

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA
DE LIMONOIDES DE SEMILLAS DE CÍTRICOS
EXTRAÍDOS CON CO₂ SUPERCRÍTICO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

EN LA ESPECIALIDAD DE:

PROCESOS AGROINDUSTRIALES

PRESENTA

M. en C. Gustavo Adolfo Castillo Herrera

AGRADECIMIENTOS

-La mente es como un paracaídas, solo funciona si se abre-.
Albert Einstein

La realización de una tesis es la evidencia plena de un trabajo en equipo. En donde desde la gestación del proyecto y durante la realización del mismo, recibí la ayuda y colaboración de muchas personas. Por lo que con estas palabras deseo ofrecerle a cada una de ellas, mi sincero agradecimiento.

En primer lugar a mis directores de tesis, Dr. Jorge García Fajardo y Dr. Eugenia Lugo Cervantes, por sus conocimientos y amistad compartida. Desde la experiencia vivida en la maestría y en los años de colegas de investigación, Doc, gracias por evidenciar su gran capacidad de liderazgo, agradezco la confianza y libertad que me otorgó para sacar adelante cada una de las etapas de la tesis. A la Dra. Eugenia, Eugeni, por su guía y exigencia para mejorar siempre, por estar siempre recordando los compromisos a deshoras y motivándome a avanzar durante este proyecto de investigación. Les agradezco las enseñanzas, la supervisión y la evaluación constante del trabajo, no sólo con la rigurosidad científica requerida, sino también por cuidar las formas de las mismas.

A todos mis amigos, a mis compañeros y amigos doctorantes, a mis compañeros y amigos de TECALIM, y los demás colegas de investigación que compartieron sus conocimientos, gracias Dra. Puebla, Dr. Ivan...agradezco también al Dr. De Anda por su motivación y por la oportunidad otorgada, a toda la coordinación de posgrado, gracias por su apoyo y respaldo.

Agradezco a mi familia que siempre me respaldó, entendió y apoyo en todas las ocasiones que sacrificaba una pizca del tiempo que les correspondía por terminar avances, revisar mis resultados, entre otras cosas, gracias Linda, gracias Emiliano y Ana Pau por la motivación.

Gracias a todos, sin su apoyo no hubiera sido posible la realización de este trabajo, Gracias!!!

ÍNDICE GENERAL

Contenido

| | |
|--|------|
| AGRADECIMIENTOS..... | i |
| ÍNDICE GENERAL..... | ii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | vi |
| RESUMEN..... | viii |
| ABSTRACT..... | ix |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| Justificación..... | 2 |
| Objetivo general..... | 3 |
| Objetivos específicos..... | 3 |
| Hipótesis..... | 4 |
| Organización de la Tesis..... | 4 |
| 1.CAPÍTULO..... | 5 |
| 1.1.LOS CÍTRICOS..... | 5 |
| 1.1.1.Estructura macroscópica y microscópica..... | 7 |
| 1.1.2.Efecto de factores climáticos en la composición química de las frutas..... | 9 |
| 1.1.3.Procesamiento..... | 10 |
| 1.2.LIMONOIDES..... | 11 |
| 1.2.1.Biosíntesis de limonoides..... | 14 |
| 1.2.2.Estabilidad de los limonoides..... | 16 |
| 1.2.3.Actividad biológica de los limonoides..... | 17 |
| 1.3.EL CANCER..... | 18 |
| 1.3.1.El cancer y bioactivos de origen natural..... | 20 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 21 |
| 2.CAPÍTULO..... | 28 |
| 2.1.INTRODUCCIÓN..... | 28 |
| 2.2.EXTRACCIÓN..... | 29 |
| 2.2.1.Elección del solvente..... | 31 |

