

## Ensayos

# Caracterización química del complejo de bioflavonoides del limón (CBL)

### Resumen

En este trabajo se realizó la extracción del CBL a partir de los frutos comerciales de limón criollo (*Citrus limón var. Criollo*) y la lima persa (*Citrus aurantifolia*). A las muestras obtenidas se les evaluó el rendimiento y se realizó la caracterización de los azúcares mediante cromatografía de gases, por el método de los acetatos de alditoles, resultando la glucosa el azúcar mayoritario en el complejo aunque están presentes también la xilosa, galactosa, manosa e inositol, la acidez total se determinó por análisis volumétrico y el análisis de flavonoides se realizó por HPLC utilizando una columna de fase inversa de polygosil 60, separación isocrática con agua, acetonitrilo, metanol y ácido acético (15:2:2:1) identificándose entre los flavonoides mayoritarios la eriocitrina y la hesperidina.

### Abstract

In this study, CBL extraction was carried out on commercial fruits: Creole lemon (*Citrus limón var. Criollo*) and Persian limes (*Citrus aurantifolia*). The samples obtained were evaluated for yield, and the characterization of sugars through gaseous chromatography was done, using the alditole acetate method. As a result, glucose turned out to be the major sugar in the complex, although xylose, galactose, mannose and inositol were also found. Total acidity was calculated by volumetric analysis, while flavonoid analysis was done by means of HPLC using a reverse phase column of polygosil 60, isocratic separation with water, acetonitrile, methanol and acetic acid (15:2:2:1) from which eriocetin and hesperidin showed up as the major flavonoids.

### Abstrait

Dans ce travail, on a réalisé l' extraction du CBL à partir des fruits commerciaux de Citron «Criollo» (*Citrus limón var. Criollo*) et la Lime perse (*Citrus aurantifolia*). A partir des Échantillons obtenus, on a évalué le rendement et réalisé la catégorisation des sucres comme chromatographie gazeuse à partir de la méthode des acétates d' alditoles.

Donnant le résultat du glucose du sucre majoritaire, même si l'on constate aussi la présence de xilose, galactose, manose et inositol, l'acidité totale se détermine par analyse volumétrique et l'analyse de flavonoides s'est réalisée par HPLC en utilisant une colonne de phase inversée de polygosil 60, séparation isocrétique avec de l'eau, acetonitrile, méthanol et acide acétique. (15:2:2:1) s'identifiant entre les flavonoides majoritaires, l' eriocitrine et la hespéridine.

\* Omar Cartaya Rubio,  
Inés Reynaldo Escobar.  
Clara Nogueiras Lima.

### Introducción

El Complejo de Bioflavonoides del Limón (CBL) se extrae de la corteza de los frutos del limón. La composición de la corteza de los frutos cítricos es muy variada y se destacan entre sus constituyentes los flavonoides, los polisacáridos, los ácidos orgánicos, los aceites esenciales y los azúcares(1) y la concentración de estos compuestos depende y varía de acuerdo a múltiples factores entre ellos la especie, grado de madurez del fruto y las zonas de cultivo(2).

La actividad biológica del CBL depende en gran medida de su composición química y especialmente de la concentración de sus constituyentes bioactivos fundamentales: azúcares, flavonoides y ácidos orgánicos(3), por lo que en este trabajo nos proponemos como objetivos; obtener el CBL a partir de diferentes frutos cítricos cultivados en Cuba y realizar su caracterización química.

\* Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas., Dpto. Fisiología y Bioquímica Vegetal. San José de las Lajas. La Habana Cuba.  
\*\* Laboratorio de Productos Naturales Facultad de Química  
Universidad de la Habana.

## Materiales y métodos

Se utilizaron frutos maduros de la variedad de limón criollo (*Citrus limon var. Criollo*) y la lima persa (*Citrus aurantifolia*) cultivados en el área experimental del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas(Cuba), el jugo se extrajo manualmente y los residuos fueron molidos para obtener el CBL utilizando 200 g/L de residuo, 100°C de temperatura y 90 minutos de agitación. Al final del proceso se midió el pH y el rendimiento se evaluó por liofilización.

- Determinación de la acidez total.

