

# INFLUENCIA DE DIFERENTES VARIABLES EXPERIMENTALES EN LA COMPOSICIÓN DEL COMPLEJO DE BIOFLAVONOIDES DEL LIMÓN (CBL)

O. Cartaya<sup>✉</sup>, Inés Reynaldo y Clara Nogueiras

**ABSTRACT.** This work was aimed at studying the influence of different experimental variables: residue/water (w/v) proportion, extraction temperature and time on yield and LBC composition through a 2<sup>3</sup> factorial experimental design, each experiment evaluating yield, total and reducing sugar contents, total flavonoid concentration and total acidity. It was evident the relationship existing between the variables evaluated and experimental conditions selected as well as the interaction that may exist among these experimental variables, which enabled to select maximum yield and composition conditions to obtain LBC.

*Key words:* flavonoids, experimentation

## INTRODUCCIÓN

El complejo de bioflavonoides del limón (CBL) se extrae de la corteza de los frutos de este cultivo. La composición de la corteza de los frutos cítricos es muy variada y se destacan entre sus constituyentes los flavonoides, polisacáridos, ácidos orgánicos, aceites esenciales y azúcares (1); la concentración de estos compuestos depende y varía de acuerdo con múltiples factores, entre ellos la especie, el 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); sin embargo, se conoce muy poco acerca de cómo influyen las condiciones experimentales en el contenido de los principales constituyentes del CBL, o cuál combinación de las variables experimentales es la necesaria para lograr un máximo contenido de los constituyentes de mayor significación biológica en el CBL, por lo que en este trabajo se estudia la influencia que ejercen diferentes variables experimentales: la relación (m/v) residuo/agua, el tiempo de extracción y la temperatura del medio en el

**RESUMEN.** En este trabajo se estudió la influencia de las variables experimentales: proporción (m/v) residuo/agua, la temperatura y el tiempo de extracción en el rendimiento y la composición del CBL a través de un diseño experimental factorial 2<sup>3</sup>. Para cada experiencia se evaluó el rendimiento, el contenido de azúcares totales y reductores, la concentración de flavonoides totales y la acidez total, evidenciándose la relación que existe entre las variables evaluadas y las condiciones experimentales seleccionadas, así como la interacción que puede existir entre estas variables experimentales, lo que permitió seleccionar las condiciones de máximo rendimiento y composición en la obtención del CBL.

*Palabras clave:* flavonoides, experimentación

rendimiento y la composición del complejo de bioflavonoides del limón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron frutos maduros de limón (*Citrus limon* L. Burm) de la variedad Chivo rugoso; el jugo de los frutos se extrajo manualmente y los residuos fueron molidos para obtener el CBL.

Se realizaron ocho experimentos por triplicado, según el diseño experimental factorial 2<sup>3</sup> (Tabla I) (4), donde las variables codificadas se ajustaron a dos niveles: alto (+1) y bajo (-1).

**Tabla I. Diseño de los experimentos**

Experimentos	Residuo/agua (X <sub>1</sub> ) (g/L)	Temperatura (X <sub>2</sub> ) (°C)	Tiempo (X <sub>3</sub> ) (min)
1	100	27	30
2	200	27	30
3	100	100	30
4	200	100	30
5	100	27	90
6	200	27	90
7	100	100	90
8	200	100	90

La mezcla se filtró al final del proceso y el filtrado se liofilizó para evaluar el rendimiento.

A las muestras se les determinaron el contenido de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico (5), los

Ms.C. O. Cartaya, Investigador; Dr.C. Inés Reynaldo, Investigador Titular del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana; Dr.C. Clara Nogueiras, Profesor Titular, Facultad de Química, Universidad de La Habana

✉ ocartaya@inca.edu.cu

azúcares reductores (6), en ambos casos se utilizó glucosa como patrón, la concentración de flavonoides totales (7), utilizando hesperidina como patrón y la acidez soluble total se determinó por análisis volumétrico; 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.

