

EXTRACCIÓN DINÁMICA DE CITROFLAVONOIDES A PARTIR DE RESIDUALES CUBANOS DE *CITRUS LIMÓN* VAR. CRIOLLO

Malvis Robaina–Mesa,¹ Zalua Rodríguez–Riera,¹ Jorge E. Rodríguez-Chanfrau.^{2*}

¹ Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas (INSTEC). La Habana. Cuba

² Facultad de Química. Universidad de la Habana. La Habana. Cuba.

*email: jerodriguez354@gmail.com

Resumen

La industria cítrica genera gran cantidad de desechos sólidos ricos en flavonoides, vitaminas, pectinas y celulosa. Los principales flavonoides presentes en *Citrus limón* var. Criollo son hesperidina, diosmina, naringenina y eriocitrina. El objetivo de este trabajo fue evaluar un proceso de extracción dinámica de citroflavonoides a partir de residuales de esta fruta. Se evaluaron dos variantes de extracción por reflujo, determinándose el contenido de flavonoides totales y ácido ascórbicos extraídos. Los resultados mostraron que la variante en la cual se usó solución de hidróxido de calcio al 10 % como medio de disolución es la más adecuada para la extracción de citroflavonoides en las condiciones estudiadas. La presencia de ácido ascórbico en el extracto contribuye a incrementar las potencialidades antioxidantes y la calidad del mismo.

Palabras clave: Citroflavonoides, ácido ascórbico, *Citrus limón* var. Criollo, reflujo, sólidos totales.

Citroflavonoids dynamic extraction from cuban residual solid of *citrus limón* var. Criollo

Abstract

The citrus industry generates a large amount of residual solids rich in flavonoids, vitamins, pectin and cellulose. The main flavonoids in *Citrus limón* var. Criollo are hesperidin, diosmin, naringenin and eriocitrin. The aim of this work was to study a dynamic extraction process of citroflavonoids from residual solids of this fruit. Two variants of reflux extraction were evaluated. Total flavonoid and ascorbic acid content were determined. The results showed that the variant in which calcium hydroxide solution was used as dissolution medium is most suitable for citroflavonoids extraction under the condition studied. The presence of amounts of ascorbic acid contributes to increase the antioxidant potential and extract quality.

Keywords: Citroflavonoids, ascorbic acid, *Citrus limón* var. Criollo, reflux, total solids.

Introducción

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se encuentran presentes en flores, hojas, frutos y cortezas y en la mayoría de los casos son los responsables de la coloración que presentan estas estructuras. Todos ellos son compuestos polifenólicos con un origen biosintético común y derivado, de la misma estructura química, el esqueleto benzopiránico.¹ Las principales fuentes de estos compuestos son las frutas y vegetales, siendo la ingesta diaria en el hombre entre 10 y 100 mg diarios, en dependencia de las costumbres alimenticias y la zona geográfica. En 1936, Ruszniak y Szent-Gyorgi expusieron los beneficios de estos sobre la normalización de la permeabilidad vascular alterada, así como su actuación sinérgica con la vitamina C (ácido ascórbico).² A partir de la década de los 80 del siglo pasado, se comenzaron a emplear algunas sustancias semisintéticas obtenidas a partir de flavonoides extraídos de la corteza y el hollejo de los cítricos, con pequeñas modificaciones en su estructura o en su forma farmacéutica para mejorar su biodisponibilidad en el tratamiento de insuficiencia venosa causante de varices, hemorroides y otras patologías vasculares.¹ En la actualidad los flavonoides se emplean en la terapéutica de dos formas; como ingrediente activo aislado y modificado o como drogas en cápsulas, tabletas o infusiones.

Citrus limón var. Criollo es el fruto del limonero, árbol de hoja perenne y espinoso de la familia de las Rutáceas. Es rica en vitaminas, ácidos orgánicos, pectina y flavonoides fundamentalmente hesperidina, diosmina, naringenina, eriocitrina. El procesamiento industrial de frutos de cítricos genera una gran cantidad de desechos sólidos, formado fundamentalmente por cáscaras y bagazo de las diferentes frutas utilizadas para la elaboración de jugos y néctares.^{3,4} Estando presentes en los mismos la mayor cantidad de flavonoides con que cuenta la fruta.⁴

