihill *et al* evaluaron el efecto de la Nobiletina sobre la secreción de lipoproteínas en células de hepatoma humano cultivadas (HepG2) y en un modelo de ratón de dislipidemia y aterosclerosis que acompaña a la resistencia a la insulina. Los resultados *in vitro* mostraron que la administración de nobiletina redujo de forma dependiente de la dosis la secreción de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B100, que representa un importante factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares (Mulvihill et al., 2011).

Según los autores, este efecto se produjo a través de la activación de la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos/señal extracelular regulada por quinasas (MAPK/ERK). La activación de la MAPK/ERK por la nobiletina disminuyó la expresión del ARNm de la proteína de transferencia de triglicéridos microsómica (MTP), el diacilglicerol O-aciltransferasa (DGAT)-1 y la DGAT2, mientras que aumentó la expresión del ARNm del receptor hepático de lipoproteínas de baja densidad (LDLR). Sin embargo, no encontraron evidencia de que la nobiletina module la fosforilación de la tirosina del receptor de la insulina (IR) o del sustrato del receptor de la insulina 1 (IRS-1). Además, la síntesis de TG y la masa de TG se redujeron significativamente en las células tratadas con nobiletina, con el aumento de la expresión del ARNm de la carnitina palmitoiltransferasa I  $\alpha$  (CPT1- $\alpha$ ) y del coactivador 1-alfa del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1- $\alpha$ ).

La mayoría de los resultados favorables observados en el mencionado experimento *in vitro* fueron comparables con los resultados *in vivo*, en los que la nobiletina previno el aumento de peso inducido por la dieta y redujo la dislipidemia en ratones diabéticos alimentados con HFD. Los estudios *in vivo* sobre la nobiletina disminuyeron significativamente los niveles de lípidos plasmáticos (TG y colesterol total (TC)), redujeron la tasa de secreción de lipoproteínas de muy baja densidad y triglicéridos totales (VLDL-TG), y normalizaron los elevados niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFA) y glicerol en el plasma, además de reducir los TG tanto en el hígado como en los intestinos de los ratones diabéticos alimentados con HFD.

En contraste con los resultados *in vitro*, la nobiletina no afectó a la expresión hepática de MTP o DGAT1/2. Los ratones diabéticos obesos alimentados con HFD tratados con nobiletina también aumentaron la expresión de CPT1- $\alpha$  y PGC1- $\alpha$ , y las tasas de oxidación de ácidos grasos. Las pruebas de tolerancia a la glucosa realizadas en los ratones obesos diabéticos alimentados con HFD revelaron que la nobiletina normalizó el deterioro de la tolerancia a la glucosa inducido por la dieta alta en grasas, al tiempo que disminuyó significativamente la hiperinsulinemia y mejoró la sensibilidad a la insulina.

Además, la obesidad inducida por la dieta y la hipertrofia de los adipocitos se inhibieron en los ratones diabéticos obesos alimentados con HFD tratados con nobiletina. Se previno la dislipidemia y la esteatosis hepática, y se mejoraron los parámetros metabólicos, lo que condujo a la prevención de la aterosclerosis y a una drástica reducción de las lesiones dentro del seno aórtico en comparación con los ratones alimentados con una dieta rica en grasas que no fueron tratados con nobiletina.

En otro estudio *in vitro* llevado a cabo por Onda *et al*, se demostró que la nobiletina afectaba a la captación de glucosa en las células objetivo de la insulina, como los adipocitos, utilizando líneas celulares de adipocitos (preadipocitos murinos 3T3-F442). El tratamiento con nobiletina aumentó la captación de [3H]-desoxiglucosa en adipocitos diferenciados en presencia de insulina (Onda *et al.*, 2013). La influencia en el aumento de la captación de glucosa en los adipocitos se asoció con varios inhibidores de la cascada de señalización que se reconocen como promotores de las vías de incorporación de glucosa. Los resultados mostraron que las vías de la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K), la proteína quinasa B (Akt) y la proteína quinasa A (PKA) estaban implicadas en el aumento de la captación de glucosa. Estos resultados *in vitro* alientan la realización de nuevos estudios *in vivo* para analizar la acción antidiabética de este polimetoxiflavonoide y su mecanismo molecular implicado en la mejora de la captación de glucosa a través de la vía de señalización PI3K/Akt en los tejidos objetivo de la insulina.

Para dilucidar el mecanismo hipoglucemiante de la nobiletina, Kanda *et al.* realizaron un estudio utilizando células preadipocitarias 3T3-L1 en el que la nobiletina suprimió la acumulación de lípidos en los adipocitos 3T3-L1, sugiriendo que la nobiletina inhibió la adipogénesis en las células 3T3-L1 cuando la diferenciación de los adipocitos fue inducida por insulina, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y dexametasona (DEX) (Kanda *et al.*, 2012).

