

Aprovechamiento de residuos de la agroindustria de cítricos: extracción y caracterización de flavonoides

Julián Alberto Londoño-Londoño*

Resumen

El aprovechamiento industrial de los cítricos se ha convertido en una actividad intensiva en donde participan empresas dedicadas a toda la cadena productiva (cultivadores, procesadoras, centros de distribución y exportadores), produciendo jugos, pulpas, concentrados y frutas en fresco; sin embargo, a medida que la producción crece, se aumenta también la generación de residuos sólidos y líquidos, los cuales están compuestos principalmente de agua, azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, aminoácidos, minerales, aceites esenciales, flavonoides y vitaminas. Específicamente, los flavonoides son constituyentes de amplia distribución en el reino vegetal, han mostrado una amplia variedad de actividades biológicas y presentan alto valor agregado debido a sus aplicaciones industriales. Sin embargo, el interés cada vez más creciente por sustancias bioactivas de origen natural impone la necesidad de desarrollar métodos de extracción menos contaminantes y con el máximo rendimiento de sustancias bioactivas, en un corto período de tiempo y con bajo costo. Precisamente, este trabajo presenta una descripción de los flavonoides presentes en residuos de cítricos, haciendo énfasis en los métodos para su extracción y caracterización.

* Químico farmacéutico, doctor en Ciencias Químicas, docente del Programa de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingenierías, Corporación Universitaria Lasallista. Director Grupo de Investigación en Ingeniería de Alimentos (GRIAL).

Use of waste from the citrus agro industry: extraction and characterization of flavonoids

Abstract

The industrial use of citrus fruits has become an intensive activity in which there are companies dedicated to work for all the productivity chain (farmers, processors, distributors and traders) producing juice, pulp, concentrates and fresh fruits. Nevertheless, as production increases, the production of solid and liquid waste, especially water, soluble sugars, fiber, organic acids, amino acids, minerals, essential oils, flavonoids and vitamins creates a problem. Flavonoids, specifically, are widely distributed among vegetables, have showed a great variety of organic activities and have a great added value, given their possible industrial applications.

As the interest in bioactive substances from a natural origin is increasing, it becomes imperative to develop extraction methods with fewer pollutants and with a maximum performance by those bioactive substances, with a shorter period of time and with a lower cost. This research work, precisely, introduces a description of flavonoids in citrus fruits remains, emphasizing the methods for extracting and characterizing them.

Introducción

En el mundo, la preocupación acerca del aprovechamiento de residuos ha tomado gran fuerza entre la comunidad científica y sobre todo en la industria, en donde los procesos de transformación generan desechos y subproductos que pueden ser útiles en otras actividades; sin embargo, los residuos generados en las transformaciones agroindustriales no han sido aprovechados eficientemente, en parte, porque su valor es aún desconocido; de tal manera que estudios recientes han centrado su atención en la necesidad de identificar y recuperar sustancias de interés farmacéutico o alimentario presentes en residuos de manzana, cítricos, bagazos de yuca y caña de azúcar entre otros. Es así como se han diseñado procesos para utilizar estos materiales en la generación de productos de alto valor comercial como etanol, enzimas, ácidos orgánicos, amino-ácidos y metabolitos secundarios biológicamente activos.

Los flavonoides son constituyentes de amplia distribución en el reino vegetal, implícitamente se encuentran en todas las plantas, pero su distribución cuantitativa varía entre diferentes órganos y en diferentes poblaciones de una misma planta, explicado por la regulación de la expresión génica y la interacción con factores ambientales (clima, altitud, nutrición y prácticas agrícolas)¹.

Los flavonoides presentan una gran variedad estructural, con un esqueleto común de núcleo flavon (2-fenilbenzopirano) que contiene dos anillos bencénicos

(A) y (B) combinados por un anillo pirano (C) con oxígeno como heteroátomo, donde las modificaciones sobre el anillo C generan una variedad de tipos de flavonoides como se muestra en la figura 1.

En los cítricos, los flavonoides más abundantes son aquellos pertenecientes a los grupos de las flavonas, flavanonas, chalconas y dihidrochalconas. Estos compuestos tienen una distribución restringida, lo cual hace que sean descritos como flavonoides minoritarios a pesar de estar presentes en concentraciones significativas en algunos alimentos de alto consumo.

Las estructuras químicas de los flavonoides más representativos de cítricos se muestran en la figura 2. Estructuralmente, las flavanonas tienen el anillo C saturado, mientras que las flavonas presentan una insaturación en los carbonos 2–3. Por su parte, las chalconas y dihidrochalconas tienen una estructura abierta, y desaparece virtualmente el anillo C.

En cuanto a las modificaciones en los anillos A y B, la glicosilación es un fenómeno común. En general, en los cítricos, las flavanonas se presentan como glicósidos, generalmente rutinósidos (1→6 ramnosil-glicósidos) y neohesperidinósidos (1→6 ramnosil-glicósidos) unidos casi siempre por un enlace O-glicósido al carbono 7 de la aglicona ².

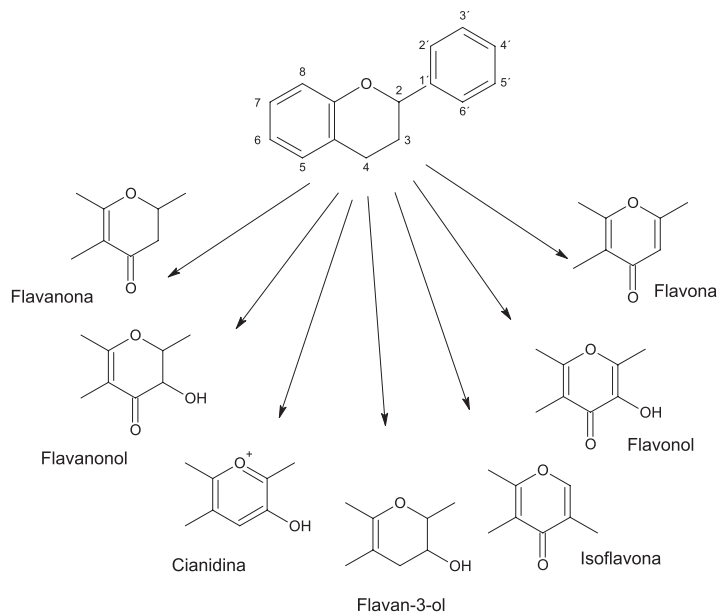


Figura 1. Esquema de la clasificación de los flavonoides basado en las modificaciones estructurales en el anillo C, modificado de Tiwari y colaboradores ³.

Muchos cultivadores comerciales de limón, lima, mandarina y naranja dulce han sido caracterizados químicamente demostrando que poseen un patrón de flavonoides principalmente del tipo rutinósido (compuestos menos amargos)⁴, mientras que naranja amarga y pomelo contienen principalmente neohesperidinósidos (compuestos amargos). Por su parte, la toronja, por tratarse de un híbrido, presenta un perfil mezclado de rutinósidos y neohesperidinósidos. Este hecho es importante, pues los perfiles cromatográficos de los flavonoides glicosilados en cítricos se han convertido en una herramienta útil para quimiotaxonomía de materiales híbridos y para el control de calidad y de adulteraciones en productos derivados⁵.