Estudios reportados por Robaina y col.⁵ referente al proceso de extracción mediante maceración demostraron la presencia de flavonoides totales y ácido ascórbicos en residuales citrícolas del *Citrus limón* var. Criollo. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar un proceso de extracción dinámica de citroflavonoides a partir de residuales de esta fruta.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se utilizaron cáscara y hollejos de frutos maduros de la variedad de limón criollo (*Citrus limón* var. Criollo), colectadas en la Estación Experimental de Plantas Medicinales Dr. Juan Tomás Roig, en la provincia de Artemisa, Cuba. La identificación de la especie fue realizada por el Dr. Víctor Fuente. Una muestra de la especie fue depositada en el herbario de la propia estación experimental (ROIG 4782). Las cáscaras y hollejos fueron lavadas con abundante agua y desinfestadas con solución de

hipoclorito de sodio al 2 % durante 15 minutos. Se dejaron escurrir al aire y se molieron en molino de cuchilla (CEMOTEC, Suecia) recogiendo la masa y el líquido en un recipiente tarado.

Preparación de los extractos

La pulpa de masa molida se trasvasó a un reactor de vidrio de 1 L de capacidad, provisto de un agitador de propela marina y un sistema de calentamiento. Se estudiaron dos variantes de extracción. La variante 1 consistió en una extracción acuosa con posterior basificación del medio y la variante 2 consistió en una extracción en solución de hidróxido de calcio al 10 % (figura 1). La filtración se realizó al vacío empleando un embudo Buchner de porcelana, con área de filtración de $1,06 \times 10^{-2} \text{ m}^2$, medio filtrante lona (algodón XX, 2 mm) (Filtronic, Brasil) y presión constante ($9,99 \times 10^4 \text{ kg/m.s}^2$).

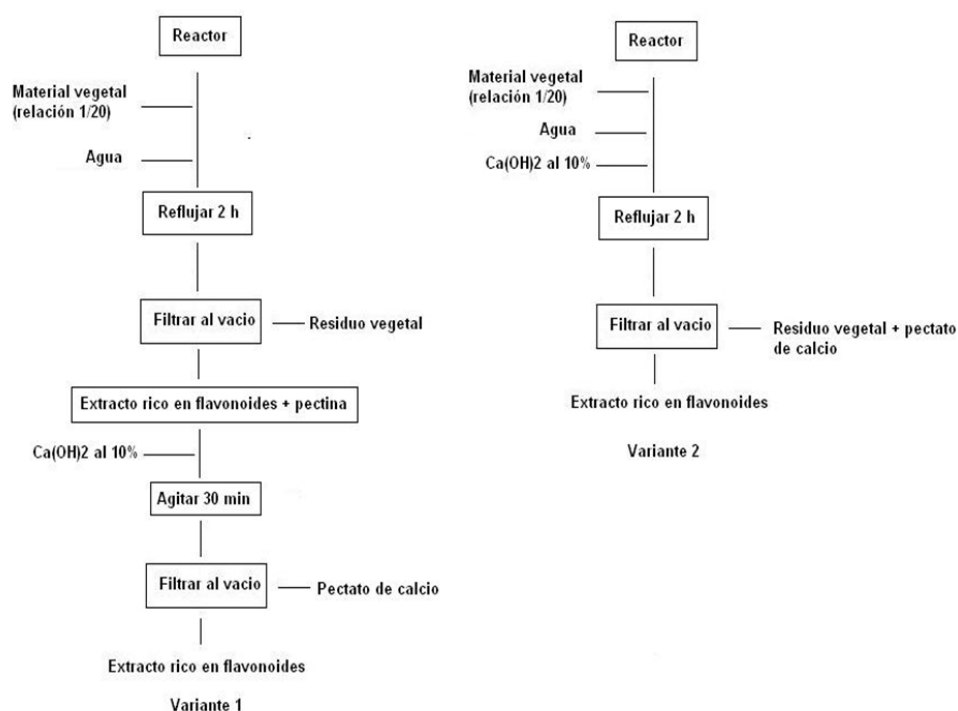


Figura 1. Variantes tecnológicas estudiadas

Métodos de ensayos

Las determinaciones del contenido de flavonoides totales se realizaron aplicando la metodología descrita por Robaina y col.⁵ Se midieron las absorbancias del estándar y de las muestras en un

espectrofotómetro UV-Vis (Rayleigh UV-2601, China), a una longitud de onda máxima de 285 nm, utilizando agua como blanco. Los resultados obtenidos se reportan como mg por cada 100 mL.

