EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE HESPERIDINA A PARTIR DE LA CÁSCARA DE LIMÓN PERSA (*CITRUS LATIFOLIA*) Y LIMÓN MEXICANO (*CITRUS AURANTIFOLIA*)

José Daniel Padilla de la Rosa[a], Priscila Ruiz Palomino[b], Marli N. Velázquez[a], Sandra Bravo[a], Guadalupe Guatemala, Eugenia Lugo[a], Jorge García-Fajardo[a], Enrique Arriola[b]*

[a]CIATEJ. Av. Normalistas No. 800. Col. Colinas de la Normal. Guadalajara, Jal., C.P. 44270. México.
[b]Depto. de Ingeniería Química. Universidad de Guadalajara. Blvd. Marcelino García Barragán No. 1421. Guadalajara, Jal., C.P. 44430. México. arriole@hotmail.com

Resumen

La cáscara de limón persa y limón mexicano es una fuente importante de flavonoides, principalmente de hesperidina, cuya bioactividad ha sido reportada en la literatura. Como proceso alternativo a la tradicional extracción alcalina, la extracción de hesperidina se realizó con una solución de etanol /agua a nivel piloto. Se empleó adsorción en lecho fijo para purificar el extracto y así aumentar la eficiencia de recuperación de hesperidina. La desorción se llevó a cabo con etanol 96º. Se evaluó el efecto del flujo de extracto y etanol a través de la columna en la eficiencia de recuperación. La eficiencia promedio de recuperación de hesperidina fue del 80% y se encontró que no existen diferencias significativas en este valor por efecto del flujo empleado.

Introducción

El procesamiento de limón genera una gran cantidad de cáscara como subproducto [1], la cual es rica en flavonoides, especialmente en hesperidina [2]. La hesperidina es una flavanonaglicósido que posee propiedades antialergicas, anticarcinogénicas, anithipotensivas, antimicrobianas y vasodilatadoras [3]. Tradicionalmente la obtención de hesperidina a partir de la cáscara de cítricos se realiza mediante una extracción con una solución acuosa alcalina y efectuando posteriormente una precipitación ácida para recuperarla [4]. Este proceso requiere grandes cantidades de ácido y base, además de que extrae simultáneamente compuestos que disminuyen el rendimiento y la pureza [5]. Una alternativa que se presenta para su extracciónes el uso de solventes orgánicos. Si bien el metanol es efectivo para tal fin, su toxicidad limita su aplicación. Por lo tanto, se ha optado por el uso de etanol grado alimenticio, cuya utilidad para la extracción de compuestos fenólicos en algunos cítricos ha sido comprobada [6].

La extracción como tal presenta una selectividad baja por lo que una purificación del compuesto de interés resulta necesaria. Uno de los procesos más empleados para la purificación de flavonoides a partir de extractos es la adsorción con resinas[7]. El objetivo de este trabajo es evaluar la extracción hidroalcohólica de hesperidina a partir de la cáscara de limón persa y la posterior purificación con un lecho fijo empacado con una resina de adsorción para incrementar la eficiencia de recuperación. Esta metodología es extrapolable a la cáscara de limón mexicano, debido a la similitud en la composición de flavonoides, principalmente en el hecho de que la hesperidina se presenta como componente mayoritario en ambos (Tabla 1).

© 2012 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química AMIDIQ

Tabla 1. Flavonoides en los tejidos de limón persa y limón mexicano (mg/100 g peso húmedo) [2]

FLAVONOIDE	Eriocitrina	Narirutina	Hesperidina	Neohesperidina	Neoponcirina	Poncirina	Rutina	Isorhoifolina	Diosmina	Neodiosmina	Sinensetina	Nobiletina	Tangeretina
Limón persa	54.7	16.1	**351**	0	2.7	9.7	9.3	17.7	15.1	5.3	0.6	0.2	0.3
Limón mexicano	3.9	4.4	**197**	1.5	3	3.3	0	10.2	14.7	3.9	0	0.4	0.7

Sección Experimental

Extracción

Los frutos son lavados para eliminar impurezas. La cáscara y bagazo se separan del jugo en una prensa de tornillo y posteriormente son triturados. La extracción se realiza en un tanque agitado a escala piloto (20 L), a 120 rpm, con una temperatura de 50ºC, utilizando como solvente 60% etanol en agua y empleando una relación sólido-solvente de 1:3. La cantidad de hesperidina extraída es monitoreada cada 20 minutos, analizando las muestras mediante HPLC. Una vez terminada esta operación, el extracto se filtra y se concentra en un evaporador al vacío (40-45ºC y 500 mmHg). Se filtra nuevamente y la concentración final se analiza por HPLC.