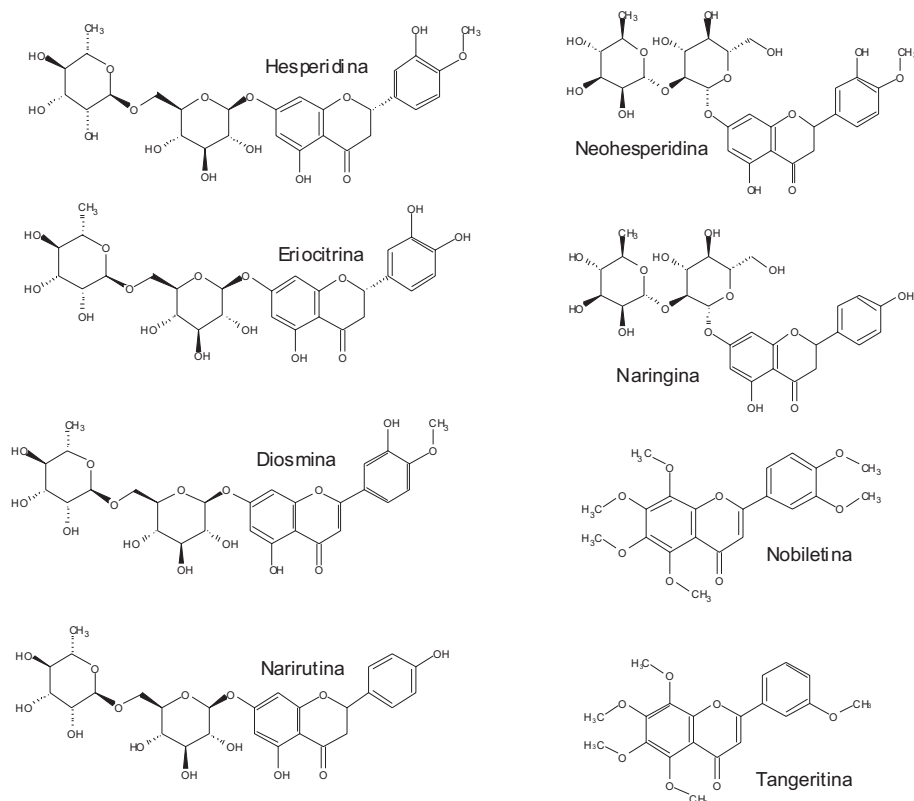


Figura 2. Estructuras químicas de los flavonoides más frecuentes encontrados en cítricos.

En Colombia, un país netamente agrícola, con un sector agropecuario que aporta aproximadamente el 13% del producto interno bruto (PIB), se ha fortalecido la idea de diversificación de cultivos y se han establecido otros productos

de amplia visión comercial como las frutas, entre las que se cuentan los cítricos. Colombia figura en el puesto 29 de la producción mundial de cítricos, con una participación en el total del 0,37%, y una tasa de crecimiento anual de 5,06% lo que muestra un desarrollo dinámico de este sector agrícola. En el país, el 31% del área sembrada en frutales corresponde a los cítricos, de las cuales, el 71% corresponde a naranja, el 15% a mandarina, el 12% a lima ácida y el 2% a toronja. Los principales productores de naranja son los departamentos de Cesar, Tolima y Antioquia⁶.

El aprovechamiento industrial de estas especies de cítricos se ha convertido en una actividad intensiva en donde participan empresas dedicadas a toda la cadena productiva (cultivadores, procesadoras, centros de distribución y exportadores), produciendo jugos, pulpas, concentrados y frutas en fresco; pero a medida que la producción crece, se aumenta también la generación de residuos sólidos y líquidos, los cuales están compuestos principalmente de agua, azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, aminoácidos, minerales, aceites esenciales, flavonoides y vitaminas, estando en cantidades diferentes dependiendo de la fracción de la fruta (jugo, cáscara, pulpa, mesocarpio), su estado de madurez y el sistema empleado para la extracción del jugo⁷⁻¹¹.

Específicamente, en cuanto a los flavonoides, la naringina es el mayoritario en la toronja, la hesperidina lo es en la naranja, mientras que rutina, hesperidina y diosmina son abundantes en el limón y la mandarina¹². Otros metabolitos importantes en los cítricos son las cumarinas y ácidos orgánicos como el ácido cítrico y el ascórbico¹³.

En general, los flavonoides pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, un grupo de metabolitos ampliamente distribuidos que abarcan aproximadamente 8.000 sustancias, divididas en 22 grupos con una estructura común, determinada por un anillo aromático unido al menos a un sustituyente hidroxilo (grupo fenol) y frecuentemente se encuentran como derivados de ésteres, éteres y glicósidos. Los compuestos fenólicos han mostrado una amplia variedad de actividades biológicas: antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antiviral, antiproliferativa, antimutagénica, anticarcinogénica, acciones vasodilatadoras, y prevención de enfermedades coronarias y desórdenes neurodegenerativos^{14, 15}.

Las aplicaciones terapéuticas de algunos de estos compuestos son ya conocidas y utilizadas en el ámbito clínico. La mezcla micronizada de flavonoides Daflón®, que contiene 90% de diosmina y 10% de hesperidina es utilizada como un potente medicamento flebotónico para el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica¹⁶. Además, son numerosos los productos fitoterapéuticos y alimentos funcionales comercializados en el mundo que contienen, totalmente o como parte de sus principios activos, una fracción flavonoide, comúnmente llamada bioflavonoides e incluso denominada genéricamente como vitamina P.

Es tan promisoría la obtención de compuestos con alto valor a partir de residuos de cítricos, que en el estado de la Florida (EUA), una región productora de cítricos, ha surgido el Laboratorio de Investigación en Cítricos y Productos Subtropicales (Citrus and Subtropical Products Research Laboratory, por su nombre en inglés) precisamente con el interés de recuperar, a partir de residuos de cítricos, productos importantes para uso en la salud humana y en alimentos. Ellos han estimado que el aprovechamiento de los residuos generados por la industria procesadora de cítricos en los Estados Unidos de América, podría suministrar más de 10.000 toneladas de hesperidina por año, muy por debajo de la demanda mundial para esta materia prima¹⁷.

Gorinstein y colaboradores¹⁸ reportaron que el contenido total de polifenoles fue más alto en las cáscara de cítricos comparado con los frutos pelados (tabla 1). Efectivamente, varios estudios muestran que los flavonoides están presentes principalmente en la cáscara y el bagazo, siendo hesperidina, naringina, narirutina y eriocitrina los más abundantes⁹ de ellos; el primero es más característico de residuos sólidos y el segundo de residuos líquidos¹⁹.

