

## MACERACIÓN DE RESIDUALES DE *CITRUS LIMÓN* VAR. CRIOLLO

Malvis Robaina–Mesa,<sup>1</sup> Zaluá Rodríguez–Riera,<sup>1</sup> Jorge E. Rodríguez-Chanfau.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas (INSTEC). La Habana. Cuba

<sup>2</sup> Facultad de Química. Universidad de la Habana. La Habana. Cuba.

\* email: [jerodriguez354@gmail.com](mailto:jerodriguez354@gmail.com)

### Resumen

El procesamiento industrial de frutos de cítricos genera una gran cantidad de desechos sólidos ricos en flavonoides, vitaminas, pectinas y celulosa. *Citrus limón* var. Criollo, es una fruta rica en flavonoides tales como hesperidina, diosmina, naringenina, eriocitrina. El objetivo de este trabajo fue estudiar un proceso de extracción de citroflavonoides y ácido ascórbico a partir de residuales de esta fruta. Se evaluaron dos variantes de extracción por maceración a 24, 48 y 72 horas, determinándose el contenido de flavonoides totales y ácido ascórbicos extraídos. Los resultados mostraron que la variante en la cual se usó etanol como medio de disolución es la más adecuada para la extracción de citroflavonoides en condiciones de maceración. 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.

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

### Maceration of residual of *Citrus limón* var. Criollo

### Abstract

The industrial processing of citrus fruits generates a large amount of residual solids rich in flavonoids, vitamins, pectin and cellulose. *Citrus limón* var. Criollo, is a fruit rich in flavonoids such as hesperidin, diosmin, naringenin and eriocitrin. The aim of this work was to study an extraction process of citroflavonoids and ascorbic acid from residual solids of this fruit. Two variants of extraction process by maceration at 24, 48 and 72 hours were evaluated. Total flavonoid and ascorbic acid content were determined. The results showed that the best extraction of citroflavonoids was between 48 and 72 hours with ethanol. Under these conditions, presence of amounts of ascorbic acid was determined, which contributes to increase the antioxidant potential and extract quality.

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

## Introducción

El limón es el fruto del limonero, árbol de hoja perenne y espinoso de la familia de las rutáceas. Este árbol se desarrolla con éxito en los climas templados y tropicales, cultivándose actualmente en todo el mundo.

Esta fruta aporta una gran cantidad de vitamina C, potasio y cantidades menores de otras vitaminas y minerales. La pulpa, contiene ácidos orgánicos como el ácido cítrico, ácido málico, ácido acético y ácido fórmico. Es buena fuente de fibra soluble como la pectina y la capa blanca que se encuentra debajo de la corteza presenta flavonoides fundamentalmente hesperidina (el más abundante) y otros como diosmina, naringenina, eriocitrina. Estos componentes son responsables de las actividades farmacológicas como el efecto antiinflamatorio, venotónicos y vasoprotectores. Diversos estudios han demostrado que la hesperidina y la diosmina actúan como agente flebotrópico y protector vascular, refuerzan la pared de los vasos capilares, otorgándole mayor elasticidad a las arterias y disminuyendo la formación de trombos.<sup>1-6</sup>

El procesamiento industrial de frutos de cítricos genera una gran cantidad de desechos sólidos, formado fundamentalmente por cascara y bagazo de las diferentes frutas utilizadas para la elaboración de jugos y néctares, lo que representa aproximadamente el 50% de la masa total del fruto original.<sup>7,8</sup> Los mismos son una fuente importante de aceites esenciales, pectinas, celulosa, pigmentos, vitaminas y polifenoles, en especial los citroflavonoides.<sup>9</sup> Se ha reportado que los flavonoides están presentes principalmente en la cáscara y bagazo, considerándose que los mayoritarios son hesperidina y la naringina.<sup>8</sup> El objetivo principal de este trabajo fue evaluar un proceso de extracción de citroflavonoides y ácido ascórbico a partir de residuales del *Citrus limón* var. Criollo.