La acidez total se determinó por análisis volumétrico, por valoración con NaOH 1N y fenolftaleína como indicador.

- Determinación de la composición de monosacáridos por cromatografía de gases.

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Chrom 5, gas portador: nitrógeno, temperatura del inyector: 250 °C, temperatura del detector: 300°C, temperatura del horno: 225°C y un detector de ionización de flama.

Se utilizaron como patrones D-xilosa, D-glucosa, D-galactosa, D-inositol y D-manosa (SIGMA) a una concentración de 2 mg/ml.

- Determinación de la composición de bioflavonoides por HPLC.

El análisis por HPLC se realizó en un cromatógrafo líquido Knauer columna de fase inversa de polygosil 60 C18 (250x4 mm, tamaño de partículas de 5 mm) a temperatura ambiente, los solventes de elución: agua, acetonitrilo, metanol y ácido acético (15:2:2:1) con un detector UV (λ= 280 nm) a una concentración de 1 mg/mL.

Se utilizaron como patrón eriocitrina, hesperidina y naringenina (SIGMA).

En todos los casos, las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se expresaron en mg/g de masa seca de los residuos de limón.

## Resultados

Teniendo en cuenta las condiciones de máximo rendimiento en la obtención del complejo(4), se obtuvo el CBL a partir de los frutos cítricos ácidos comerciales, limón criollo (*Citrus limón var. Criollo*) y la lima persa (*Citrus aurantifolia*) que es otra especie diferente del limón, debido a su característica de ser un fruto ácido.

Los resultados de la tabla 1 muestran que no existe ningún efecto sobre el rendimiento del complejo con el pH de los frutos utilizados ya que los valores obtenidos son muy similares, aunque cuando se comparan los valores de los rendimientos de los CBL con el de pH de los extractos se puede apreciar que en la medida en que los frutos son más ácidos, los rendimientos son más elevados.

Tabla 1: Influencia del pH del extracto en los rendimientos y la acidez del complejo

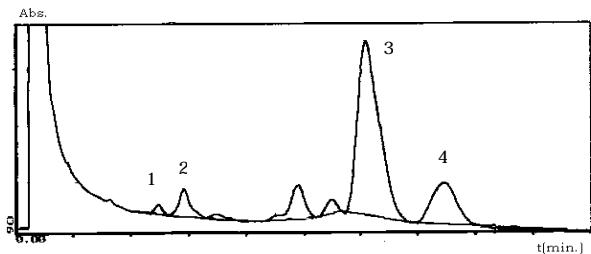
Fruto cítrico	pH	Rendimiento (mg/g)	Acidez (mg/g)
Criollo	5,23	170, 65 ± 0,05	5,78
Lima persa	5, 67	164, 32± 0,03	5,6
± sv			

Este comportamiento puede deberse a dos factores fundamentalmente, primero a factores genéticos, los cuales gobiernan entre otros aspectos la composición cualitativa y cuantitativa de cada especie y/o variedad (5, 6). En segundo lugar, a los altos niveles de flavonoides en sus células, según los resultados expuestos por Reynaldo et al. (7), los cuales han evaluado la composición flavonoidea durante el desarrollo de los frutos en otras especies de cítricos.

La variedad de limón criollo fue la que presentó mayor valor de acidez, que a su vez mostró el menor valor de pH de su extracto según los datos mostrados en la tabla 1 lo que nos hace suponer que este valor se deba al mayor contenido de ácido cítrico que es el ácido predominante en el fruto del limón, aunque también pueden estar presentes pequeñas cantidades de ácidos málico y oxálico(8).

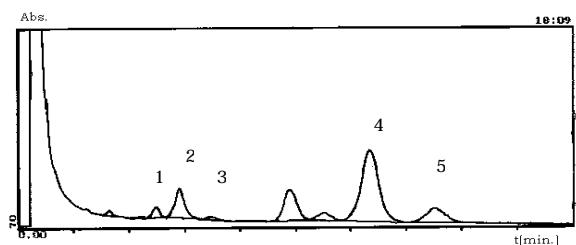
La identificación de los azúcares presentes en los extractos del CBL de los dos frutos cítricos ácidos se realizó por cromatografía gas- líquido por el método de los acetatos de alditoles.