Tabla 1. Contenido de polifenoles totales en frutas de cítricos peladas y sus cáscaras, modificado de Gorenstein y colaboradores

Contenido de polifenoles totales (mg/100 g)	
Limones pelados	164 ± 10.3
Cáscara de limón	190 ± 10.6
Naranjas peladas	154 ± 10.2
Cáscara de naranja	179 ± 10.5
Pomelos pelados	135 ± 10.1
Cáscara de pomelo	155 ± 10.3

Métodos de extracción de flavonoides a partir de residuos de cítricos

La extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes vegetales utilizando solventes es una operación clásica aplicada en muchos procesos industriales, especialmente en la industria farmacéutica y de alimentos; sin embargo, el interés cada vez más creciente por sustancias bioactivas de origen natural impone la necesidad de desarrollar métodos de extracción menos contaminantes y con el máximo rendimiento de sustancias bioactivas, en un corto período de tiempo y con bajo costo.

De hecho, se cree que una de las principales razones para el escaso aprovechamiento de los residuos de la agroindustria citrícola es la falta de métodos de

extracción efectivos para obtener sustancias con la calidad requerida para servir como materia prima en otros procesos. No obstante, son cada vez más crecientes las exigencias de calidad e inocuidad para este tipo de materias primas. De hecho, la Guía 467 de la Farmacopea Norteamericana (USP), armonizada con la Farmacopea Europea, exige el análisis de trazas de más de 57 solventes utilizados en procesos convencionales de extracción. De tal manera que el método de extracción para sustancias que pretenden ser usadas en la industria farmacéutica o de alimentos debería ser extracción acuosa, sin embargo, no siempre es posible lograr altos rendimientos por procesos convencionales de extracción acuosa, incluso aumentando la temperatura.

En este sentido, surgen procesos alternativos que se han desarrollado siguiendo la tendencia de extracción limpia; entre ellas las más destacadas son la extracción con fluidos supercríticos (EFS), la extracción acelerada con microondas (EAM) y la extracción asistida por ultrasonido (EAU).

EAU es una de las herramientas utilizadas para evitar los problemas presentados con las técnicas de extracción convencional; esta técnica utiliza vibraciones mecánicas en frecuencias superiores al rango audible para el oído humano (1–16kHz). Aplicando estas frecuencias en un medio líquido, se generan ciclos de expansión, que a su vez forman presiones negativas y burbujas que crecen y colapsan, dando lugar a un fenómeno de mecánica de fluidos conocido como cavitación²⁰. La importancia de este proceso de extracción radica en los eventos que ocurren cuando la burbuja colapsa; en algún punto, la burbuja no puede absorber la energía del ultrasonido eficientemente, por lo que implosiona y se genera una rápida compresión de gases, produciendo un aumento de temperatura y presión, pero debido al tamaño tan pequeño de las burbujas en comparación con el volumen total del líquido, no hay cambios drásticos en las condiciones ambientales del mismo; además, cuando ocurre el proceso de implosión en una estructura sólida como un material vegetal, el líquido se expande a altas velocidades, ocasionando fuertes impactos sobre la superficie sólida, lo cual incrementa la penetración del solvente en la superficie del material vegetal y la liberación de los productos intracelulares por rotura de las paredes de la célula²⁰.

En cuanto a los métodos de extracción de flavonoides, han surgido procedimientos para obtención a partir de cáscara de cítricos aplicados en industrias farmacéuticas y de alimentos²¹. Estos métodos están basados en el tratamiento alcalino de las cáscaras de cítricos y posterior precipitación de hesperidina desde soluciones acidificadas, con posteriores pasos de recristalización para aumentar la pureza del producto comercial. Varios trabajos se han publicado en este sentido: López-Sánchez extrajo hesperidina de cáscaras de mandarinas Santsuma utilizando una mezcla de óxido e hidróxido de calcio para evitar la formación de geles y permitir la filtración²². Lo Curto y colaboradores desarrollaron un tratamiento

en medio ácido para hidrolizar la pectina de cáscaras de naranja antes de la extracción alcalina de flavonoides ²³. Inaba y colaboradores degradaron la pectina en cáscaras frescas de mandarina Santsuma utilizando una preparación enzimática de *Aspergillus niger* ²⁴. El-Nawawi incrementó el rendimiento en la extracción de hesperidina recirculando las aguas de extracción de un proceso de extracción alcalina²⁵. Di Mauro y colaboradores utilizaron resinas de estirenodivinilbenceno para concentrar las soluciones alcalinas de hesperidina extraídas de cáscaras de naranja por solubilización en medio alcalino²⁶.

recientemente, Ma y colaboradores desarrollaron un método utilizando extracción asistida por ultrasonido (EAU) para la obtención de hesperidina a partir de la cáscara de cítricos; utilizaron tres tipos de solvente (etanol, metanol e isopropanol), tres temperaturas de extracción (30, 40 y 50°C), tres frecuencias (20, 60 y 100 kHz), cuatro intensidades de operación del sonicador (3.2, 8, 30 y 56 W) y diferentes tiempos de extracción (entre 20 y 160 minutos con lecturas cada 20 minutos); encontraron que el tipo de solvente, la frecuencia de operación del sonicador y la temperatura fueron los factores más importantes que influyeron en la extracción de hesperidina, y definieron como condiciones óptimas de extracción: metanol, como solvente; frecuencia, 60 kHz; temperatura, 40°C, y tiempo de extracción, 60 minutos, aunque se observó que un mayor tiempo de extracción no degrada el producto extraído. Un esquema del equipo utilizado para la extracción se muestra en la figura 3 ²⁷.

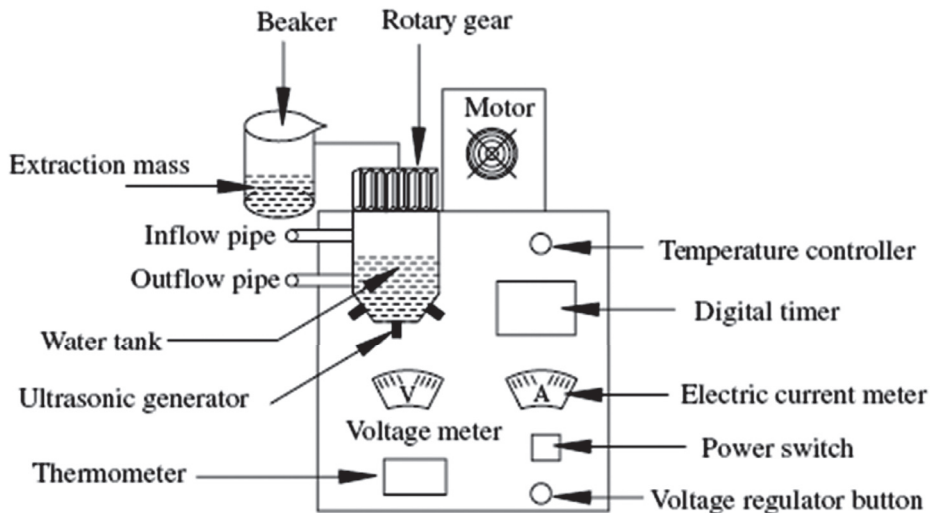


Figura 3. Esquema del equipo propuesto por Ma y colaboradores para la extracción de hesperidina asistida por ultrasonido ²⁷

En la tabla 2, se muestra una recopilación de métodos de extracción que buscan la obtención de polifenoles a partir de cáscaras de cítricos. Se puede apreciar el tipo de material vegetal utilizado, las condiciones de extracción, el tipo de solvente y el rendimiento obtenido.