Las determinaciones del contenido de ácido ascórbico se realizaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (KNAUER, Alemania) aplicando la metodología descrita por Robaina y col.⁵ Se emplearon para ello las siguientes condiciones experimentales: Precolumna Aluspher® 100 (RP-select B 5mm) con Columna Lichrospher® 100, RP 18 (25 cm de longitud y 4 mm de diámetro y 5 micras), utilizándose como fase móvil una solución de heptanosulfonato de sodio en agua (pH = 3,5) y detector UV a una longitud de onda de 280 nm. El flujo de la fase móvil fue de 0,5 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 µL. Como estándar de referencia se utilizó ácido ascórbico pa. (Merck). Se preparó una curva de calibración con concentraciones que oscilaban entre 100 y 1000 µg/100 mL. Los resultados obtenidos se reportan como µg por cada 100 mL.

Las determinaciones de sólidos totales y pH se realizaron según lo establecido por la Farmacopea Brasileña.⁶ Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Análisis Estadístico

La comparación de los lotes fue realizada mediante un análisis de varianza (ANOVA) para conocer si existían diferencias significativas entre los mismos. Los resultados fueron considerados significativos para $p < 0,05$.

Resultados

Al culminar cada proceso se obtuvo una solución transparente de color amarillo naranja. La tabla I muestra los resultados de la determinación del pH, contenido de flavonoides totales, ácido ascórbico y sólidos totales en los extractos obtenidos por ambas variantes.

Tabla 1. Resultados del análisis de los extractos obtenidos en cada variante

Variante	1	2	p
pH	11,0	11,9	0,138
Sólidos totales (%)	0,62 / 0,04 ^a	0,95 / 0,02 ^b	0,014
Flavonoides totales (mg/ 100 mL)	0,39 / 0,07 ^a	0,54 / 0,04 ^b	0,047
Ácido ascórbico (µg/ 100 mL)	60,2 / 0,08 ^a	46,9 / 0,70 ^b	0,032

Nota: Letras desiguales difieren significativamente para $p < 0,05$.

El análisis estadístico mostró que para el caso del pH no existen diferencias significativas entre los extractos. No observándose lo mismo para el caso de los otros tres componentes evaluados, donde se observa que existe diferencias significativas entre las variantes estudiadas. En el caso de flavonoides totales se observa que en el extracto obtenido aplicando la variante 2, los contenidos extraídos son ligeramente superior a los extraídos al aplicarse la variante 1. De manera general, en las condiciones de trabajo empleadas en la variante 1 se extraen alrededor de 7,65 mg/ 100 g de material vegetal fresco, mientras que en la variante 2 se extraen alrededor de 10,72 mg/ 100 g de material vegetal fresco.

Al analizar los resultados de ácido ascórbico se observan diferencias significativas entre las variantes estudiadas, siendo ligeramente superior la concentración extraída al aplicarse la variante 1. De manera general, en las condiciones de trabajo empleadas en la variante 1 se extraen alrededor de 1,18 g/ 100 g de material vegetal fresco, mientras que en la variante 2 se extraen alrededor de 0,93 g/ 100 g de material vegetal fresco.

Un análisis del contenido de los sólidos totales en los extractos mostró diferencias significativas entre los procesos estudiados, siendo superiores en la variante 2.

Discusión

La extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material fresco o incluso seco, siempre y cuando no se altere su composición. Los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, son considerados polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetona, dimetilsulfoxido o agua. Los glicósidos aumentan su solubilidad en agua y en soluciones hidroalcohólica. Sin embargo, se conoce que en el caso de flavonoides del tipo flavanona, como son la hesperidina y la diosmina, la solubilidad de las mismas en agua depende del pH. Por otro lado, se conoce que los flavonoides mayoritarios en el limón son la rutina, hesperidina y la diosmina, estos dos últimos dependientes del pH del medio para su solubilización.⁷

En este estudio los mejores resultados se alcanzaron en la variante en la cual se utilizó la extracción en medio alcalino, lo que se consideran lógicos si se tiene en cuenta que en la literatura se ha descrito que una de las vías más efectivas para la extracción de hesperidina y diosmina de la cáscara de los cítricos, es mediante la extracción alcalina, con posterior precipitación y recristalización de estos dos componentes en medio ácido.⁸

Gerard y col.⁹ reportaron que pH entre 8,5 y 12 garantizan la solubilidad de los flavonoides en forma de aglicona, incrementándose los rendimientos de extracción de estos metabolitos a medida que se

incrementa el pH. Por otro lado, la extracción en estas condiciones evita la presencia de otros componentes presentes en el material vegetal tales como pectinas y proteínas, las cuales precipitan durante la extracción, siendo separadas con el material residual a la hora de realizar la separación por filtración del extracto obtenido.