| | |
|--|----|
| 2.2.2.Características de la matriz | 31 |
| 2.2.3.Operación del sistema..... | 32 |
| 2.2.4.Ventajas y desventajas de la extracción soxhlet..... | 32 |
| 2.3.EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS | 32 |
| 2.3.1.Historia | 32 |
| 2.3.2.Propiedades de los fluidos supercríticos..... | 33 |
| 2.3.4.Dióxido de carbono como solvente supercrítico | 36 |
| 2.3.5.Proceso de extracción supercrítica | 37 |
| 2.4.EXTRACCIÓN DE LIMONOIDES | 40 |
| 2.5.CROMATOGRAFÍA | 43 |
| 2.6.CITOTOXICIDAD | 44 |
| 2.6.1.Ensayo de reducción del MTT | 45 |
| 2.7.CONCLUSIONES | 46 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 47 |
| 3.CAPÍTULO | 52 |
| 3.1.INTRODUCCIÓN..... | 52 |
| 3.2.MATERIALES Y MÉTODOS..... | 55 |
| 3.2.1.Materia Prima | 55 |
| 3.2.2.Caracterización de Semillas..... | 55 |
| 3.2.3.Extracción con solventes..... | 56 |
| 3.2.4.Evaluación de citotoxicidad | 57 |
| 3.3.RESULTADOS | 59 |
| 3.3.1.Extracción con solventes..... | 59 |
| 3.3.2.Citotoxicidad de extractos de semillas de cítricos | 63 |
| 3.4.CONCLUSIONES | 70 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 71 |
| 4.CAPÍTULO | 76 |
| 4.1.INTRODUCCIÓN..... | 76 |
| 4.2.MATERIALES Y MÉTODOS..... | 80 |
| 4.2.1.Extracción con solventes..... | 80 |
| 4.2.2.Extracción mediante fluidos supercríticos | 80 |
| 4.2.3.Análisis HPLC (High-performance liquid chromatography) | 87 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.4.Actividad Citotóxica..... | 87 |
| 4.3.RESULTADOS | 88 |
| 4.3.1.Extracción con solventes..... | 88 |
| 4.3.2.Extracción con Fluidos supercríticos | 90 |
| 4.3.3.Actividad Citotóxica contra L5178Y..... | 93 |
| 4.4.CONCLUSIONES | 96 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 97 |
| 5.CAPÍTULO | 101 |
| 5.1.CONCLUSIONES | 101 |
| 5.1.1.Extracción mediante solventes | 102 |
| 5.1.2.Extracción mediante fluidos supercríticos | 102 |
| 5.2.PERPECTIVAS..... | 103 |
| ANEXO I. CURVA DE CALIBRACIÓN..... | 104 |
| Preparación de la curva de calibración | 104 |
| ANEXO II. CRONOMATOGRAMAS: ESTÁNDARES Y MUESTRAS | 107 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1-1 Hitos en la investigación de limonoides en cítricos | 12 |
| Tabla 1-2 Hitos sobre la actividad biológica de limonoides | 17 |
| Tabla 2-1 Fluidos supercríticos comúnmente usados | 36 |
| Tabla 2-2 Ventajas y Desventajas de la Extracción Supercrítica | 39 |
| Tabla 2-3 Estudios sobre la obtención de limonina a partir de semillas cítricas..... | 41 |
| Tabla 3-1 Análisis Bromatológico de Semillas de Cítricos..... | 59 |
| Tabla 3-2 Análisis de Varianza del Rendimiento de Extracto de Limonoides. | 60 |
| Tabla 3-3 Rendimientos de extracto de limonoides obtenidos para cada cítrico..... | 63 |
| Tabla 3-4 Análisis de Varianza de la Viabilidad Celular | 64 |
| Tabla 4-1 Extracción supercrítica de semillas de <i>C. Aurantifolia</i> swingle | 90 |
| Tabla 4-2 Efecto de extractos de <i>C. Aurantifolia</i> swingle sobre la viabilidad celular de L5178Y | 95 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1-1 Principales cítricos producidos en México | 6 |
| Figura 1-2 Vista de la sección cruzada de una naranja. | 7 |
| Figura 1-3 Características Estructurales comunes en limonoides: | 11 |
| Figura 1-4 Distribución de limonina en toronja blanca y tejidos vegetales ($\mu\text{g}/100\text{mg}$)..... | 13 |
| Figura 1-5 Limonoide en estado aglicona y glicosilado. | 14 |
| Figura 1-6 Estructura de los principales limonoides aglicona dentro de las semillas cítricas | 15 |
| Figura 1-7 Síntesis de limonina a partir de Nomilina | 16 |
| Figura 2-1 Extractor Soxhlet..... | 30 |
| Figura 2-2 Diagrama de fases sólido/líquido/gas/fluido supercrítico. | 34 |
| Figura 2-3 Panorama general de las características más sobresalientes de los fluidos supercríticos | 35 |
| Figura 2-4 Solubilidad de un soluto en función de la presión a temperatura constante | 35 |
| Figura 2-5 Diagrama básico para una extracción supercrítica | 37 |
| Figura 2-6 Reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT). | 45 |
| Figura 3-1 Semillas deshidratadas de semillas de Citrus Reticulata (Mandarina), semillas de Citrus Sinensis (Naranja) y semillas de Citrus Aurantifolia swingle (Limón mexicano)..... | 55 |
| Figura 3-2 Remoción de aceite vegetal de semillas mediante hexano en extracción soxhlet..... | 56 |
| Figura 3-3 Obtención de extractos de limonoides mediante extracción soxhlet..... | 57 |
| Figura 3-4 Extracción de las células L5178Y por punción en el peritoneo del ratón..... | 58 |
| Figura 3-5 Rendimiento de extracto de limonoides en función del tipo de solvente utilizado para cada cítrico. | 61 |
| Figura 3-6 Efecto del tiempo de extracción sobre el rendimiento de extracto de limonoides..... | 62 |
| Figura 3-7 Rendimiento de extracto de limonoides en función del tipo de cítrico. | 63 |
| Figura 3-8 Citotoxicidad de extractos de semillas de cítricos obtenidos por diferentes extractos, solventes y tiempos de extracción | 65 |
| Figura 3-9 Efecto del tipo de solvente sobre la citotoxicidad de extractos de semillas de cítricos. | 65 |
| Figura 3-10 Viabilidad celular de L5178Y ante extractos de semillas obtenidos por diferentes solventes. | 66 |
| Figura 3-11 Efecto del tiempo de extracción de limonoides sobre la Viabilidad celular de L5178Y..... | 67 |
| Figura 3-12 Viabilidad celular de L5178Y ante extractos de semillas a diferentes tiempos de extracción. | 67 |
| Figura 3-13 Efecto de la concentración de extracto de limonoides sobre la Viabilidad celular de L5178Y..... | 68 |