Son varias las metodologías de extracción de antioxidantes a partir de cáscaras de cítricos, entre ellas, la extracción con solventes, extracción en medio alcalino, extracción asistida por ultrasonido y extracción enzimática. En la **tabla 2** están descritas las condiciones de cada uno de estos métodos y a continuación se detallan sus características:

Guimarães y colaboradores²⁸ presentan un estudio comparativo de la composición (compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, ácido ascórbico, carotenoides totales, azúcares reductores) y la capacidad antioxidante (DPPH, CRHF, decoloración de β -caroteno, inhibición de peroxidación lipídica medida como SRAT) de extractos metanólicos de cáscaras de cítricos (toronja, lima, limón, naranja). El trabajo no profundiza en el proceso de extracción, pues éste presenta condiciones fijas aplicadas a todos los materiales vegetales.

Zia-ur-Rehman²⁹ evaluó el rendimiento (g extracto/100 g cáscaras secas) en la obtención de extractos de diferente polaridad a partir de cáscaras de cítricos. Si bien, el autor no reporta ningún dato acerca de la composición de estos extractos, evalúa el extracto metanólico sobre un modelo de oxidación de aceite de maíz, y encuentra que este extracto presenta una protección 8–10 veces mayor que los antioxidantes utilizados como control (Butilhidroxitolueno (BHT), Butilhidroxianisol (BHA)).

Anagnostopoulou y colaboradores³⁰ evaluaron el uso de diferentes solventes (diclorometano, metanol y fraccionamiento del extracto metanólico con dietiléter, acetato de etilo, n-butanol y agua) para la obtención de extractos a los cuales se les midió el contenido total de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante por los métodos de DPPH y estabilización de radical hidroxilo. Los resultados mostraron que la fracción de acetato de etilo presenta el mayor contenido de compuestos fenólicos totales y la mayor actividad antioxidante.

En cuanto a la extracción acuosa, Xu y colaboradores³¹, evaluaron la eficiencia de una infusión de cáscaras de dos variedades de cítricos (Satsuma y Ponkan) para obtener extractos acuosos ricos en minerales, flavanonas glicosiladas, polimetoxiflavanonas y ácidos fenólicos; adicionalmente, evaluaron la capacidad antioxidante de las infusiones utilizando los métodos DPPH y CRHF (expresado como TEAC). En general, los resultados mostraron que entre los flavonoides, hesperidina fue extraída en menor proporción, comparada con narirutina, nobiletina y tangeritina. El trabajo muestra también que una segunda extracción resulta necesaria para obtener una mayor cantidad de compuestos fenólicos; asimismo, se evidencia que la prolongación del tiempo de extracción o el aumento en la

temperatura del agua no aumentan el rendimiento de extracción ni la actividad antioxidante.

Por su parte, Li y colaboradores³² evaluaron las condiciones para la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscaras de cítricos utilizando extracción acuosa con diferentes tipos de celulosas comerciales (Cellulase MX[®], Cellulase CL[®] y Kleepase AFP[®]). El trabajo utilizó inicialmente limón Meyer como un modelo para evaluar el efecto del tiempo y la temperatura de extracción, y encontró que el uso de celulosa reduce a la mitad (de 6 a 3 horas) el tiempo necesario para la extracción de alrededor de 0.4–0.5 mg EGA/g de cáscaras secas. Adicionalmente, una temperatura de 50°C fue considerada apropiada para el funcionamiento de todas las celulosas probadas. Todas las enzimas fueron probadas sobre cáscaras de limón Ben Yen, limón Meyer, toronja, naranja y mandarina, y se concluyó que las cáscaras de toronja presentan el mayor contenido de compuestos fenólicos, seguida de mandarina, limón Ben Yen, naranja y limón Meyer. En todos los casos, excepto naranja, la Cellulase MX[®] presenta la mayor eficiencia en la extracción de compuestos fenólicos. Adicionalmente, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por el método de CRHF y se mostró que la extracción con celulosas incrementa ligeramente la actividad antioxidante, al compararla con extractos obtenidos con agua y para algunos extractos se alcanza una actividad comparable a la obtenida con un extracto etanólico de las cáscaras.

Con respecto a la extracción en medio alcalino, Di Mauro y colaboradores²⁶ desarrollaron un procedimiento para la obtención de hesperidina a partir de residuos (cáscaras) generadas en una industria de procesamiento de jugo de cítricos. La metodología está fundamentada en la extracción de hesperidina a partir de las cáscaras utilizando hidróxido de calcio, lo cual permite la solubilización de la forma abierta de hesperidina (hesperidin chalcona) a la vez que ocurre la precipitación de la pectina en forma de pectato de calcio. Luego, la hesperidina es diluida en medio ácido, se carga sobre una resina de estirenodivinilbenceno y es desorbida con soluciones alcalinas diluidas (NaOH 0.5N con 10% de etanol). El extracto resultante es precipitado por acidificación para recuperar la hesperidina.

En cuanto a la extracción asistida por ultrasonido, Ma y colaboradores³³ comparan la extracción asistida con ultrasonido y la extracción por maceración, además muestran el efecto de algunos parámetros de la extracción asistida por ultrasonido (potencia (3.2, 8, 30 y 56 W), temperatura (15, 30 y 40°C) y tiempo (10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos)) sobre el contenido de compuestos fenólicos determinados individualmente (ácido cafeico, ácido *p*-coumarico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanillico, narirutina y hesperidina), el contenido total de compuestos fenólicos medidos por el método de Folin-Ciocalteau y la actividad antioxidante medida por el método de CRHF.

Los resultados muestran que la extracción asistida por ultrasonido genera rendimientos más altos en tiempos más cortos, comparada con la extracción convencional. Adicionalmente, en la extracción asistida por ultrasonido, se evidencia que el aumento de la temperatura entre 15 y 30°C, el aumento del tiempo de extracción entre 10 y 40 minutos y el aumento de la potencia entre 3.2 y 8W, generan un efecto positivo sobre la extracción de los compuestos fenólicos; sin embargo, valores superiores parecen degradar algunos de los compuestos fenólicos (ácido cafeico, ácido *p*-coumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido *p*-hidroxibenzoico). No obstante, cuando se evalúa el contenido total de compuestos fenólicos, se observa que el aumento de la temperatura hasta 40°C no afecta negativamente la extracción, mientras que el comportamiento del tiempo y la potencia fue el mismo que se presentó al evaluar los compuestos individualmente.