## 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 Victor 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 desinfectadas 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 pesó y trasvasó a un reactor de acero inoxidable de tipo tanque agitado de 5 L de capacidad, provisto de un agitador de propela marina. Se adicionaron 2 L de disolvente

(variante 1: Etanol y variante 2: solución hidroalcohólica 70%) en una proporción 1:5 masa/volumen y se dejó macerar con agitación de 15 min cada cierto tiempo. Transcurrido el tiempo de maceración, el extracto fue filtrado al vacío utilizándose como medio filtrante lona (algodón XX, 2 mm) (Filtronic, Brasil) para eliminar el residual vegetal. Se estudiaron como tiempo de maceración 24, 48 y 72 h.

### **Métodos de ensayos**

Las determinaciones del contenido de flavonoides totales se realizaron aplicando la metodología descrita por Leal.<sup>10</sup> 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.

Se preparó una curva tipo utilizando 10 mg de estándar de hesperidina, el cual se disolvió en 0,5 mL de dimetilformamida. Se mezcló agitándose de forma circular hasta disolución de la muestra y se enrasó con agua destilada. Se tomaron alícuotas a diferentes concentraciones de hesperidina, en un rango de 0-100 ( $\mu\text{g/mL}$ ). Para la preparación de la muestra se tomaron 5 mL de los extractos obtenidos y se trasvasaron a un matraz aforado de 25 mL de capacidad que se enrasó con agua destilada. De esta solución se tomó una alícuota de 5 mL que se trasvasó a un volumétrico de 25 mL de capacidad, enrasando con agua destilada.

Las determinaciones del contenido de ácido ascórbico se realizaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (KNAUER, Alemania). 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  $\mu\text{L}$ . Como estándar de referencia se utilizó ácido ascórbico pa. (Merck). Se preparó una curva de calibración con concentraciones que oscilaban entre 100 y 1000  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ . Los resultados obtenidos se reportan como mg por cada 100 mL.

Las determinaciones de sólidos totales y pH se realizaron según lo establecido por la Farmacopea Brasileña.<sup>11</sup> Todos los análisis se realizaron por triplicado.

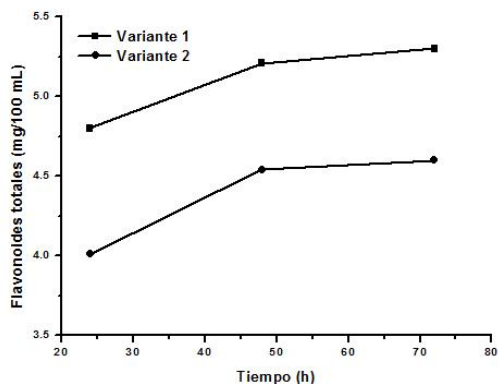
### **Análisis Estadístico**

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**

La figura 1 muestra el contenido de flavonoides totales obtenido para cada variante de extracción estudiada. En la tabla I se presenta el contenido de estos metabolitos en 100 g de material vegetal

para cada uno de los tiempos estudiados. Como se puede observar cuando se utilizó etanol como medio de disolución, la cantidad de flavonoides totales extraídos fue superior a la cantidad extraída al emplear la solución hidroalcohólica. El análisis estadístico mediante ANOVA demostró que la variante 1 es significativamente diferente a la variante 2 ( $p = 0,0385$ ). Por otro lado, al evaluar ambas variantes por separado, se observó que en ambos casos existían diferencias significativas entre las 24 h y las 48 h ( $p = 0,0485$  y  $p = 0,0421$  para variante 1 y variante 2, respectivamente), no existiendo diferencias significativas entre las 48 h y las 72 h ( $p = 0,0952$  y  $p = 0,0856$  para variante 1 y variante 2, respectivamente).



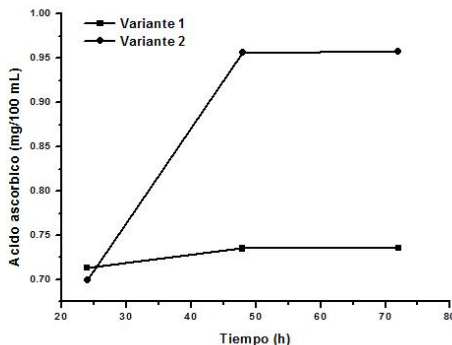
**Figura 1: Análisis de flavonoides totales para cada variante y a cada tiempo estudiado**