| | |
|--|----|
| Figura 3-14 Viabilidad celular de L5178Y ante extractos de <i>C. Aurantifolia swingle</i> , <i>C. Sinensis</i> y <i>C. Reticulata</i> | 68 |
| Figura 3-15 Efecto de la concentración extractos de limonoides de <i>C. Aurantifolia swingle</i> , <i>C. Sinensis</i> y <i>C. Reticulata</i> sobre la Viabilidad celular de L5178Y. | 69 |
| Figura 4-1 Sistema de extracción supercrítica SFE-500MR | 81 |
| Figura 4-2 Bomba de CO ₂ Líquido | 81 |
| Figura 4-3 Bomba de Co-Solvente | 82 |
| Figura 4-4 Intercambiador de Calor | 82 |
| Figura 4-5 Recipiente de Extracción | 83 |
| Figura 4-6 Recipiente de Separación | 83 |
| Figura 4-7 Regulador de Presión Automatizado (ABPR) | 84 |
| Figura 4-8 Regulador de temperatura por zonas | 84 |
| Figura 4-9 Interfaz de control del sistema: 1) Bomba de CO ₂ , 2) Bomba de Co-Solvente, 3) ABPR 4) Control de Temperaturas por zonas..... | 85 |
| Figura 4-10 Canastilla de extracción utilizada en la extracción supercrítica | 86 |
| Figura 4-11 Efecto del Método de Extracción sobre el Rendimiento de Extracto | 88 |
| Figura 4-12 Rendimiento de Limonina en diferentes extractos de <i>C. Aurantifolia swingle</i> | 89 |
| Figura 4-13 Efecto de la presión y temperatura sobre el rendimiento de extracto..... | 91 |
| Figura 4-14 Efecto de la presión y temperatura sobre el contenido de limonina | 92 |
| Figura 4-15 Actividad Citotóxica de Extractos de <i>C. Aurantifolia</i> Obtenidos por Diferentes Solventes | 94 |
| Figura 4-16 Comportamiento “Dosis Respuesta” de Extractos de <i>C. Aurantifolia</i> | 94 |