Este hecho se explica debido a que es posible que a temperaturas de 40°C se degraden algunos de los compuestos extraídos, pero que a esta misma temperatura se extraigan más eficientemente algunos compuestos fenólicos que no están siendo cuantificados individualmente, pero que son detectados por el método de Folin-Ciocalteu.

En otro trabajo, Ma y colaboradores³⁴ muestran la optimización de la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscaras de mandarina del cultivar Penggan, utilizando un diseño Box Behnken para evaluar el efecto de la potencia del baño ultrasónico (medida en W), la temperatura (°C) y el tiempo de extracción (minutos) sobre el contenido total de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante medida por los métodos CRHF y DPPH.

Los resultados muestran que, en general, los factores evaluados presentan un efecto positivo sobre las variables respuesta, sin embargo, por encima de 45W, 34°C y 25 minutos, el efecto es negativo, lo cual puede ser atribuido a que en esas condiciones se generan altas presiones y temperaturas localizadas que provocan la degradación de los compuestos fenólicos. Las condiciones óptimas se obtuvieron mediante análisis de superficie de respuesta y posteriormente el modelo fue verificado para confirmar que los parámetros seleccionados maximizan todas las respuestas.

Otro trabajo, publicado también por Ma y colaboradores²⁷, evaluó el efecto de las principales condiciones de extracción asistida por ultrasonido sobre el rendimiento de hesperidina. Las variables evaluadas fueron: potencia del baño ultrasónico (3.2, 8, 30, 56W), frecuencia del baño ultrasónico (20, 60, 100 kHz), tipo de solvente (metanol, etanol, isopropanol), temperatura (30, 40, 50°C) y tiempo de extracción (20–160 minutos). Los resultados mostraron que el tipo de solvente, la frecuencia y la temperatura, fueron las variables que más afectaron positivamente el rendimiento de extracción.

Adicionalmente, Khan y colaboradores³⁵ mostraron la extracción de hesperidina y naringina a partir de cáscaras de naranja. En un estudio preliminar de-

terminaron el tamaño de partícula en el material vegetal que genera el mayor rendimiento en la obtención de flavonoides, siendo 2 cm² el tamaño óptimo. Posteriormente ejecutaron un diseño central compuesto para determinar el efecto de algunas variables del proceso de extracción sobre el rendimiento de flavonoides (temperatura (10, 25, 40°C), potencia del baño ultrasónico (50, 100, 150 W) y proporción etanol:agua (20, 50, 80%). Las condiciones óptimas de extracción fueron determinadas mediante un análisis de superficie de respuesta, que mostró unos parámetros óptimos de temperatura de extracción a 40°C, potencia del baño ultrasónico de 150W y proporción etanol:agua 4:1.

Por otra parte, nosotros³⁶ mostramos recientemente el desarrollo de un método que combina la extracción acuosa en medio alcalino con la extracción asistida por ultrasonido. El método fue optimizado utilizando cáscaras de mandarina para evaluar el efecto sobre el rendimiento de extracción y el contenido total de compuestos fenólicos, de la humedad del material vegetal (0 y 75%) y el tiempo de extracción (30 y 90 minutos) y manteniendo fijas las demás condiciones (material vegetal/solvente: 1/10 g/mL, agente basificante: hidróxido de calcio (Ca(OH)₂) 0.25M, frecuencia del baño ultrasónico: 60 kHz). El método se aplicó en cáscaras de mandarina, lima y naranja, se evaluó el contenido total de compuestos fenólicos y se caracterizaron las fracciones obtenidas por HPLC/MS. Se evaluó también la capacidad antioxidante de las fracciones obtenidas sobre un modelo de oxidación de LDL humana, profundizando en la actividad antioxidante de la fracción flavonoide de mandarina. Adicionalmente, se mostró la capacidad antioxidante diferencial de los flavonoides presentes en las fracciones.

Métodos para caracterización de flavonoides

Se ha desarrollado una gran cantidad de procedimientos aplicados al análisis de flavonoides, lo cual refleja la complejidad de las matrices de análisis y la diversidad de escenarios que se presentan en el reto analítico. En algunos casos, basta conocer el perfil de flavonoides presentes en la muestra con el fin de concluir sobre las variaciones en la composición; en otros casos será necesario aplicar procedimientos que permitan la cuantificación, mientras que en algunas circunstancias, cuando se trata de sustancias desconocidas, se requiere el aislamiento y caracterización estructural.

Por lo tanto, el diseño del procedimiento analítico dependerá del interés del análisis. Por ejemplo, en estudios de perfil y cuantificación de flavonoides, la aproximación más útil ha sido la cromatografía, preferiblemente cromatografía de alta eficiencia (HPLC) debido a la complejidad de la matriz que normalmente se analiza y a la diversidad estructural de los compuestos presentes allí. Por otro lado, cuando se requiere identificación, se hace necesario el uso de técnicas espectrométricas (Resonancia Magnética Nuclear–RMN y Espectrometría de Masas–

EM), en algunos casos acopladas a métodos de separación cromatográfica (técnicas hífenadas).

La cromatografía líquida de alta eficiencia combina las ventajas de la separación, cuantificación e identificación, esta última cuando se acopla a espectrometría de masas (EM), permitiendo así la resolución incluso de flavonoides isoméricos³⁷.

En los últimos 20 años, la EM ha mostrado ser una de las técnicas más efectivas en investigación, principalmente en el análisis de mezclas complejas que requieren alta sensibilidad, especificidad, combinación con técnicas de separación, y posibilidad de miniaturización para analizar gran cantidad de muestras en poco tiempo, utilizando la menor cantidad de muestra posible³⁸.

Sin embargo, antes que esto sucediera, debió superarse el mayor obstáculo que impedía el acople de la cromatografía líquida a espectrometría de masas, el cual radicaba en el reto de convertir la fase móvil de la separación, generalmente mezclas de agua y solventes orgánicos, en una fase gaseosa con especies iónicas, preferiblemente sin la aplicación de calor. Este problema solo se resolvió hasta finales del siglo XX con la aparición de las interfaces de ionización a presión atmosférica (IPA), específicamente la interfaz de ionización por electro spray (IES)³⁸.

El proceso IES es altamente dependiente de la química en solución y del comportamiento superficial de los iones del analito; de hecho, la presencia de especies iónicas preformadas en el eluente de la separación cromatográfica es esencial para la formación de iones en la fase gaseosa, por lo tanto, los cambios de fase móvil, pH y condiciones de ionización determinan la posibilidad de obtener éxito en un análisis por HPLC/MS³⁹.



Figura 4. Equipo de HPLC/MS marca Agilent® serie 1200

Tabla 2. Comparación de métodos de extracción aplicados a cáscaras de cítricos para la obtención de compuestos fenólicos (¹ PF: Peso Fresco, ² PS: Peso Seco, ³ CFT: Compuestos Fenólicos Totales).