Al analizar la composición del extracto de la variedad de limón criollo (fig.1) se identificaron los azúcares xilosa, galactosa, manosa, glucosa e inositol siendo la glucosa el azúcar que se encuentra en mayor concentración con 63,83 mg/g y la manosa presenta la menor concentración con 0,73 mg/g.



**Figura 1. Identificación de azúcares por cromatografía gaseosa del CBL de la variedad de limón criollo 1-Xilosa, 2- Galactosa, 3- Glucosa, 4- Inositol**

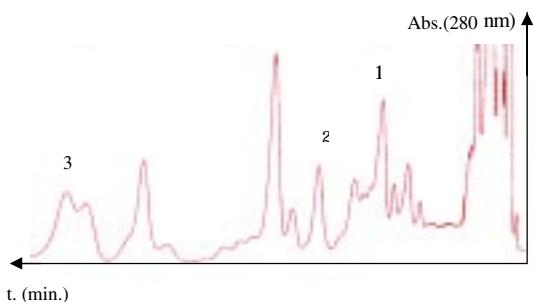
En el cromatograma del extracto de la lima persa (fig. 2) se identificaron los mismos cinco azúcares que en el limón criollo, siendo la glucosa el azúcar de mayor concentración en el extracto con 45,3 mg/g.



**Figura 2. Identificación de azúcares por cromatografía gaseosa del CBL de la Lima persa 1-Xilosa, 2- Galactosa, 3- Manosa, 4- Glucosa, 5- Inositol**

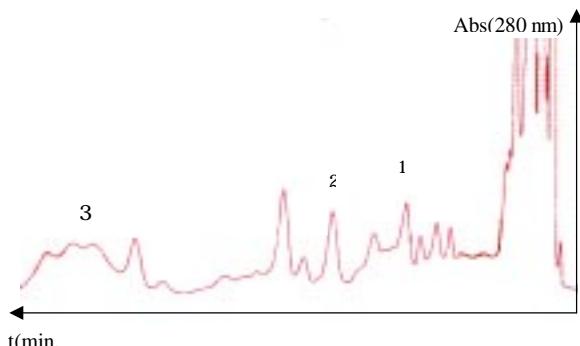
En la separación y cuantificación de los diferentes flavonoides presentes en los complejos se utilizó el método de HPLC de fase inversa, las figuras 3 y 4 muestran los cromatogramas obtenidos de los extractos de limón criollo y lima persa.

En el cromatograma de la separación de flavonoides de la variedad Criollo (fig. 3) se identificaron las flavanonas eriocitrina, hesperidina y naringenina. La eriocitrina fue el flavonoide más abundante de los identificados en el extracto con 16,65 mg/g.



**Figura 3. Identificación de flavonoides por HPLC del CBL obtenido a partir del limón criollo 1:eriocitrina 2:hesperidina 3:naringenina**

En la lima persa (fig.4) se identificaron los mismos flavonoides que en el limón criollo, la eriocitrina fue el flavonoide mayoritario con 8,25 mg/g. Estos resultados coinciden con los reportados por Nogata et al. (9) y Miyake et al. (10) los cuales han realizado estudios sobre la composición flavonólica de cítricos y han identificado entre los flavonoides mayoritarios de la corteza a la eriocitrina y la hesperidina.



**Figura 4. Identificación de flavonoides por HPLC del CBL obtenido a partir de la lima persa 1:eriocitrina 2:hesperidina 3:naringenina**

Al comparar los tiempos de retención obtenido de los flavonoides no identificados con los valores reportados por Ooghe et al.(11), Wu (12), Park et al. (13), Berhave, Fong y Hasegawa (14) y Miyake, Yamamoto y Osawa (15), utilizando las mismas condiciones experimentales en el estudio de flavonoides de cítricos por HPLC; estos coinciden con los tiempos de retención de: vitexina, naringina, apigenina, rutina, neohesperidina e isonaringina respectivamente, aunque se continúan realizando los correspondientes análisis químicos para su identificación.