**Tabla I: Análisis de flavonoides totales (mg / 100 g material vegetal) para cada variante y tiempo estudiado.**

Tiempo (h)	24	48	72
Variante 1	23,9 / 0,30 <sup>a</sup>	24,7 / 0,26 <sup>b</sup>	25,7 / 0,21 <sup>b</sup>
Variante 2	19,2 / 0,09 <sup>c</sup>	21,4 / 0,11 <sup>d</sup>	21,9 / 0,17 <sup>d</sup>

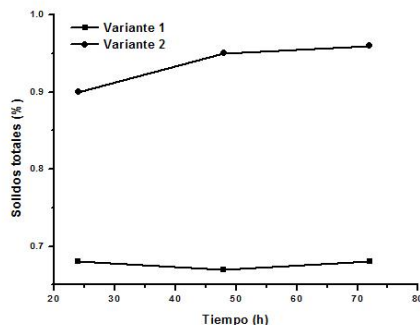
**Nota: Letras desiguales difieren significativamente para  $p < 0,05$**

La figura 2 muestra el contenido de ácido ascórbico extraído para cada variante estudiada en el tiempo. Se observa que existen diferencias significativas entre las variantes estudiadas a partir de las 48 h de extracción ( $p = 0,0326$ ), siendo superior la extracción cuando se utiliza solución hidroalcohólica como medio de disolución. El análisis individual para cada variante demostró que en la variante 1 no hay diferencias entre los tiempos de extracción, no ocurriendo lo mismo al evaluar la variante 2 donde existe diferencias entre las 24 h y las 48 h ( $p = 0,0462$ ) y no existen diferencias entre las 48 h y las 72 h ( $p = 0,0735$ ).



**Figura 2: Comportamiento en el tiempo del contenido de ácido ascórbico para cada variante**

La figura 3 muestra los resultados para el contenido de sólidos totales extraídos en cada variante en el tiempo. Se observa una marcada diferencia ( $p = 0,0268$ ) entre los sólidos extraídos en la variante 1 y los extraídos en la variante 2, siendo superiores en esta última variante. No se observaron diferencias entre los diferentes tiempos de extracción al evaluar cada variante por separado.



**Figura 3: Comportamiento en el tiempo del contenido de sólidos totales para cada variante**

Con relación al pH, el comportamiento fue similar para cada variante, estando el mismo comprendido entre 4 y 5, lo que se considera adecuado para este tipo de extracto. Por otro lado, desde el punto de vista cualitativo todos los extractos fueron transparentes, de color amarillo claro y con olor característico.

### Discusión

Los flavonoides son grupos de compuestos polifenólicos encontrados mayormente en frutas y vegetales. En los cítricos las principales metodologías de extracción se realizan mediante percolación, suspensión y/o solvatación de la materia prima en el medio de extracción. Debido a su

carácter fenólico y la presencia de sistemas aromáticos conjugados, presentan una alta solubilidad en agua y etanol, disolventes que generalmente se utilizan para su extracción.<sup>12, 13</sup>

Se ha reportado que dentro de los flavonoides presentes en plantas del género *Citrus*, la rutina, la hesperidina y la diosmina son los mayoritarios en el limón. Por otro lado, la presencia de cumarina y ácidos orgánicos como el ácido cítrico y el ácido ascórbico aparecen entre los componentes mayoritarios presentes juntos a los flavonoides. La presencia de estos últimos ayudan al incremento de la acción antioxidante e incrementan la capacidad farmacológica de los mismos.<sup>14</sup>

En el caso específico de los resultados alcanzados en este trabajo, se observó que en la variante en la cual se empleó como disolvente etanol (variante 1), la cantidad de flavonoides totales extraídos fue superior al caso en que se empleó una solución hidroalcohólica como medio de disolución. Este resultado era de esperar pues se conoce que los flavonoides son extraídos por solventes polares, siendo el etanol uno de los solventes que más fácilmente extraen a los mismos y uno de los más empleados en la industria farmacéutica y alimenticia debido a su baja toxicidad.<sup>10</sup>

Por otro lado, los valores de flavonoides totales extraídos son inferiores a los reportados por otros autores para extracciones con etanol a partir del limón. Esto puede estar motivado por la no utilización de otras variables para acelerar el proceso de extracción como puede ser la temperatura. En los casos reportados en la literatura,<sup>12</sup> se realizan con etanol extracciones dinámicas a temperaturas de 80 °C, obteniendo concentraciones de flavonoides totales que oscilaban alrededor de 0,3 g cada 100 g de material vegetal.