Material vegetal	Condiciones de extracción	Solvente y relación sól:líqu	Rendimiento/composición	Ref.
Extracción con solventes				
Cáscaras de toronja, lima, limón y naranja valencia, liofilizadas y pulverizadas	Agitación a 25°C, 150 rpm, 12 horas	Metanol 3/50	<i>(g extracto /100 g cáscara PF¹)</i>	28
			Toronja 50.13	
			Lima 15.18	
			Limón 44.68	
			Naranja 37.27	
			CFT (mg EGA /g extracto)	
			Toronja 55.88	
Lima 124.63				
Limón 87.77				
Naranja 79.75				
Cáscaras de cítricos, secas, molidas y tamizadas (tamaño>0.18 mm)	Agitación toda la noche a temperatura ambiente	Etanol, Metanol, Acetona, Hexano, Éter de Petróleo, Dietil éter	<i>(g extracto /100 g cáscara PS²)</i>	29
			Etanol: 11.00	
			Metanol: 19.87	
			Acetona: 15.00	
			Hexano: 9.12	
			Éter de Petróleo: 7.88	
Dietil éter: 12.75				
Cáscaras (flavado) de naranja, secas y molidas	3 extracciones sucesivas de las cáscaras (277.4g) en Soxhlet (1L) con diclorometano y posteriormente metanol. Fraccionamiento del extracto metanólico (108 g) disuelto en agua (2L) y extraído con dietil éter, acetato de etilo, n-butanol y agua (6 extracciones x 150 mL de cada solvente).		CFT³ (mg EGA/g extracto)	30
			Diclorometano: 10.0	
			Dietil eter: 17.2	
			Acetato de etilo: 105	
			n-butanol: 42.7	
			Agua: 7.9	
			CFT (mg EGA/g cáscara PS)	
Diclorometano: 10.1				
Dietil eter: 8.0				
Acetato de etilo: 66.9				
n-butanol: 188				
Agua: 254				

Tabla 2. Continuación

Extracción acuosa			
			mg HD/g cáscara PS
			Primera extracción
			2.47 (Sat)
			3.55 (Pon)
			Segunda extracción
			1.55 (Sat)
			2.45 (Pon)
Cáscaras de mandarina Satsuma (Sat) y Ponkan (Pon), secas y molidas	Dos extracciones por infusión con agua caliente durante 30 minutos	Agua 1/20	CFT (mg EGA/g cáscara PS) 31
			Primera extracción
			31 (Sat)
			32 (Pon)
			Segunda extracción
			10 (Sat)
			12 (Pon)
			CFT (mg EGA/g cáscara)
			Extracción acuosa
			limón Benyen: 0.89
			limón Meyer: 0.37
			Toronja: 0.93
			Naranja: 0.73
			Mandarina: 1.12
			1.5% enzima
			limón Benyen: 0.97
			limón Meyer: 0.53
			Toronja: 1.51
			Naranja: 0.86
			Mandarina: 1.35
			Extracción en medio alcalino
			mg HD/g cáscara PS
Cáscaras de naranja sanguina provenientes de un extractor de jugos, trituradas hasta alcanzar un tamaño menor a 3mm	Cáscaras tratadas durante 1h a 60°C con una solución saturada de Ca(OH) ₂ hasta alcanzar pH 12. El extracto fue neutralizado y cargado en una columna con resina de SDVB y la HD eluida con NaOH y precipitada a pH 3.5	200 g de cáscara, 50 g Ca(OH) ₂ , 1000 g agua.	18.6 mg HD/g cáscara PS 26

Tabla 2. Continuación

Extracción Asistida por Ultrasonido				
cáscaras de mandarina Penggan, secas, molidas, tamizadas a 0.45–1 mm	Potencia: 42–45W, Tiempo: 23–25 min, Temperatura: 31–34°C.	Metanol. 1:40.	19.12 mg EGA/g cáscara PS	33
Cáscaras de mandarina satsuma, secas, molidas, tamizadas a 0.45–1 mm	Intensidad: 20kHz, Potencia: 8W, Tiempo: 40 min, Temperatura: 40°C.	Metanol 80% 1:20.	22 mg EGA/g cáscara PS	34
Cáscaras de mandarina Penggan, secas, molidas, tamizadas a 0.45–1 mm	Intensidad: 60 kHz, Potencia: 30W, Tiempo: 60 min, Temperatura: 40°C.	Metanol 1:20.	57 mg HD/g cáscara PS	27
Cáscaras de naranja, frescas, cortadas a un tamaño de 2 cm ²	Intensidad: 25 kHz, Potencia: 150 W, Tiempo: 30 min, Temperatura: 40°C	Etanol:Agua 80:20 1:4.	2.33 mg EGA /g cáscara PF 0.70 mg NAR y 2.05 mg HD/g PF	35
Cáscaras de mandarina, secas, molidas, tamizadas a 0.2 mm	Intensidad: 60 kHz, Tiempo: 30 min, Temperatura: 40°C.	Agua 1:10.	19.60 mg EGA /g cáscara PS 40.25 mg Fracción Flavonoide/g cáscara PS	36
Cáscaras de lima, mandarina y naranja, secas, molidas, tamizadas a 0.2 mm	Intensidad: 60 kHz, Tiempo: 30 min, Temperatura: 40°C.	Agua 1:10.	mg EGA/g extracto Lima 74.8 Naranja 58.7 Mandarina 66.4	

Para optimizar los parámetros de la ionización es necesario cambiar un parámetro a la vez para detectar su efecto sobre la abundancia de iones formados. Para esto, se ha utilizado ampliamente una aproximación llamada Análisis por Inyección en Flujo (AIF) (FIA, del inglés Flow Injection Analysis), el cual consiste en

la inyección continua de pequeños volúmenes de muestra en el espectrómetro de masas, cambiando cada vez un parámetro en una matriz experimental, lo cual permite obtener las mejores condiciones de ionización ⁴⁰. Los parámetros que pueden ser modificados para aumentar la ionización son:

- **Temperatura del nebulizador.** La fase móvil de la separación cromatográfica entra a una cámara a presión atmosférica a través de una aguja que nebuliza el solvente, formando gotas cargadas que se evaporan gracias a un gas de secado con flujos alrededor de 13 L/min y calentado alrededor de 350°C. Cuando las gotas alcanzan un tamaño crítico donde la repulsión entre las cargas es mayor que la fuerza de tensión superficial, la gota explota y libera, en forma de clústeres, las especies cargadas en la fase gaseosa.
- **Voltaje del capilar.** En la gota cargada, los iones se mueven por migración electrofórica hacia la superficie para ser transferidos a la fase gaseosa, y es necesario un campo eléctrico para deflectar las gotas hacia una cámara de vacío a través de un capilar de sílica fundida cuyas funciones son: 1) separar el ambiente de presión atmosférica de la cámara de ionización y el ambiente de alto vacío del espectrómetro y 2) iniciar la separación de los iones de las gotas cargadas. El voltaje del capilar es un parámetro que puede ser ajustado normalmente entre 1 y 5 kV, y su valor depende de otras condiciones como composición de la fase móvil y peso molecular de los analitos.
- **Voltaje del cono o fragmentor.** Los iones generados en la interfase y pasados por el capilar, necesitan ser transferidos al espectrómetro a través de un orificio, lo cual se logra aplicando una diferencia de potencial entre el orificio y la etapa siguiente (preanálizador cuadrupolar); esta diferencia de potencial (llamada voltaje del cono) disocia los clústeres de iones formados en la fuente de ionización y logra una disociación inducida por colisiones (DIC). A altos voltajes (50–150 V), se genera una fragmentación de los iones, iniciada incluso desde el final del capilar. El valor del voltaje del cono depende principalmente del peso molecular del analito, su carga, estabilidad y el grado de fragmentación que se desea.