RESUMEN

En el proceso de industrialización de los cítricos se obtienen semillas como subproducto, estas semillas contienen limonoides (triterpenoides oxigenados), quienes están relacionados con el amargor de los cítricos, además, estos limonoides muestran bioactividades interesantes como anticancerígenos, antivirales y antitumorales. Para la obtención de los limonoides existe un proceso definido mediante solventes y con extracción tipo soxhlet, pero no existe un proceso optimizado, ya que en la bibliografía se emplean diferentes solventes y tiempos de proceso para su extracción. Por lo que el objetivo de este trabajo, fue evaluar cómo se afecta la citotoxicidad de extractos de semillas de *Citrus aurantifolia swingle*, *Citrus sinensis* y *Citrus reticulata* utilizando dos tipos de solventes (metanol y acetona) y dos tiempos de extracción (5 y 8 horas) sobre linfoblastos *in vitro* de L5178Y, encontrando la semilla con mayor citotoxicidad para evaluarla en un proceso innovador de extracción, como la extracción supercrítica.

La semilla con mayor rendimiento en extracto de limonoides fue la semilla *C. aurantifolia swingle*, en particular la extraída con metanol con un rendimiento de $11.43\% \pm 0.3$, seguido en rendimiento por el obtenido con acetona; el rendimiento más bajo lo mostró *C. sinensis* con un $3.32\% \pm 1.4$, obtenido con acetona. Además, los extractos de limonoides obtenidos de *C. reticulata* mostraron menor citotoxicidad que los extractos de *C. sinensis*, quienes mostraron una menor citotoxicidad que los extractos de limonoides de *C. aurantifolia swingle*, logrando determinarse las dosis citotóxicas medias para *C. reticulata* y *C. sinensis*, IC_{50} de $95 \mu\text{g/ml}$ e IC_{50} $50 \mu\text{g/ml}$ respectivamente. La dosis inhibitoria media para el extracto a partir de la semilla de *C. aurantifolia* no se pudo determinar en esta prueba debido a que la dosis menor evaluada ($40\mu\text{g/ml}$) tuvo un efecto citotóxico importante.

Con base en estos resultados, se evaluó entonces el proceso de extracción mediante fluidos en estado supercrítico de semillas de *C. aurantifolia swingle* y se compararon los resultados con los obtenidos para este cítrico mediante solventes. En el proceso de fluidos supercríticos se evaluó el efecto de la presión y temperatura de proceso sobre el rendimiento y la composición. Se encontró que la presión no afecta la composición del extracto, pero sí el rendimiento de extracto, contrario a la temperatura que no afecta el rendimiento del extracto pero sí afecta su composición; los rendimientos obtenidos por solventes y mediante fluidos supercríticos no mostraron diferencia significativa. Al evaluar la actividad citotóxica, tampoco hubo diferencia entre los extractos obtenidos mediante solventes (IC_{50} de $9 \mu\text{g/mL}$) y los obtenidos mediante CO_2 en estado supercrítico (IC_{50} de $8.5 \mu\text{g/mL}$), siendo así, la extracción supercrítica, una alternativa de extracción.