Los resultados del diseño experimental para cada constituyente del CBL se ajustaron a un polinomio lineal a través del paquete estadístico Statgraphics Plus versión 2.

## RESULTADOS

El rendimiento es un parámetro que permite evaluar la eficiencia del proceso extractivo. Los resultados (Tabla II) muestran que existe una variación notable del rendimiento con las variables ensayadas, ya que se obtuvieron valores que oscilan entre 89,6 mg/g (experimento 8) y 25.3 mg/g (experimento 1).

**Tabla II. Rendimiento obtenido del CBL de la variedad Chivo rugoso**

Experimentos	Residuo/agua (X <sub>1</sub> ) (g/L)	Temperatura (X <sub>2</sub> ) (°C)	Tiempo (X <sub>3</sub> ) (min)	Rendimiento (mg/g)
1	100	27	30	25.3
2	200	27	30	26.13
3	100	100	30	48.33
4	200	100	30	72.27
5	100	27	90	44.93
6	200	27	90	75.1
7	100	100	90	82.9
8	200	100	90	89.6

La influencia de las variables experimentales sobre el rendimiento se determinó por ajuste de los datos obtenidos a un polinomio lineal, donde cada uno de los coeficientes del polinomio caracteriza uno de los factores o interacciones entre ellos; así, el signo positivo o negativo de un coeficiente indica una proporcionalidad directa o inversa respectivamente del factor al cual caracteriza, mientras que el valor absoluto permite seleccionar qué variables experimentales o interacciones son las más influyentes (7).

Como puede observarse (Ec. 1), las variables más influyentes en el rendimiento del CBL en orden decreciente resultaron: el tiempo, la temperatura y la proporción (m/v) residuo/agua.

$$(Ec.1) \text{ Rendimiento} = 17.9837 + 2.5755 X_1 + 5.1682 X_2 + 5.3204 X_3$$

### Análisis de varianza para una regresión completa

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
Modelo	1479.6	3	493.198	60.35	0.0
Errores	163.453	20	8.17267		
Total	1643	23			
$r^2$ (ajustado para GL)=0.9703 ES=2.8588 F crítica= 1.15					

Al ampliar el tiempo de extracción, aumenta el rendimiento del CBL, pues es mayor el tiempo de interacción entre el soluto y el solvente, posibilitando la degradación progresiva de los residuos, lo cual facilita la salida de los diferentes compuestos presentes en los residuos de limón.

Con el aumento de la temperatura, también se eleva el rendimiento de la extracción. Esto puede explicarse debido a que en los residuos de limón existen compuestos como los azúcares, pectinas, ácidos orgánicos y flavonoides, los cuales son ligeramente solubles en agua (8) y al aumentar la temperatura se favorece el movimiento térmico de las partículas pequeñas, favoreciendo la ruptura de las estructuras celulares y con ello se facilita la salida y disolución de los compuestos presentes en los residuos de limón, lo cual está de acuerdo con la teoría cinético molecular y el movimiento browniano, lo que trae consigo un aumento del rendimiento de la extracción.

También, al aumentar la proporción (m/v) residuo/agua, es mayor el rendimiento. Este resultado indica que al aumentar esta variable, es mayor el volumen de residuo para la extracción y, por consiguiente, mayor la cantidad de compuestos que se pueden extraer. Este hecho conduce a que se obtenga mayor masa del CBL al concluir el tiempo de agitación.

En la Tabla III se muestra el contenido de azúcares totales en los CBL en los experimentos realizados; sus valores oscilan entre 11.70 mg/g (experimento 1) y 89.76 mg/g (experimento 8).