En cuanto al mecanismo de acción implicado en esta respuesta, la nobiletina no afectó a la expresión proteica del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ )1 en las células 3T3-L1; sin embargo, suprimió de forma significativa la expresión proteica de PPAR2, un importante marcador en la adipogénesis. Las transcripciones de PPAR $\gamma$ 2 y de la proteína adipocitaria 2 (aP2), dos genes diana de PPAR $\gamma$ , fueron significativamente reguladas a la baja por el tratamiento con nobiletina. Además, suprimió la expresión de la proteína beta de enlace CCAAT (C/EBP $\beta$ ), lo que sugiere que la nobiletina puede inhibir la diferenciación de los adipocitos mediante la regulación a la baja de la expresión del gen PPAR2 a través de la disminución de la expresión de C/EBP $\beta$ . Finalmente, la nobiletina redujo la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) y mejoró fuertemente la fosforilación del transductor de señales y activador de la transcripción 5 (STAT5), sugiriendo que un efecto supresor de nobiletina en la diferenciación de los adipocitos estaba involucrado debido a la mayor activación de STAT5 por la regulación de la actividad de PPAR $\gamma$ .

Otros investigadores han planteado la hipótesis de que la nobiletina, debido a su potencial antioxidante y de inhibición de las metaloproteinasas (MMP)-2 y MMP-9, podría mejorar la disfunción cardiovascular en la diabetes (Parkar et al., 2016). En un modelo animal de diabetes inducida por STZ, el tratamiento con nobiletina redujo la presión arterial media en las ratas diabéticas en comparación con las ratas tratadas con un vehículo. La frecuencia cardíaca cayó rápida y dramáticamente después de la administración de STZ; sin embargo, la nobiletina aumentó la frecuencia cardíaca y mantuvo la condición normal. Además, en relación con otros parámetros cardíacos, la nobiletina redujo las actividades enzimáticas MMP-2 y MMP-9 en el corazón, mejoró el índice de hipertrofia cardíaca, atenuó el deterioro de la morfología de los cardiomiocitos y redujo la fibrosis miocárdica inducida por la diabetes en las ratas. La nobiletina también mostró efectos antioxidantes al mejorar la actividad miocárdica de la SOD y la catalasa y disminuir los niveles de MDA. Además, la nobiletina mejoró la reactividad vascular y los niveles de colágeno en las aortas de las ratas.

La nobiletina ha demostrado tener potentes efectos hipoglucemiantes, antiobesidad e hipolipidémicos al modular varias rutas fisiológicas. Además, actuó como molécula inmunomoduladora, atenuando los marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo, que están relacionados con las diversas complicaciones diabéticas. Estas pruebas refuerzan el potencial terapéutico de la nobiletina para la diabetes en sistemas experimentales in vitro y en modelos animales, que debería verificarse más a fondo en humanos.

## Conclusiones Y Recomendaciones

### Conclusiones

El desarrollo de la presente monografía permitió identificar el potencial de algunos compuestos fitoquímicos presentes en la cascara de *Citrus reticulata* para el control de la glicemia, por lo cual se puede presumir que la cascara de la *Citrus reticulata* Var *Arrayana* cultivada en los llanos orientales también es una fuente potencial de dichos flavonoides.

La revisión de literatura permitió identificar el potencial que tiene la cascara o exocarpio de los frutos cítricos, como fuente de flavonoides cítricos que han demostrado tener efectos benéficos sobre diferentes condiciones médicas como cáncer, diabetes, dislipidemia entre otros.

Los llamados flavonoides cítricos, entre los cuales se pueden citar hesperidina, naringina y las flavonas polimetoxiladas como Nobiletina entre otras, han sido estudiadas en búsqueda de comprobar los efectos benéficos que se han atribuido al consumo de cascara de frutos cítricos en medicina alternativa, obteniéndose resultados prometedores.

Existen una gran variedad de especies del género *Citrus* con características morfológicas y genéticas propias, lo que dificulta la identificación rápida y certera de sus frutos sin el uso de herramientas de análisis avanzadas.

Existen al menos 5 especies comerciales de *Citrus reticulata* que son explotadas a nivel mundial, todas con concentraciones de flavonoides apreciables en sus cascara.

En Colombia, una de las variedades más cultivadas y consumidas es la *Citrus reticulata* Blanco o arrayana, que es cultivada en el piedemonte de los llanos orientales y consumida en la región y alrededores.

Las rutas biosintéticas de los flavonoides son amplias e implican un número importante de etapas enzimáticas que definen la estructura y grupos funcionales presentes en los productos finales.

La biosíntesis de flavonoides se deriva de la ruta de síntesis de los fenilpropanoides, de la cual también se derivan una gran cantidad de rutas de síntesis de otros metabolitos secundarios.