El espectro de masas generado por un sistema de IES se caracteriza por un ion pseudo molecular dominante, con poca o ninguna fragmentación, de tal manera que, en muy pocas ocasiones, un análisis por IES logra generar información suficiente para una completa caracterización estructural. No obstante, otras aproximaciones como espectrometría en tándem (EM/EM o EMⁿ) han logrado caracterizar químicamente muchas sustancias, entre ellas flavonoides de cítricos presentes en residuos agroindustriales, formulaciones farmacéuticas, jugos y fluidos biológicos ⁴¹.

En general, los análisis por HPLC/MS con DIC pueden generar información estructural para caracterizar flavonoides glicosilados, proporcionando información acerca de la secuencia de carbohidratos, el tipo de enlace diglicosídico y el tipo de aglicona, de acuerdo con el patrón de fragmentación que se observa en la **figura 5**.

En la **figura 6**, el aumento en el voltaje de fragmentación genera cambios considerables en el espectro de masas de la hesperidina. En general, a bajos voltajes de fragmentación se observa la presencia del ion molecular [M+H]⁺ que

aparece a m/z 611, acompañado de aductos con sodio $[M+Na]^+$ a m/z 633 y potasio $[M+K]^+$ a m/z 649; adicionalmente se observa una escasa fragmentación, dominada principalmente por rompimientos en el azúcar donde se destacan los iones m/z 449 y 465, correspondientes a los los fragmentos $[Z_1+H]^+$ y $[Y_1+H]^+$, respectivamente, los cuales se deben a la pérdida del azúcar terminal (ramnosa).

A medida que aumenta el voltaje de fragmentación, desaparece el ion molecular y aparece el ion m/z 303 equivalente a la porcion aglicona del flavonoide $[Y_0+H]^+$, característico de la pérdida simultánea de los azúcares glucosa y ramnosa.

Finalmente, a altos voltajes de fragmentación no se generan rompimientos entre los azúcares, prevalecen los iones m/z 649, 633, 303 y aparecen iones $[^{1,4}B_0-H_2+H]^+$ a m/z 153 y $[^{1,3}A_0+H]^+$ a m/z 177, característicos de rompimientos tipo Retro Diels-Alder en el del anillo C de la aglicona.

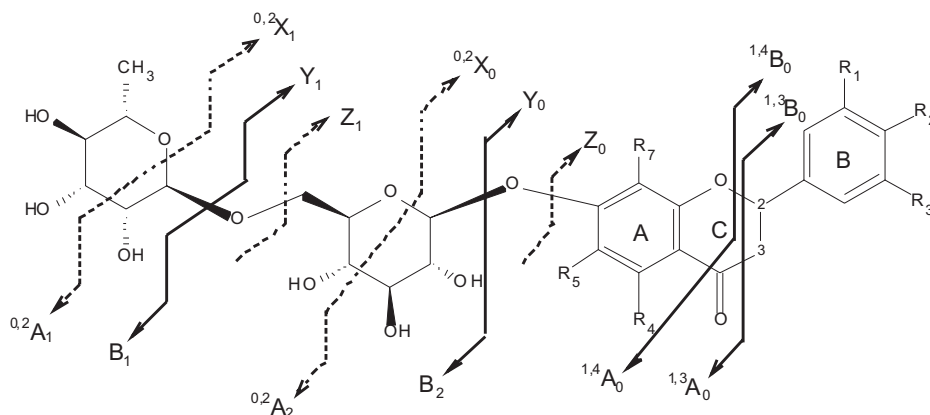
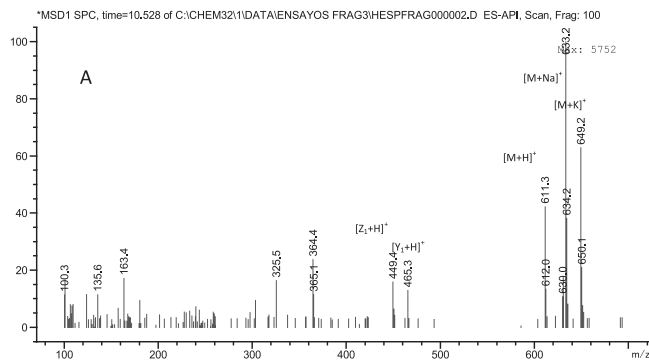


Figura 5. Patrón de fragmentación y nomenclatura de los iones generados por un flavonoide diglicosilado en espectrometría de masas



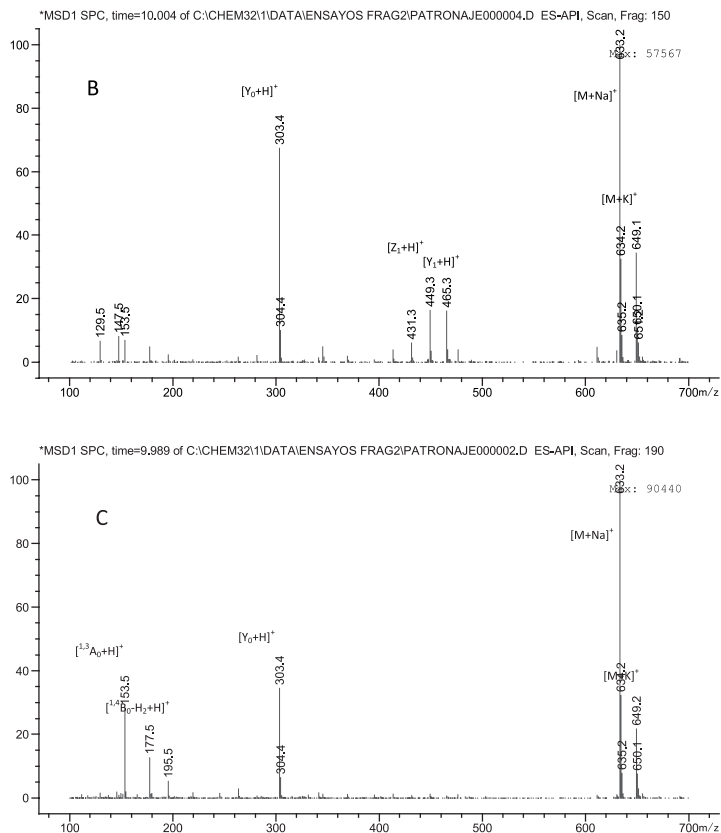


Figura 6. Espectros de masas de hesperidina obtenidos bajo diferentes voltajes de fragmentación (voltaje del cono). A: 100V, B: 150V, C: 190V.