**Tabla III. Contenido de azúcares totales del CBL**

Experimentos	Residuo/agua (X <sub>1</sub> ) (g/L)	Temperatura (X <sub>2</sub> ) (°C)	Tiempo (X <sub>3</sub> ) (min)	Azúcares totales (mg/g)
1	100	27	30	11.70
2	200	27	30	21.06
3	100	100	30	17.42
4	200	100	30	50.19
5	100	27	90	63.28
6	200	27	90	60.64
7	100	100	90	87.33
8	200	100	90	89.76

Los resultados en el contenido de azúcares totales se ajustaron a un modelo similar al planteado para el rendimiento (Ec. 2); a partir de los datos presentados se evidencia que las variables: tiempo de extracción, temperatura, interacción tiempo.\*prop. (m/v) residuo/agua, proporción (m/v) residuo/agua y la interacción tiempo.\*prop. (m/v) residuo/agua, en ese orden fueron las más influyentes.

$$(Ec. 2) \text{ Azúcares totales} = 50.1733 + 5.24X_1 + 11.0017X_2 + 25.0808X_3 + 3.5617X_1X_2 + 5.2908X_1X_3$$

### Análisis de varianza para una regresión completa

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
Modelo	19637.3	5	3927.46	84.22	0.0
Errores	839.373	18	46.6319		
Total	20476.7	23			
$r^2$ (ajustado para GL)=0.9876 ES=6.8287 F crítica= 1.97					

Al analizar cada una de estas variables por separado, el tiempo de extracción resultó ser la variable más significativa. Al aumentar el tiempo de extracción, es mayor el contenido de azúcares en el CBL, ya que existe una gran interacción entre el agua y el residuo, lo que posibilita la mayor solubilidad de los diferentes azúcares presentes en los residuos.

Por su parte, un aumento de la temperatura provoca una mayor concentración de los azúcares, ya que la solubilidad de los azúcares aumenta con la temperatura, por elevarse el punto de saturación de la solución.

Otra de las variables encontradas como significativa, aunque en menor proporción, es la proporción (m/v) residuo/agua, ya que se aumenta el volumen de residuos para la extracción, por lo que debe existir mayor cantidad de azúcares y de esta forma se favorece su extracción hasta que se alcance el punto de saturación de la solución.

En la Tabla IV se muestra el contenido de azúcares reductores en los ocho experimentos realizados según el diseño experimental; los valores encontrados oscilan entre 3.56 mg/g (experimento 1) y 36.32 mg/g (experimento 8).

**Tabla IV. Contenido de azúcares reductores del CBL**

Experimentos	Residuo/agua (X <sub>1</sub> ) (g/L)	Temperatura (X <sub>2</sub> ) (°C)	Tiempo (X <sub>3</sub> ) (min)	Azúcares reductores (mg/g)
1	100	27	30	3.56
2	200	27	30	11.96
3	100	100	30	5.7
4	200	100	30	21.66
5	100	27	90	18.19
6	200	27	90	26.23
7	100	100	90	28.62
8	200	100	90	36.32

Como se aprecia en dicha tabla, al igual que en el rendimiento y contenido de azúcares totales en el CBL en los experimentos realizados, los resultados eran de esperarse, si se tienen en cuenta las diferentes condiciones experimentales.

El modelo obtenido se muestra en la ecuación 3. Las variables e interacciones más influyentes, en orden decreciente, fueron: el tiempo de extracción, la proporción (m/v) residuo/agua, la temperatura así como las interacciones temperatura\* tiempo, tiempo\* proporción (m/v) residuo/agua y proporción (m/v) residuo/agua\* temperatura.

$$(Ec. 3) \text{ Azúcares reductores} = 19.03 + 5.0133X_1 + 4.045X_2 + 8.3108X_3 + 0.9017X_1X_2 + 1.0775X_1X_3 + 1.0875X_2X_3$$

**Análisis de varianza para una regresión completa**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
Modelo	2729.33	6	454.89	198.07	0.0
Errores	39.0426	17	2.2966		
Total	2768.37	23			
$r^2$ (ajustado para GL)=0.9809 ES=1.5154 F crítica= 1.96					

Al aumentar el tiempo de extracción, la proporción (m/v) residuo/agua y la temperatura, es mayor el contenido de azúcares reductores en el CBL, lo cual se fundamenta con los planteamientos expuestos para estas variables en el contenido de azúcares totales.