Purificación con resinas de adsorción

Una columna con una capacidad de 100 ml se llena con 80 ml de resina (FPX66, Amberlite^{TM}) y se afora con agua destilada. Después la resina es lavada con 1 L de agua destilada, a una presión de 0.5 kg/cm^2, regulando el flujo de salida en 5 ml/min. A continuación se hace pasar 1 L del extracto concentrado bajo la misma presión y con 2 flujos: 2.7 y 5.4 ml/min (bajo y alto) para estudiar la influencia de esta variable sobre el proceso. Cada que 25 ml pasan por la resina se miden los ºBrix, como indicador de la concentración a la salida. Cuando la resina se satura se procede a realizar la desorción de la hesperidina con etanol de 96º, utilizando los mismos flujos. Se monitorea la densidad a la salida para observar el progreso de la desorción. La concentración final de hesperidina es analizada por HPLC. La eficiencia de recuperación del proceso de purificación se calcula mediante un balance de masa de hesperidina entre el extracto concentrado y la solución etanólica de la desorción.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Las muestras se preparan agregando NaOH 1N (para asegurar la completa disolución de la hesperidina). Después se diluyen (1:20) en etanol y finalmente se pasan por microfiltros de 0.45µm. El volumen de inyección es de 2µl yla columna es ZORBAX SB-C18 4.6 x 250 mm. El tiempo de análisis 60 minutos a una temperatura de 40ºC. La fase móvil está compuesta por metanol/agua y durante los primeros 50 minutos hay un gradiente de elución que comienza con la proporción 15/85y finaliza en 60/40. El flujo es de 4 ml/min y las lecturas se hacen a 280 nm en un detector UV.

© 2012 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química AMIDIQ

Resultados y Discusión

Para el caso del limón persa, la concentración de hesperidina después de la extracción fue de 0.33 mg/ml. El proceso de evaporación al vacío elevó este valor a 0.97 mg/ml. La Figura 1 muestra el cromatograma obtenido después de la evaporación donde se aprecia que la hesperidina, aunque abundante, no es el único compuesto presente. Se llevó a cabo la adsorción bajo las dos condiciones de flujo establecidas. En la Figura 2 se observa que la resina realiza la adsorción satisfactoriamente, hasta alcanzar el punto de saturación (ºBrix constantes).

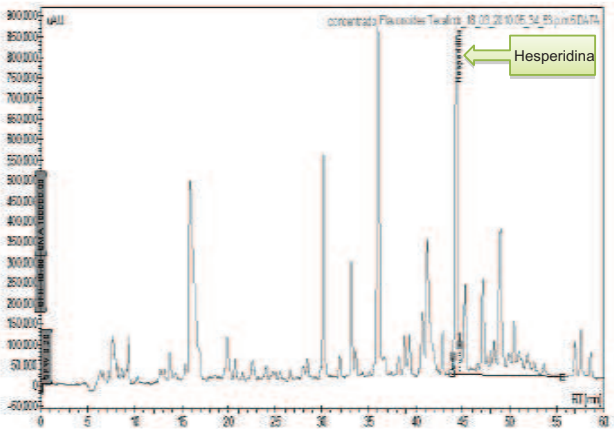

Figura 1. Cromatograma del extractoconcentrado por evaporación al vacío

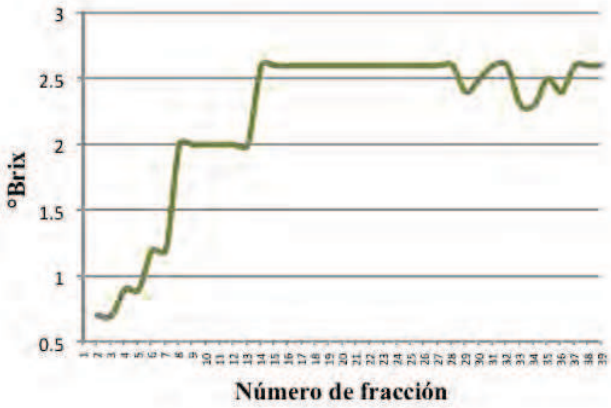

Figura 2. Perfil de adsorción (flujo alto)

Las concentraciones obtenidas de la desorción con etanol a flujo alto y bajo fueron de 5.3 mg/ml y 6.12 mg/ml respectivamente. Se calcularon las eficiencias de recuperación y se analizaron los datos obtenidos mediante el software Statgraphics® Centurion XVI. La eficiencia de recuperación no es estadísticamente distinta bajo los dos flujos empleados (Tabla 2), por lo que esta variable no tiene un efecto significativo sobre el proceso.