Conclusiones

Una de las principales razones para el escaso aprovechamiento de los residuos de la agroindustria cítrica es la falta de métodos de extracción efectivos para obtener sustancias con la calidad requerida para servir como materia prima en otros procesos. En este sentido, la extracción acuosa asistida por ultrasonido es una de las herramientas con mayor perspectiva en la extracción de compuestos bioactivos, minimizando los problemas presentados con las técnicas de extracción convencional.

La obtención de flavonoides a partir de residuos agroindustriales implica, no solo el desarrollo de una metodología de extracción limpia y con alto rendimiento, sino también el montaje de procedimientos analíticos que permitan una valoración de las sustancias obtenidas, ya sea mediante la caracterización individual de los componentes (HPLC/MS) o la estimación del contenido total de compuestos.

Referencias

1. WINKEL-SHIRLEY B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology* 2002;5:218-23.
2. TOMÁS-BARBERÁN F, MICHAEL NC. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000;80:1073-80.
3. TIWARI A. Imbalance in antioxidant defence human diseases: Multiple approach of natural antioxidant therapy. *Current Science* 2001;81:1179-87.
4. ROUSEFF RL, MARTIN SF, YOUTSEY CO. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;35:1027-30.
5. ROBARDS K, ANTOLOVICH M. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids: A Review. *Analyst* 1997;122:11-34.
6. MADR MDAYDR. Documento de trabajo 107: La cadena de citricos en colombia. Observatorio de competitividad - agrocadenas 2005:8-25.
7. BRADDOCK RJ. By-products of citrus fruits. *Food Technology* 1995;49:74-7.
8. PANDEY A, SOCCOL CR, NIGAM P, SOCCOL VT. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 2000;74:69-80.
9. SCHIEBER A, STINTZING FC, CARLE R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science and Technology* 2001;12:401-13.
10. PANDEY A, SOCCOL CR, NIGAM P, SOCCOL VT, VANDENBERGHE LPS, MOHAN R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology* 2000;74:81-7.
11. BALASUNDRAM N, SUNDRAM K, SAMMAN S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 2006;99:191-203.
12. KAWAII S, TOMONO Y, KATASE E, et al. Quantitative study of flavonoids in leaves of citrus plants. *Journal of agricultural and food chemistry* 2000;48:3865-71.
13. OGAWA K, KAWASAKI A, YOSHIDA T, et al. Evaluation of auraptene content in citrus fruits and their products. *Journal of agricultural and food chemistry* 2000;48:1763-9.
14. RICE-EVANS C, MILLER N, PAGANGA G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 1997;2:152-9.
15. HAVSTEEN BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics* 2002;96:67-202.
16. LYSENG-WILLIAMSON KA, PERRY CM. Micronised purified flavonoid fraction: a review of its use in chronic venous insufficiency, venous ulcers and haemorrhoids. *Drugs* 2003;63:71-100.

17. GROHMANN K, MANTHEY JA, CAMERON RG. Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures. *Carbohydrate Research* 2000;328:141-6.
18. GORINSTEIN S, MARTN-BELLOSO O, PARK YS, et al. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry* 2001;74:309-15.
19. COLL MD, COLL L, LAENCINA J, TOMÁS-BARBERÁN F. Recovery of flavanones from wastes of industrially processed lemons. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 1998;206:404-7.
20. LUQUE-GARCA JL, LUQUE DE CASTRO MD. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2003;22:41-7.
21. HIGBY RH. Method of manufacturing hesperidin. US Patent 1946;2400693.
22. LOPEZ SANCHEZ M. Procedure for obtaining hesperidin from citrus. Spanish Patent 1986;545275.
23. LO CURTO R, TRIPODO MM, LEUZZI U, GIUFFRE D, VACCARINO C. Flavonoids recovery and SCP production from orange peel. *Bioresource Technology* 1992;42:83-7.
24. INABA N, AYANO S, OZAKI Y, MIYAKE M, MAEDA H, IFUKU YH. Extraction and recovery of hesperidin from peel residue of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*, Marc) using enzymes. *J Jpn Soc Food Sci Technol* 1993;40:833-40.
25. EL-NAWAWI SA. Extraction of citrus glucosides. *Carbohydrate Polymers* 1995;27:1.
26. DI MAURO A, FALLICO B, PASSERINI A, RAPISARDA P, MACCARONE E. Recovery of hesperidin from orange peel by concentration of extracts on styrene-divinylbenzene resin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999;47:4391-7.
27. MA Y, YE X, HAO Y, XU G, XU G, LIU D. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrason Sonochem* 2008;15:227-32.
28. GUIMARÃES R, BARROS L, BARREIRA JCM, SOUSA MJ, CARVALHO AM, FERREIRA ICFR. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*;48:99-106.
29. ZIA UR R. Citrus peel extract - A natural source of antioxidant. *Food Chemistry* 2006;99:450-4.
30. ANAGNOSTOPOULOU MA, KEFALAS P, PAPAGEORGIOU VP, ASSIMOPOULOU AN, BOSKOU D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry* 2006;94:19-25.
31. XU GH, CHEN JC, LIU DH, ZHANG YH, JIANG P, YE XQ. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of food science* 2008;73:11-8.
32. LI BB, SMITH B, HOSSAIN MM. Extraction of phenolics from citrus peels. *Separation and Purification Technology* 2006;48:189-96.
33. MA Y-Q, YE X-Q, FANG Z-X, CHEN J-C, XU G-H, LIU D-H. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Satsuma

- Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56:5682-90.
34. MA YQ, CHEN JC, LIU DH, YE XQ. Effect of ultrasonic treatment on the total phenolic and antioxidant activity of extracts from citrus peel. *Journal of food science* 2008;73:115-20.
 35. KHAN MK, ABERT-VIAN M, FABIANO-TIXIER A-S, DANGLES O, CHEMAT F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*;119:851-8.
 36. LONDOÑO-LONDOÑO J, LIMA VRD, LARA O, et al. Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry* 2010;119:81-7.
 37. ZHOU D-Y, XU Q, XUE X-Y, ZHANG F-F, LIANG X-M. Identification of O-diglycosyl flavanones in *Fructus aurantii* by liquid chromatography with electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2006;42:441-8.
 38. PRASAIN JK, WANG CC, BARNES S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine* 2004;37:1324-50.
 39. ZHOU S, HAMBURGER M. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry in natural product analysis. *Journal of Chromatography A* 1996;755:189-204.
 40. HANSEN EH. The impact of flow injection on modern chemical analysis: has it fulfilled our expectations? And where are we going? *Talanta* 2004;64:1076-83.
 41. DEL RIO JA, FUSTER MD, GOMEZ P, PORRAS I, GARCIA-LIDON A, ORTUNO A. Citrus limon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chemistry* 2004;84:457-61.