El contenido de ácidos orgánicos (Tabla V) varía desde 12.22 mg/g (experimento 4) a 27.39 mg/g (experimento 5).

**Tabla V. Contenido de ácidos orgánicos en el CBL**

Experimentos	Residuo/agua (X <sub>1</sub> ) (g/L)	Temperatura (X <sub>2</sub> ) (°C)	Tiempo (X <sub>3</sub> ) (min)	Azúcares orgánicos (mg/g)
1	100	27	30	22.47
2	200	27	30	15.16
3	100	100	30	13.34
4	200	100	30	12.22
5	100	27	90	27.39
6	200	27	90	21.49
7	100	100	90	16.85
8	200	100	90	15.59

Como puede observarse (Ec. 4), las variables e interacciones más influyentes, en orden decreciente, fueron: la temperatura, el tiempo de extracción y la proporción (m/v) residuo/agua, así como la interacción proporción (m/v) residuo/agua\* temperatura.

$$(Ec. 4) \text{ Acidez} = 18.0633 - 1.9492X_1 - 3.5642X_2 + 2.2642X_3 + 1.3517X_1X_2$$

**Análisis de varianza para una regresión completa**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
Modelo	19637.3	5	3927.46	84.22	0.0
Errores	839.373	18	46.6319		
Total	20476.7	23			
$r^2$ (ajustado para GL)=0.9776 ES=6.8287 F crítica= 1.97					

Al analizar el comportamiento de la concentración de ácidos orgánicos con la temperatura, se observa que un aumento de esta provoca una disminución de los ácidos orgánicos en el CBL, lo cual se evidencia en el análisis de los experimentos 1 y 3. También al aumentar la proporción (m/v) residuo/agua, disminuye el contenido de los ácidos orgánicos en el CBL experimentos 1 y 2.

Los efectos de la temperatura y la proporción (m/v) residuo/agua en la obtención del CBL pueden deberse en gran medida a la posible degradación de los ácidos orgánicos con el aumento de la temperatura (9, 10).

Por el contrario, con el aumento del tiempo de extracción aumenta el contenido de los ácidos en el CBL, siendo este aumento más marcado en los experimentos realizados a menor temperatura, lo que se evidencia en los experimentos 5 y 8 con 27.39 y 14.59 mg/g respectivamente.

En la Tabla VI se muestra el contenido de flavonoides obtenido en los diferentes experimentos realizados.

**Tabla VI. Contenido de flavonoides totales en el CBL**

Experimentos	Residuo/agua (X <sub>1</sub> ) (g/L)	Temperatura (X <sub>2</sub> ) (°C)	Tiempo (X <sub>3</sub> ) (min)	Flavonoides totales (mg/g)
1	100	27	30	23.20
2	200	27	30	28.10
3	100	100	30	25.88
4	200	100	30	28.05
5	100	27	90	24.27
6	200	27	90	24.86
7	100	100	90	37.90
8	200	100	90	41.16

Como puede observarse (Ec. 5), la variable más influyente fue la temperatura; al aumentar la temperatura es mayor el contenido de flavonoides en el CBL, lo cual puede deberse a que un aumento de la temperatura facilita la disolución de los flavonoides (11).

$$(Ec. 5) \text{ Flavonoides totales} = 28.3046 + 3.19375X_2$$

#### Análisis de varianza para una regresión completa

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
Modelo	244.801	1	244.801	84.99	0.03
Errores	1080.14	22	49.0972		
Total	1324.94	23			

$r^2$ (ajustado para G.L.)=0.9747 ES=7.0069 F crítica= 2.18

Es de destacar que aunque otras variables no resultaron significativas para el modelo, los mayores contenidos de flavonoides en el CBL se obtuvieron a altas temperaturas, cuando se utilizó el mayor tiempo de extracción y esto se evidencia en los experimentos 3 y 7 así como en 4 y 8, donde se aumenta el tiempo de extracción en 60 minutos y permanecen fijas el resto de las condiciones experimentales.