© 2012 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química AMIDIQ

Tabla 2. ANOVA para la eficiencia de recuperación.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de medias	Valor-P
Entre grupos	160.167	1	160.167	**0.5697**
En grupo	1674.67	4	418.667	
Total (Corregido)	1834.83	5		

La Figura 3 exhibe la comparación de estas concentraciones con la del extracto, resaltando la capacidad del proceso de purificación utilizado para incrementar la eficiencia de recuperación (80%). Este hecho se corrobora en el cromatograma (Figura 4), en el cual la presencia de otros compuestos se reduce considerablemente.

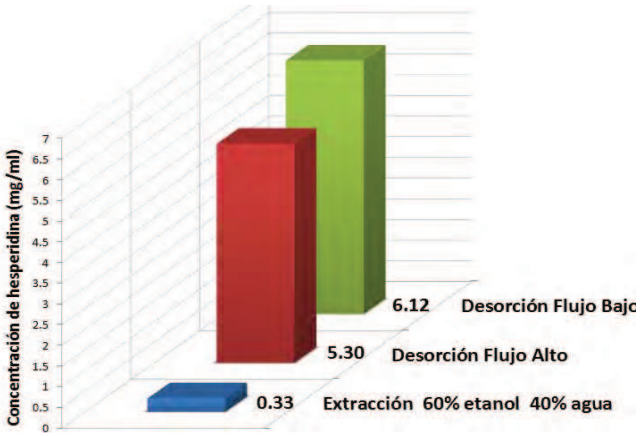

Figura 3. Eficiencia de recuperación de hesperidina

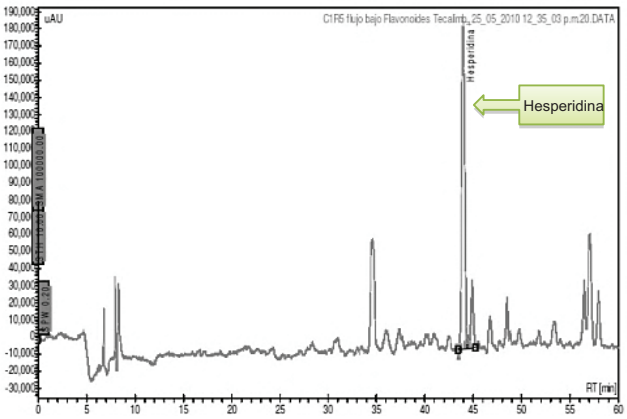

Figura 4. Cromatograma después de la desorción
(flujo bajo)

© 2012 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química AMIDIQ

Conclusiones

Se logró complementar una metodología efectiva para la extracción y purificación de hesperidina a partir de la cáscara de limón a nivel planta piloto, con una eficiencia promedio de recuperación del 80%. Además se encontró que no existen diferencias significativas entre la eficiencia de recuperación de hesperidina por efecto de los flujos utilizados en la purificación con resinas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método propuesto presenta ventaja respecto a los métodos tradicionales, ya que el uso del etanol también facilita la precipitación de las pectinas y acelera la filtración, que aunado al uso de resinas facilita su escalamiento.

Agradecimientos

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), a la Universidad de Guadalajara y al Fondo Mixto de Veracruz- Gobierno del Estado de Veracruz Ignacio de la Llave por el financiamiento para el desarrollo de este proyecto.

Referencias

1. González F.J., Rojo R., Ramírez O., Omaña M., Matus J.A., Rebollar S. Revista Mexicana de Agronegocios. 24, 808 (2009).
2. Nogata Y., Sakamoto K., Shiratsushi H., Ishu T., Yano M., Ohta H. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 70:1, 178 (2006).
3. Kelly P., Santa D., Salvador M. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 4757 (2005).
4. Di Mauro A., Fallico B., Passerini A., Rapisarda P., Maccarone E. Journal of Agricultural and Food Chemistry.47, 4391 (1999).
5. Macoritto A., Geronazzo H., Ellenreider G. Información Tecnológica. 12:4, 3 (2001).
6. Li B.B., Smith B., Hossain M. Separation andPurificationTechnology.48, 182 (2006).
7. Soto M.L., Moure A., Domínguez H., Parajó J.C. J. Food Engineering.105, 1 (2001).

© 2012 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química AMIDIQ