En conclusión, el análisis químico de los CBL obtenidos muestran la presencia de algunos azúcares como glucosa, galactosa e inositol así como los flavonoides eriocitrina, hesperidina y naringenina y la presencia de ácidos orgánicos. Estos compuestos pueden ser los responsables de la actividad farmacológica en el complejo, por lo que los trabajos de caracterización continuarán profundizando para determinar cuáles son los compuestos presentes en el complejo y su real contribución a la actividad farmacológica de éstos.

## Bibliografía

- KESTERSON, J.W.; BRADDOCK, R.J.; BULLOCK, F.P. y CHAPOT, H. 1999 La industrialización de los frutos cítricos. Los Cítricos. 75- 81
- REYNALDO, INÉS; FUSTER, MARÍA; BOTIA, JUANA M.; GARCÍA PUIG, D.; ORTUÑO, ANA; DEL RIO, J.A. 1999 Flavonoids found in several citrus species cultivated in Cuba and Spain for their industrial application. *Cultivos Tropicales*, v. 2(3) p. 73- 75.
- CARTAYA, O. e INÉS REYNALDO 1999 Obtención del Complejo de Bioflavonoides del Limón a partir de cuatro variedades. *Cultivos Tropicales* v. 20(3):55- 57.
- CARTAYA, O. e INÉS REYNALDO 2001 Optimización de la obtención del Complejo de Bioflavonoides del Limón. *Revista Cubana de Química*. IV Congreso Internacional de Química. Vol. XIII, No. 2, ISSN-058- 5995.
- MC MULLEN, M.D.; BYRNE, P.F.; SNOOK, M.E.; WISEMAN, B.R. y LEI, E.A. 1999 Quantitative trait loci and metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(5):1996- 2000.
- BLANCO, MARÍA; NIEVES, NADINA; BORROTO, C.G.; PANQUE, A.; ESCALONA, MARITZA; GONZÁLEZ, J. y ACOSTA, J.E. 1995 Algunos aspectos bioquímicos involucrados en el proceso de retención de frutos en la Lima persa (*Citrus latifolia* Tan.) Centro Agrícola (1): 54- 62.
- REYNALDO, INÉS; DEL RIO, J.A.; ORTUÑO, ANA y CASTILLO, J. 1997 Niveles de hesperidina y neohesperidina durante el desarrollo de los frutos de citrus macroptera. *Cultivos Tropicales*. 18(1): 16-19.
- ARNAO, M.B.; CANO, A.L. y ACOSTA, M.E. 1998 Estimación de la actividad antioxidante total en cítricos y su relación con el contenido en vitamina C. *Fruticultura Profesional*. No 93 p. 48- 54.
- NOGATA, Y.; OHTA, H.; YOZA, K.I.; BERHARE, M. y HASEGAWA, S. 1996 High- performance liquid chromatographic determination of naturally occurring flavonoids in citrus with a photo diode- array detector. *J. Chromatogr. A*. V.667(½) p. 59- 66.
- MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; MORIMITSU, Y y OSAWA, T. 1997 Isolation of C- glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. *J. Agric. And Food Chem.* V45 No 12 p. 4619- 4623.
- OOGHE, W.C.; OOGHE, S.T.; DETAVERNIER, C.M.; HUYGHE, H. y BAERT, A. 1994 Characterization of orange juice (*Citrus sinensis*) by flavanone glycosides. *J. Agric. Food Chem.* V.42(10) p.2183- 2190.
- WU, H.J. 1990 Some flavanones in the peel of ten citrus species and varieties in China. *Proceedings of the international citrus Symposium Guangzhou, China*.
- PARK, G.L.; AVERY, S.M.; BYERS, J.L. y NELSON, D.B. 1983 Identification of Bioflavonoides from citrus. *Food Technology*. 98- 105.
- BERHAVE, M.A.; FONG, C.H. y HASEGAWA, S. 1996 Limonoid and flavonoid composition in varieties of Papeda and Papedacitrus. *Biochemical Systematic and Ecology*. 24:3, 237- 242.
- MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K. y OSAWA, T. 1997 Isolation of eriocitrin (eriodictyol 7- rutinoside) from lemon fruit (*Citrus limón* Burm f.) and its antioxidative activity. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*. 3, 84- 89.