La caracterización de las rutas de biosíntesis de flavonoides ha avanzado en los últimos veinte años, sin embargo, aún faltan por caracterizar un número grande de etapas junto con sus respectivas etapas enzimáticas y códigos genéticos involucrados que permitan obtener un panorama completo de dichas rutas.

En el caso de la síntesis de flavonoides en cítricos, se ha avanzado en el estudio de la biosíntesis de los llamados flavonoides cítricos, sin embargo, aún hay dudas sobre múltiples pasos que dan origen a estos compuestos.

Los flavonoides cítricos han sido investigados con metodologías *in vitro* e *in vivo* para determinar su potencial en el tratamiento de diversas condiciones clínicas tales como diabetes mellitus, dislipidemia, afecciones cardiacas y síndromes metabólicos, mostrando capacidad en la regulación de los niveles de azúcar en la sangre (actividad hipoglucemiante) y de lípidos, inclusive regenerando la actividad regulatoria en células modelo.

Hay pocos estudios sobre el uso individual de alguno de los flavonoides cítricos debido a la dificultad que implica su extracción y purificación, no obstante, se han realizado avances en la identificación de los metabolitos que se generan cuando se consumen y su actividad farmacológica.

El estudio de los flavonoides presentes en matrices naturales como la *Citrus reticulata* implica el esfuerzo de distintas ramas del conocimiento que van desde la biología y las ciencias agronómicas, el empleo de técnicas de química y biología molecular por parte de profesionales químicos, y la aplicación en pruebas *in vivo* e *in vitro* y pruebas clínicas por profesionales de la salud, lo que implica un trabajo multidisciplinar y coordinado entre todos estos profesionales para asegurar el éxito de las investigaciones.

### **Recomendaciones**

El potencial del aprovechamiento de las cascarras de *Citrus reticulata* ha quedado patente en la revisión de literatura realizada, sin embargo, es necesario conocer a fondo las características físicas, químicas y biológicas de las variedades de esta especie cultivadas en Colombia.

Es necesario implementar y desarrollar las metodologías de análisis de flavonoides empleando técnicas de química instrumental como la cromatografía líquida de alta capacidad (HPLC) con el fin de identificar la presencia, así como cuantificar y caracterizar los flavonoides cítricos presentes en las variedades de *Citrus reticulata* cultivadas en Colombia para poder

comparar su potencial como fuente de estos metabolitos secundarios para la industria farmacéutica.

Se recomienda la formulación de proyectos de investigación desde diversas ramas del conocimiento para generar un panorama completo del estado del cultivo de *Citrus reticulata* en el país, así como la presencia de metabolitos secundarios de interés como los identificados en la revisión de literatura realizada (Hesperidina, Naringina y flavonas polimetoxiladas)

## Bibliografía

- Agrawal, Y. O., Sharma, P. K., Shrivastava, B., Ojha, S., Upadhya, H. M., Arya, D. S., & Goyal, S. N. (2014). Hesperidin Produces Cardioprotective Activity via PPAR- $\gamma$  Pathway in Ischemic Heart Disease Model in Diabetic Rats. *PLoS One*, 9(11), e111212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111212>
- Ahmed, O. M., Mahmoud, A. M., Abdel-Moneim, A., & Ashour, M. B. (2012). Antidiabetic effects of hesperidin and naringin in type 2 diabetic rats. *Diabetologia croatica*, 41(2), 53-67.
- Alam, M. A., Subhan, N., Rahman, M. M., Uddin, S. J., Reza, H. M., & Sarker, S. D. (2014). Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Advances in Nutrition*, 5(4), 404-417.
- Altaf, N., Khan, A. R., & Hussain, J. (2008). Fruit variability in Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*). *Pak. J. Bot*, 40(2), 599-604.
- Ancillo, G., & Medina, A. (2014). *Los cítricos*. Universitat de València, Jardí Botànic.
- Arguero Aulestia, E. J. (2018). Propiedades físico-químicas y estabilidad microbiológica de mermeladas de fresa formuladas con polvo de piel mandarina empleado como ingrediente funcional y sostenible.
- Azuma, A., Yakushiji, H., Koshita, Y., & Kobayashi, S. (2012). Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions. *Planta*, 236(4), 1067-1080.
- Babu, P. V. A., Liu, D., & Gilbert, E. R. (2013). Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(11), 1777-1789. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.06.003>
- Bordenave, N., Hamaker, B. R., & Ferruzzi, M. G. (2014). Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods [10.1039/C3FO60263J]. *Food & Function*, 5(1), 18-34. <https://doi.org/10.1039/C3FO60263J>
- Bursać Kovačević, D., Brdar, D., Fabečić, P., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., & Putnik, P. (2020). Chapter 2 - Strategies to achieve a healthy and balanced diet: fruits and vegetables as a natural source of bioactive compounds. In F. J. Barba, P. Putnik, & D. B. Kovačević (Eds.), *Agri-Food Industry Strategies for Healthy Diets and Sustainability* (pp. 51-88). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817226-1.00002-3>
- Butelli, E., Licciardello, C., Zhang, Y., Liu, J., Mackay, S., Bailey, P., Reforgiato-Recupero, G., & Martin, C. (2012). Retrotransposons Control Fruit-Specific, Cold-Dependent Accumulation of Anthocyanins in Blood Oranges *The Plant Cell*, 24(3), 1242-1255. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.095232>
- Cao, H., Pauff, J. M., & Hille, R. (2014). X-ray crystal structure of a xanthine oxidase complex with the flavonoid inhibitor quercetin. *Journal of natural products*, 77(7), 1693-1699.
- Chiu, S.-P., Wu, M.-J., Chen, P.-Y., Ho, Y.-R., Tai, M.-H., Ho, C.-T., & Yen, J.-H. (2013). Neurotrophic Action of 5-Hydroxylated Polymethoxyflavones: 5-Demethylnobiletin and Gardenin A Stimulate Neuritogenesis in PC12 Cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(39), 9453-9463. <https://doi.org/10.1021/jf4024678>