El empleo de temperatura favorece el proceso debido a que ayuda en la extracción de pectina en agua, la cual al ser extraída debilita la pared celular. Esto facilita la extracción de los flavonoides de interés y por ende el incremento de los rendimientos de extracción.^{10, 11}

Contrario a los flavonoides antes mencionados, el ácido ascórbico, es una vitamina hidrosoluble que se afecta con facilidad por factores tales como la humedad, la luz, el aire, el calor, los iones metálicos como hierro y cobre, el oxígeno y el medio alcalino. Esto provoca la degradación de esta vitamina a diferentes compuestos como el ácido oxálico, ácido L-treónico, ácido L-xilónico, ácido L-lixónico y ácido dehidroascórbico, y a su vez este último se transforma irreversiblemente en ácido 2,3 diceto-L glucónico, el cual constituye su principal producto de degradación.¹²

Químicamente en medio básico ocurre la formación de ascorbato de calcio, el cual es soluble en agua a pH entre 6,8 y 7,4; mientras que a pH superiores su solubilidad disminuye. Por otro lado, la temperatura degrada al ácido ascórbico. Esto puede explicar los resultados alcanzados en este estudio, donde en la variante en la cual se realizó la extracción en medio básico, se encontró una concentración menor de este componente.

De manera general la presencia en el extracto de ambos componentes es beneficioso. Se conoce que los mismos tienen un efecto sinérgico, donde el ácido ascórbico reduce la oxidación de los flavonoides, permitiéndole mantener sus funciones antioxidantes y a la vez, los flavonoides evitan el proceso de oxidación de la vitamina.¹³

El objetivo principal del trabajo era establecer una metodología a escala de laboratorio la cual permitiera extraer los citroflavonoides a partir de residuales citrícolas, en este caso limón, que permita en trabajos posteriores optimizar y escalar el mismo. La presencia de ácido ascórbico garantizaría que el extracto obtenido tenga una calidad superior.

La variante que mejores resultados mostró para la extracción de citroflavonoides en condiciones de reflujo fue la realizada en medio alcalino. En estas condiciones se garantiza además, la presencia de cantidades de ácido ascórbico, el cual contribuye a incrementar las potencialidades antioxidantes y la calidad del extracto.

Referencias

1. Zaragozña García F, Tofiño González MA, Oliveira Santamaría L. Flavonoides y fitoterapia. Revista de Fitoterapia. 2002; 2(1): 21-32.
2. Bruneton J. Flavonoides. En: Farmacognosia. Fitoquímica plantas medicinales. 2ª edición. España: Acribia S A. 2001; p. 305-345.
3. Marín FR, Soler Rivas C, Benavente García O, Castillo J, Pérez Alvarez JA. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. Food Chemistry. 2007; 100(2):736-741.
4. Pérez Nájera VC, Lugo Cervantes EC, Gutiérrez Lomelí M, del Toro Sánchez CL. Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*citrus limetta* risso) y determinación de su actividad antioxidante. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. 2013; 15(3):18-22.
5. Robaina Mesa M, Rodríguez Riera Z, Rodríguez Chanfrau JE. Maceración de residuales de *Citrus limón* var. Criollo. Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias. 2016 (en prensa).
6. Farmacopeia Brasileira. 5 ed. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz; 2010:91-121.
7. Natarajan N, Thamaraiselvan R, Lingaiah H, Srinivasan P, Periyasamy BM. Effect of flavonone hesperidin on the apoptosis of human mammary carcinoma cell line MCF-7. Biomedicine & Preventive Nutrition. 2011; 1:207–15.
8. Zubrick J W. Isolation and characterization of hesperidin from orange peel. The organic Chem Lab Survival Manual, 4ta ed. New York: Wiley & Sons Inc. 1997; p. 147-164.
9. Gerard Wallace R, Gerald Burong W. Extraction of flavonoids. US 7507423 B2. PCT/AU2001/000016. 2009.
10. Li B, Smith B, Hossain M. Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. Separation and Purification Technology. 2006; 48:182–188.
11. Sun J, Chu YF, Wu XZ, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits, J. Agric. Food Chem. 2002; 50:7449-7454.
12. Yang JH, Lee SY, Han YS, Park KC, Choy JH. Efficient Transdermal Penetration and Improved Stability of L-Ascorbic Acid Encapsulated in an Inorganic Nanocapsule. Bull Korean Chem Soc. 2003; 24(4):499-503.
13. Pace Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. Clin Chim Acta. 1995; 235:207-219.