ABSTRACT

Citrus fruits are an important component for human diet, providing important compounds for human health, like vitamins, minerals and dietary fiber. In the citrus industrialization process, the seeds are a non-used waste that contains bioactive compounds like limonoids (oxygenated triterpenoids). These limonoids have been related with the bitter principle of citrus, furthermore, they exhibit some health benefits as anticancer, antiviral, and antitumoral agents. There is a defined process for obtaining limonoids, by Soxhlet technique using organic solvents, but there is not an optimized process because of time process or solvent type are not defined, and different solvents and times process are used. Therefore, the aim of this work was to evaluate the cytotoxicity against in vitro L5178Y lymphoma cells was affected by *Citrus aurantifolia* swingle, *Citrus sinensis* and *Citrus reticulata* seeds extracts evaluating two solvents (Methanol and Acetone) and two process times (5 and 8 hours).

Methanol extract from *C. aurantifolia* swingle showed a higher yield extract of 11.43% \pm 0.3 followed by acetone extract also from *C. aurantifolia* swingle; lower yields were obtained by acetone extracts from *C. sinensis* with a 3.32% \pm 1.4 yield. Besides, for cytotoxicity, extracts from *C. reticulata* showed lower cytotoxic activity (IC_{50} 95 μ g/mL) than extracts from *C. sinensis* (IC_{50} of 50 μ g/mL), but extracts from *C. sinensis* showed lower cytotoxic activity than that obtained by *C. aurantifolia* with a IC_{50} lower than 40 μ g/mL.

There are no studies that compare cytotoxic activity against L5178Y lymphoma cells by two extraction methods and their optimization. As a part of this work, we evaluated and optimized extraction of limonoids by supercritical fluid extraction from *Citrus aurantifolia* swingle seeds. Supercritical extraction pressure affects limonoid yield but did not affect the limonoid composition, which was latter affected only by temperature process. Also, there was no difference in cytotoxic activity between extracts, showing an IC_{50} of 8.5 μ g/mL for supercritical CO₂ and an IC_{50} of 9 μ g/mL for solvent extracts.

INTRODUCCIÓN

En todo el mundo las frutas cítricas desempeñan un papel muy importante en la alimentación debido a que contienen compuestos benéficos para la salud humana, de los que se reconocen en mayor medida a la vitamina C, además de poseer un refrescante sabor y un alto contenido de fibra.

En particular en México, aproximadamente el treinta por ciento de esta producción es procesada en diferentes productos, principalmente en jugo, del que se obtienen diversas presentaciones; como consecuencia de este proceso, se genera un gran número de desperdicios industriales que pudieran ser aprovechados de manera tal que generen un mayor valor al procesamiento de los cítricos.

Recientemente, se han llevado a cabo estudios en torno a los limonoides y sus propiedades nutraceuticas. Estos compuestos son una clase de triterpenos altamente oxigenados que se encuentran principalmente dentro de las semillas de los cítricos. Entre las actividades biológicas reportadas para este tipo de moléculas se encuentran la insecticida, antimicrobiana, antiviral, entre otras, pero la actividad relevante para este trabajo es su actividad citotóxica. La finalidad de este trabajo es establecer un proceso de extracción de limonoides a partir de semillas de cítricos que son

desechadas en la industria, esto con base en estudios de limonoides que han demostrado que éstos son los responsables de la citotoxicidad contra diferentes líneas celulares, y en los que la actividad citotóxica de los extractos obtenidos fue evaluada *in vitro* en un cultivo celular contra linfoblastos de L5178Y.

Con el desarrollo de este trabajo se podrá contribuir al aprovechamiento de los subproductos mediante el uso del proceso de extracción con CO₂ supercrítico, debido a que es una técnica que se ha venido utilizando en los últimos años para la obtención y purificación de productos naturales.

Aprovechando sus ventajas en comparación con técnicas convencionales de extracción, dentro de las que destacan, menores tiempos de operación, la obtención de un producto con mayor pureza y además presenta un menor impacto ecológico debido a que no utiliza solventes orgánicos, lo que potencia el aprovechamiento de este subproducto otorgándole valor, mediante la obtención de extractos bioactivos con características seguras que podrían emplearse en la industria farmacéutica y darle un uso enfocado al aprovechamiento de las propiedades funcionales de los limonoides.