- Cirmi, S., Ferlazzo, N., Lombardo, G. E., Maugeri, A., Calapai, G., Gangemi, S., & Navarra, M. (2016). Chemopreventive agents and inhibitors of cancer hallmarks: may citrus offer new perspectives? *Nutrients*, *8*(11), 698.
- Colodel, C., Vriesmann, L. C., Teófilo, R. F., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2018). Extraction of pectin from ponkan (*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan) peel: Optimization and structural characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, *117*, 385-391.
- Curk, F., Ancillo, G., Garcia-Lor, A., Luro, F., Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.-P., Navarro, L., & Ollitrault, P. (2014). Next generation haplotyping to decipher nuclear genomic interspecific admixture in Citrus species: analysis of chromosome 2. *BMC genetics*, *15*(1), 1-19.
- Dallas, C., Gerbi, A., Elbez, Y., Caillard, P., Zamaria, N., & Cloarec, M. (2014). Clinical study to assess the efficacy and safety of a citrus polyphenolic extract of red orange, grapefruit, and orange (Sinetrol-XPur) on weight management and metabolic parameters in healthy overweight individuals. *Phytotherapy Research*, *28*(2), 212-218.
- Darjazi, B. B. (2011). The effects of rootstock on the volatile flavor components of page mandarin [(*Citrus reticulata* var dancyx *Citrus paradisi* var dancan) × *Citrus clemantina*] flower and leaf. *African Journal of Agricultural Research*, *6*(7), 1884-1896.
- Demonty, I., Lin, Y., Zebregs, Y. E., Vermeer, M. A., van der Knaap, H. C., Jäkel, M., & Trautwein, E. A. (2010). The citrus flavonoids hesperidin and naringin do not affect serum cholesterol in moderately hypercholesterolemic men and women. *The journal of nutrition*, *140*(9), 1615-1620.
- Devi, K. P., Rajavel, T., Nabavi, S. F., Setzer, W. N., Ahmadi, A., Mansouri, K., & Nabavi, S. M. (2015). Hesperidin: A promising anticancer agent from nature. *Industrial crops and products*, *76*, 582-589.
- Devkota, H. P., Adhikari-Devkota, A., Dirar, A. I., & Belwal, T. (2021). Chapter 3.1.14 - Nobiletin. In T. Belwal, S. M. Nabavi, S. F. Nabavi, A. R. Dehpour, & S. Shirooie (Eds.), *Naturally Occurring Chemicals Against Alzheimer's Disease* (pp. 185-196). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819212-2.00016-5>
- Dokumacioglu, E., Iskender, H., Sen, T., Ince, I., Dokumacioglu, A., Kanbay, Y., Erbas, E., & Saral, S. (2018). The effects of hesperidin and quercetin on serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 levels in streptozotocin-induced diabetes model [Original Article]. *Pharmacognosy Magazine*, *14*(54), 167-173. [https://doi.org/10.4103/pm.pm\\_41\\_17](https://doi.org/10.4103/pm.pm_41_17)
- Dorji, K., & Yapwattanaphun, C. (2011). Morphological identification of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) in Bhutan. *Agriculture and Natural Resources*, *45*(5), 793-802.
- Duarte, A., Fernandes, M. J., Bernardes, J. P., & Miguel, M. G. (2016). Citrus as a component of the Mediterranean diet. *Journal of Spatial and Organizational Dynamics*, *4*(IV), 289-304.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, *3*, 222.
- Fürtauer, L., Weiszmann, J., Weckwerth, W., & Nägele, T. (2019). Dynamics of plant metabolism during cold acclimation. *International journal of molecular sciences*, *20*(21), 5411.
- Gal-Ben-Ari, S., Barrera, I., Ehrlich, M., & Rosenblum, K. (January 09, 2019). PKR: A Kinase to Remember. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*.