Por otro lado, el ácido ascórbico es la más popular de las vitaminas hidrosolubles por los grandes beneficios que reporta a la salud humana. La misma se afecta con facilidad por factores tales como la humedad, la luz, el aire, el calor, los iones metálicos y el medio alcalino, descomponiéndose a ácido oxálico, ácido L-treónico, ácido L-xilónico, ácido L-lixónico y ácido dehidroascórbico. Este último se transforma irreversiblemente en ácido 2,3 diceto-L glucónico, el cual constituye su principal producto de degradación.<sup>15</sup>

Los resultados en este estudio demostraron que aunque en ambas variantes se extrae el ácido ascórbico, es en la variante 2 donde la extracción es superior debido a su hidrosolubilidad y la presencia del agua en la solución extrayente.

Por otro lado, la presencia de ambos componentes en los extractos es beneficiosa debido al sinergismo que se establece entre ellos. Se ha reportado que el ácido ascórbico reduce la oxidación de los flavonoides tales como la quercetina, de manera tal que al combinarse permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo y a la vez, los flavonoides evitan el proceso de oxidación de las vitaminas presentes en el extracto, por lo cual la presencia de unos favorecen a los otros y viceversa.<sup>16</sup> Esto tiene una importancia a la hora de estudiar estos extractos,

pues aunque el objetivo fundamental es la extracción de los citroflavonoides, la presencia de una fracción de ácido ascórbico favorece la calidad del mismo.

En conclusión, la variante 1 es la más adecuada para la extracción de citroflavonoides en condiciones de maceración por un tiempo de 48 a 72 horas. 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. Struckmann JR, Nicolaidis AN. Flavonoids: a review of the pharmacology and therapeutic efficacy of MPFF 500 mg in patients with chronic venous insufficiency and related disorders. *Angiology* 1994; 45(6):419-28.
2. Daftary SN, Irani JS, Tsouderos Y. The Therapeutic Activity of Micronized Flavonoid Fraction in IUCD-induced bleeding. *Drugs of Today* 1995; 31:41-45.
3. Ho YH. Prospective Randomized Controlled Trial of a Micronized Flavonoidic Fraction to Reduce Bleeding after Haemorrhoidectomy. *Br. J. Surg.* 1995; 82(8):1034–35.
4. Conesa CM, Ortega VV, Gascón JY, Baños MA, Jordana MC, Benavente García O, Castillo J. Treatment of Metastatic Melanoma B16F10 by the Flavonoids Tangeretin, Rutin, and Diosmin. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2005, 53, 17, 6791-6797.
5. Barreiros Andre LB, David Jorge M, David Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 2006; 29(1):113-123.
6. Cartaya Rubio O, Reynaldo Escobar I, Nogueira Lima C. Caracterización química del complejo de bioflavonoides del limón (CBL). *TEMAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.* 2002; 6(18):11-14.
7. Marín FR, Soler Rivas C, Benavente García O, Castillo J, Pérez Álvarez JA. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry.* 2007; 100(2):736-741.
8. 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.
9. Girard B, Mazza G. Functional grape and citrus products. En: Mazza G. ed. *Functional Foods, Biochemical and Processing.* Pennsylvanian: Technomic Publishing Company, 1998:155- 178.
10. Leal Acosta L. Obtención de flavonoides a partir de residuales cítrícolas cubanos. Tesis presentada en opción al título de Licenciado en Radioquímica. Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas. La Habana, Cuba. 2015.
11. *Farmacopeia Brasileira.* 5 ed. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz; 2010:91-121.

12. Tripodo MM, Mondello F, Lanuzza F. Simultaneous recovery of dietary fibres and hesperidin from industrial lemon waste Forum Ware International. 2012; 2:23-30.
13. Evseeva OS, Andreeva OA, Oganessian ET. Studies of the hydrolysis of hesperidin. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2014; 47(11):606-609.
14. 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.
15. 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.
16. 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.