Al comparar los niveles de los compuestos presentes en el CBL con actividad biológica, el contenido de flavonoides es uno de los mayoritarios, lo cual es muy beneficioso, ya que son los compuestos más importantes en el CBL debido a sus múltiples propiedades farmacológicas(12, 13).

En todas las experiencias realizadas, no se han tenido en cuenta las interacciones entre las variables experimentales, a pesar de que resultaron significativas para el modelo planteado, pues son interacciones de variables que reafirman el sentido y la magnitud de las variables descritas anteriormente.

De forma general, las variables experimentales proporción (m/v) residuo/agua, la temperatura y el tiempo de extracción resultaron influyentes en el rendimiento y la composición del CBL excepto en el caso de los flavonoides, obteniéndose los mayores rendimientos y niveles en los principales constituyentes con actividad biológica en el CBL, en las condiciones ensayadas, cuan-

do se utilizan 200 g/L de proporción (m/v) residuo/ agua, 100°C como temperatura de extracción y 90 minutos para la extracción.

Este trabajo constituye la primera información, en Cuba, sobre una metodología para la obtención del CBL; además, si consideramos que los frutos cultivados en Cuba constituyen una fuente potencial para la obtención del CBL, la facilidad de obtención, el carácter de compuesto natural y la actividad biológica en potencia de este producto; convierte su posible aplicación en una alternativa a tener en cuenta por la industria farmacéutica en la formulación de medicamentos.

#### REFERENCIAS

1. Kesterson, J. W. /et al./ La industrialización de los frutos cítricos. En: Los Cítricos, 1999, p. 78-81.
2. Reynaldo, I. /et al./ Flavonoids found in several citrus species cultivated in Cuba and Spain for their industrial application. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 3, p. 73-75.
3. Cartaya, O. y Reynaldo, I. Obtención del complejo de bioflavonoides del limón a partir de cuatro variedades. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 3, p. 55-57.
4. Sevilla, E. Apuntes sobre modelación estadística y diseño de experimentos. La Habana : Editorial Pueblo y Educación, 1987.
5. Dubois, N. /et al./ Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 1956, vol. 28, p. 350-356.
6. Nelson, N. J. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucoses. *J. Biol. Chemistry*, 1944, vol. 153, p. 375-380.
7. Davis, W. B. Determination of flavanones in Citrus fruit. *Anal. Chem.*, 1947, vol. 19, p. 476-478.
8. Silvendran, R. R. Cell- wall chemistry and architecture in relation to sources of dietary fibre. *Europ. J. Clinical Nutr.*, 1995, vol. 49, p. 27-41.
9. Mc Mullen, M. D. /et al./ Quantitative trait loci and metabolic pathways. *Proc Acad. Sci. USA.*, 1999, vol. 95, no. 5, p. 1996-2000.
10. Moledina, K. H. y Flink, J. M. Determination of Ascorbic acid in plant food products by high performance liquid chromatography. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 2000, vol. 15, p. 351-358.
11. Bahar, B. y Siddequi, A. A. Bioactive Naturally Occuring Flavonoids. *Hamdard Medicus*, 1999, vol. 52, no. 1.
12. Yamamoto, K. y Osawa, T. Isolation of eriocitrin (eriodictyol 7-rutinoside) from lemon fruit (*Citrus limon* Burm f.) and its antioxidative activity. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, 1997, vol. 3, p. 84-89.
13. Bombardelli, E. y Morazzoni, P. The flavonoids: New perspectives in biological activities and therapeutics. *Chem. Oggi*, 1999, vol. 25, p. 28.

Recibido: 9 de octubre del 2001

Aceptado: 23 de marzo del 2002