- Gao, Z., Gao, W., Zeng, S.-L., Li, P., & Liu, E.-H. (2018). Chemical structures, bioactivities and molecular mechanisms of citrus polymethoxyflavones. *Journal of Functional Foods*, 40, 498-509.
- Ghavipour, M., Saedisomeolia, A., Djalali, M., Sotoudeh, G., Eshraghyan, M. R., Moghadam, A. M., & Wood, L. G. (2013). Tomato juice consumption reduces systemic inflammation in overweight and obese females. *British Journal of Nutrition*, 109(11), 2031-2035. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004278>
- Garcia Lor, Andres; Navarro Lucxas, Luis; Ollitraul, Patrick. (Julio de 2013). Tesis Doctoral, Organizacion de la diversidad genetica de los citricos. *UNIVERSITAT POLITECNICA DE VALENCIA*, 280. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/31518/Versi%C3%B3n3.Tesis%20Andr%C3%A9s%20Garc%C3%ADa-Lor.pdf>
- Han, Z., Zhang, J., Cai, S., Chen, X., Quan, X., & Zhang, G. (2018). Association mapping for total polyphenol content, total flavonoid content and antioxidant activity in barley. *BMC genomics*, 19(1), 1-10.
- Harborne, J. B. (2013). The flavonoids: advances in research since 1980.
- Harborne, J. B., Marby, H., & Marby, T. (2013). *The flavonoids*. Springer.
- Helber Enrique, B.-L., & Edgar Alfonso, P.-O. (2018). Comportamiento poscosecha de frutos de mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) var. Arrayana: efecto de diferentes tratamientos térmicos. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(2), 369-378.
- Huang, H., Li, L., Shi, W., Liu, H., Yang, J., Yuan, X., & Wu, L. (2016). The multifunctional effects of nobiletin and its metabolites in vivo and in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- Jaganath, I. B., & Crozier, A. (2011). Flavonoid biosynthesis. *Plant metabolism and biotechnology*, 293-320.
- Kakadiya, J., Mulani, H., & Shah, N. (2010). Protective effect of hesperidin on cardiovascular complication in experimentally induced myocardial infarction in diabetes in rats. *Journal of basic and clinical pharmacy*, 1, 85-91.
- Kanda, K., Nishi, K., Kadota, A., Nishimoto, S., Liu, M.-C., & Sugahara, T. (2012). Nobiletin suppresses adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by an insulin and IBMX mixture induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(4), 461-468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.11.015>
- Kawahata, I., Yoshida, M., Sun, W., Nakajima, A., Lai, Y., Osaka, N., Matsuzaki, K., Yokosuka, A., Mimaki, Y., & Naganuma, A. (2013). Potent activity of nobiletin-rich *Citrus reticulata* peel extract to facilitate cAMP/PKA/ERK/CREB signaling associated with learning and memory in cultured hippocampal neurons: identification of the substances responsible for the pharmacological action. *Journal of neural transmission*, 120(10), 1397-1409.
- Khan, M. K., Zill, E. H., & Dangles, O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 85-104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.004>
- Kikuchi, T., Ueno, Y., Hamada, Y., Furukawa, C., Fujimoto, T., Yamada, T., & Tanaka, R. (2017). Five new Limonoids from peels of Satsuma Orange (*Citrus reticulata*). *Molecules*, 22(6), 907.

- Koopman, F., Beekwilder, J., Crimi, B., van Houwelingen, A., Hall, R. D., Bosch, D., van Maris, A. J., Pronk, J. T., & Daran, J.-M. (2012). De novo production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial cell factories*, *11*(1), 1-15.
- Kundu, D., Das, M., Mahle, R., Biswas, P., Karmakar, S., & Banerjee, R. (2020). Chapter 7 - Citrus fruits. In C. M. Galanakis (Ed.), *Valorization of Fruit Processing By-products* (pp. 145-166). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817106-6.00007-1>
- Lee, Y.-S., Cha, B.-Y., Choi, S.-S., Choi, B.-K., Yonezawa, T., Teruya, T., Nagai, K., & Woo, J.-T. (2013). Nobiletin improves obesity and insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*(1), 156-162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.014>
- Lin, J.-K., & Weng, M.-S. (2006). Flavonoids as Nutraceuticals. In E. Grotewold (Ed.), *The Science of Flavonoids* (pp. 213-238). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2_8)
- Liu, X., Lin, C., Ma, X., Tan, Y., Wang, J., & Zeng, M. (2018). Functional characterization of a flavonoid glycosyltransferase in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Frontiers in plant science*, *9*, 166.
- Lo Piero, A. R. (2015). The State of the Art in Biosynthesis of Anthocyanins and Its Regulation in Pigmented Sweet Oranges [(*Citrus sinensis*) L. Osbeck]. *Journal of agricultural and food chemistry*, *63*(16), 4031-4041. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01123>
- Mahmoud, A. M., Ahmed, O. M., Ashour, M. B., & Abdel-Moneim, A. (2015). In vivo and in vitro antidiabetic effects of citrus flavonoids; a study on the mechanism of action. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, *35*(3), 250-263. <https://doi.org/10.1007/s13410-014-0268-x>
- Mahmoud, A. M., Ashour, M. B., Abdel-Moneim, A., & Ahmed, O. M. (2012). Hesperidin and naringin attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress and proinflammatory cytokine production in high fat fed/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Journal of Diabetes and its Complications*, *26*(6), 483-490. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2012.06.001>
- Malakul, W., Pengnet, S., Kumchoom, C., & Tunsophon, S. (2018). Naringin ameliorates endothelial dysfunction in fructose-fed rats. *Exp Ther Med*, *15*(3), 3140-3146. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5759>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Mulvihill, E. E., Assini, J. M., Lee, J. K., Allister, E. M., Sutherland, B. G., Koppes, J. B., Sawyez, C. G., Edwards, J. Y., Telford, D. E., Charbonneau, A., St-Pierre, P., Marette, A., & Huff, M. W. (2011). Nobiletin Attenuates VLDL Overproduction, Dyslipidemia, and Atherosclerosis in Mice With Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes*, *60*(5), 1446-1457. <https://doi.org/10.2337/db10-0589>
- Murillo Sevillano, I. (2018). Diabetes mellitus. Algunas consideraciones necesarias. *MediSur*, *16*(4), 614-617.

- Nabavi, S. M., Šamec, D., Tomczyk, M., Milella, L., Russo, D., Habtemariam, S., Suntar, I., Rastrelli, L., Daglia, M., & Xiao, J. (2020). Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnology advances*, 38, 107316.
- Najmanová, I., Vopršalová, M., Saso, L., & Mladěnka, P. (2020). The pharmacokinetics of flavanones. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(18), 3155-3171.
- Nandakumar, N., Jayaprakash, R., Rengarajan, T., Ramesh, V., & Balasubramanian, M. P. (2011). Hesperidin, a natural citrus flavonoglycoside, normalizes lipid peroxidation and membrane bound marker enzymes in 7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene induced experimental breast cancer rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 1(4), 255-262. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bionut.2011.06.004>
- Nohara, K., Nemkov, T., D'Alessandro, A., Yoo, S.-H., & Chen, Z. (2019). Coordinate Regulation of Cholesterol and Bile Acid Metabolism by the Clock Modifier Nobiletin in Metabolically Challenged Old Mice. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4281. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/17/4281>
- Ogo, Y., Ozawa, K., Ishimaru, T., Murayama, T., & Takaiwa, F. (2013). Transgenic rice seed synthesizing diverse flavonoids at high levels: a new platform for flavonoid production with associated health benefits. *Plant Biotechnology Journal*, 11(6), 734-746.
- Olivas-Aguirre, F. J., Rodrigo-García, J., Martínez-Ruiz, N. d. R., Cárdenas-Robles, A. I., Mendoza-Díaz, S. O., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G. A., De la Rosa, L. A., Ramos-Jiménez, A., & Wall-Medrano, A. (2016). Cyanidin-3-O-glucoside: Physical-chemistry, foodomics and health effects. *Molecules*, 21(9), 1264.
- Onda, K., Horike, N., Suzuki, T.-i., & Hirano, T. (2013). Polymethoxyflavonoids Tangeretin and Nobiletin Increase Glucose Uptake in Murine Adipocytes. *Phytotherapy Research*, 27(2), 312-316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ptr.4730>
- Orduz-Rodríguez, J. O., Monroy, H., Fischer, G., & Herrera A, A. (2011). Crecimiento y desarrollo del fruto de mandarina (*Citrus reticulata*) Arrayana en condiciones del piedemonte del Meta, Colombia. *Rev. Colomb. Cienc. Hort. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 3(2), 149-160.
- Orduz-Rodríguez, J. O., Monroy, H. J., & Fischer, G. (2010). Comportamiento fenológico de la mandarina 'Arrayana' en el piedemonte del Meta, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 28(1), 63-70. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/17595>
- Oueslati, A., Salhi-Hannachi, A., Luro, F., Vignes, H., Mournet, P., & Ollitrault, P. (2017). Genotyping by sequencing reveals the interspecific *C. maxima*/*C. reticulata* admixture along the genomes of modern citrus varieties of mandarins, tangors, tangelos, orangelos and grapefruits. *PLoS One*, 12(10), e0185618.
- Owens, D. K., & McIntosh, C. A. (2011). Biosynthesis and function of citrus glycosylated flavonoids. In *The biological activity of phytochemicals* (pp. 67-95). Springer.
- Pandey, P., Mersha, M. D., & Dhillon, H. S. (2013). A synergistic approach towards understanding the functional significance of dopamine receptor interactions. *J Mol Signal*, 8(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-8-13>
- Park, H.-J., Jung, U. J., Cho, S.-J., Jung, H.-K., Shim, S., & Choi, M.-S. (2013). Citrus unshiu peel extract ameliorates hyperglycemia and hepatic steatosis by altering inflammation and hepatic glucose- and lipid-regulating enzymes in db/db mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(2), 419-427. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.12.009>

- Parkar, N. A., Bhatt, L. K., & Addepalli, V. (2016). Efficacy of nobiletin, a citrus flavonoid, in the treatment of the cardiovascular dysfunction of diabetes in rats [10.1039/C6FO00294C]. *Food & Function*, 7(7), 3121-3129. <https://doi.org/10.1039/C6FO00294C>
- Pollastri, S., & Tattini, M. (2011). Flavonols: old compounds for old roles. *Annals of Botany*, 108(7), 1225-1233.
- Qian, Y., Babu, P., Symons, J., & Jalili, T. (2017). Metabolites of flavonoid compounds preserve indices of endothelial cell nitric oxide bioavailability under glucotoxic conditions. *Nutrition & diabetes*, 7(9), e286-e286.
- Quiroga-Cardona, J., Hernández-Parrado, F. L., del Rosario Silva-Herrera, M., & Rodríguez, J. O. O. (2010). Comportamiento de la producción de lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka), injertada sobre el patrón de mandarina Cleopatra (*Citrus reticulata* Blanco) y la influencia del virus de la tristeza (CTV) en condiciones del piedemonte del Meta, 1997-2008. *Orinoquia*, 14(1), 5-15.
- Raut, N. A., Dhore, P. W., Saoji, S. D., & Kokare, D. M. (2016). Chapter 9 - Selected Bioactive Natural Products for Diabetes Mellitus. In R. Atta ur (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 48, pp. 287-322). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63602-7.00009-6>
- Roohbakhsh, A., Parhiz, H., Soltani, F., Rezaee, R., & Iranshahi, M. (2015). Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Sciences*, 124, 64-74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.030>
- Roowi, S., & Crozier, A. (2011). Flavonoids in tropical citrus species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(22), 12217-12225.
- Salma., E.-M., Heba., A., Siham., E.-S., Aiman., E.-K., Osama., E.-S., & Sanaa., K. (2014). Anti-depressant effect of hesperidin in diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 92(11), 945-952. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0281> %M 25358020
- Schwartz, T., Nylander, S., Ramadugu, C., Antonelli, A., & Pfeil, B. E. (2016). The origin of oranges: a multi-locus phylogeny of Rutaceae subfamily Aurantioideae. *Systematic Botany*, 40(4), 1053-1062.
- Selvaraj, S., Krishnaswamy, S., Devashya, V., Sethuraman, S., & Krishnan, U. M. (2014). Flavonoid–Metal Ion Complexes: A Novel Class of Therapeutic Agents. *Medicinal Research Reviews*, 34(4), 677-702. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/med.21301>
- Seoka, M., Ma, G., Zhang, L., Yahata, M., Yamawaki, K., Kan, T., & Kato, M. (2020). Expression and functional analysis of the nobiletin biosynthesis-related gene CitOMT in citrus fruit. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.
- Shah, A., Stotland, N. E., Cheng, Y. W., Ramos, G. A., & Caughey, A. B. (2011). The association between body mass index and gestational diabetes mellitus varies by race/ethnicity. *American journal of perinatology*, 28(7), 515.
- Sharma, K., Mahato, N., & Lee, Y. R. (2019). Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Reviews in Chemical Engineering*, 35(2), 265-284.
- Shin, K.-C., Nam, H.-K., & Oh, D.-K. (2013). Hydrolysis of flavanone glycosides by  $\beta$ -glucosidase from *Pyrococcus furiosus* and its application to the production of flavanone aglycones from citrus extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(47), 11532-11540.

- Stobiecki, M., & Kachlicki, P. (2006). Isolation and Identification of Flavonoids. In E. Grotewold (Ed.), *The Science of Flavonoids* (pp. 47-69). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2_2)
- Tohge, T., de Souza, L. P., & Fernie, A. R. (2017). Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants. *Journal of Experimental Botany*, *68*(15), 4013-4028. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx177>
- Tundis, R., Acquaviva, R., Bonesi, M., Malfa, G. A., Tomasello, B., & Loizzo, M. R. (2019). Citrus flavanones. *Handbook of Dietary Phytochemicals*, 1-30.
- Usman, M., & Fatima, B. (2018). Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) breeding. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits* (pp. 465-533). Springer.
- Velasco, R., & Licciardello, C. (2014). A genealogy of the citrus family. *Nature biotechnology*, *32*(7), 640-642.
- Viswanatha, G. L., Shylaja, H., & Moolemath, Y. (2017). The beneficial role of Naringin- a citrus bioflavonoid, against oxidative stress-induced neurobehavioral disorders and cognitive dysfunction in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *94*, 909-929. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.072>
- Wang, F., Chen, L., Chen, H., Chen, S., & Liu, Y. (2019). Analysis of flavonoid metabolites in citrus peels (*Citrus reticulata* "Dahongpao") using UPLC-ESI-MS/MS. *Molecules*, *24*(15), 2680.
- Wang, S., Tu, H., Wan, J., Chen, W., Liu, X., Luo, J., Xu, J., & Zhang, H. (2016). Spatio-temporal distribution and natural variation of metabolites in citrus fruits. *Food Chemistry*, *199*, 8-17.
- Wang, S., Yang, C., Tu, H., Zhou, J., Liu, X., Cheng, Y., Luo, J., Deng, X., Zhang, H., & Xu, J. (2017). Characterization and Metabolic Diversity of Flavonoids in Citrus Species. *Scientific Reports*, *7*(1), 10549. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10970-2>
- Wang, Y., Xie, J., Ai, Z., & Su, J. (2019). Nobiletin-loaded micelles reduce ovariectomy-induced bone loss by suppressing osteoclastogenesis. *International journal of nanomedicine*, *14*, 7839.
- Wang, Z.-L., Wang, S., Kuang, Y., Hu, Z.-M., Qiao, X., & Ye, M. (2018). A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*. *Pharmaceutical biology*, *56*(1), 465-484.
- WHO. (2016). *Global report on diabetes* (9789241565257 924156525X). [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf)
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (2004). Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes Care*, *27*(5), 1047. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.5.1047>
- Winkel, B. S. J. (2006). The Biosynthesis of Flavonoids. In E. Grotewold (Ed.), *The Science of Flavonoids* (pp. 71-95). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2_3)
- Wu, C., Han, L., Riaz, H., Wang, S., Cai, K., & Yang, L. (2013). The chemopreventive effect of  $\beta$ -cryptoxanthin from mandarin on human stomach cells (BGC-823). *Food Chemistry*, *136*(3), 1122-1129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.073>
- Wu, G. A., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., Perrier, X., Ruiz, M., Scalabrin, S., & Terol, J. (2014). Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange

- genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature biotechnology*, 32(7), 656-662.
- Wu, G. A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., Domingo, C., Tadeo, F. R., Carbonell-Caballero, J., Alonso, R., Curk, F., Du, D., Ollitrault, P., Roose, M. L., Dopazo, J., Gmitter, F. G., Rokhsar, D. S., & Talon, M. (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*, 554(7692), 311-316. <https://doi.org/10.1038/nature25447>
- Yuan, Y., Chunxian, C., Ming, H., Qibin, Y., Dongliang, D., Matthew, R., & Frederick, G. (2018). *Genetic Diversity and Population Structure Analysis of Citrus Germplasm with Single Nucleotide Polymorphism Markers*. doi:<https://doi.org/10.21273/JASHS04394-18>
- Zareei, S., Boojar, M. M. A., & Amanlou, M. (2017). Inhibition of liver alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase by hesperidin and its aglycone hesperetin: An in vitro and in silico study. *Life Sciences*, 178, 49-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.04.001>
- Zhang, B., & Schrader, A. (2017). TRANSPARENT TESTA GLABRA 1-dependent regulation of flavonoid biosynthesis. *Plants*, 6(4), 65.
- Zhang, Y., Sun, Y., Xi, W., Shen, Y., Qiao, L., Zhong, L., Ye, X., & Zhou, Z. (2014). Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chemistry*, 145, 674-680.
- Zhao, J., Lv, G.-P., Chen, Y.-W., & Li, S.-P. (2011). Advanced development in analysis of phytochemicals from medicine and food dual purposes plants used in China. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7453-7475. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.041>
- Zhen, J., Dai, Y., Villani, T., Giurleo, D., Simon, J. E., & Wu, Q. (2017). Synthesis of novel flavonoid alkaloids as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(20), 5355-5364.