Justificación

Los cítricos representan una parte importante de la industria alimentaria debido a que estos frutos forman de manera directa o indirecta parte de muchos productos alimentarios, en donde la producción de estos cítricos a nivel mundial es del orden de los 116.6 millones de toneladas anualmente, y considerando que el 25-30 % de los frutos producidos se procesan en los diferentes productos, se genera entonces una cantidad aproximada de 17.5 millones de toneladas de desperdicios anualmente, principalmente de cáscaras y semillas, lo que se convierte en un problema grande de contaminación.

Este problema de contaminación se combina con una problemática mayor de salud como lo es el cáncer, y donde se estima que el efecto de la transición demográfica se traducirá en 107,000 casos extras de cáncer por año en México, desde ahora y hasta el 2030. Estimaciones predicen que el 58% de estos casos será en hombres y mujeres ≥ 65 años y a pesar de que este grupo representa aproximadamente el 11,5% de la población nacional, no se puede pensar que esto sea un problema menor.

Con el objetivo de generar una alternativa contra el cáncer en una sociedad que envejece, esta problemática tiene que ser considerada como una prioridad de investigación; debiéndose abordar de una manera multidisciplinaria y aumentando la comprensión actual de los factores existentes y en búsqueda de alternativas para el tratamiento de esta enfermedad.

Lo anterior, sumado a la gran diversidad de compuestos bioactivos y desarrollos a partir de productos naturales, permite considerar a las semillas de los cítricos como una posible fuente de bioactivos que presenten una actividad anticancerígena, debido al contenido de limonoides dentro de las semillas de los cítricos, los que se encuentran en su mayoría en su forma aglicona (forma bioactiva) en las semillas y de los cuales se ha reportado que poseen una gran variedad de actividades benéficas para la salud humana, destacando su actividad anticancerígena.

Por lo que surge la necesidad de establecer un proceso adecuado de aprovechamiento de las semillas cítricas para la obtención de limonoides, y por ende generar un valor a un residuo industrial. Para ello, la extracción con CO₂ supercrítico resulta ser una técnica innovadora, con ventajas tanto económicas, como medioambientales, y con la capacidad de obtener un extracto de limonoides con un citotoxicidad significativa. Pudiendo ser una tecnología efectiva para la obtención de limonoides a partir de semillas cítricas, y que se convierta en una alternativa con un gran potencial para realizar la obtención de bioactivos con actividad citotóxica contra linfoblastos L5178Y.

Objetivo general

Desarrollar un proceso de extracción de limonoides que permita el aprovechamiento de semillas de cítricos para la obtención de limonoides con una citotoxicidad significativa contra linfoblastos de L5178Y.

Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad citotóxica de los extractos de limonoides de semillas de *C. sinensis*, *C. aurantifolia* Swingle y *C. reticulata*, obtenidos mediante extracción Soxhlet con solventes orgánicos.
2. Obtener extractos de limonoides mediante dióxido de carbono en condiciones supercríticas de las semillas del fruto que presente la mayor actividad citotóxica y comparar su rendimiento y citotoxicidad con el extracto Soxhlet.

3. Identificar y cuantificar los limonoides en el extracto de la semilla del fruto que presente la mayor actividad citotóxica.
4. Definir una metodología confiable que permita aprovechar las semillas cítricas para la extracción de limonoides con actividad citotóxica contra linfoblastos L5178Y.

Hipótesis

La extracción mediante dióxido de carbono en condiciones supercríticas resultará en una técnica adecuada para la obtención de un extracto rico en limonoides a partir de las semillas de cítricos, debido su alto poder de penetración y solvatación, así como la facilidad que presenta para la recuperación del extracto, por lo que permitirá obtener un extracto con la misma actividad citotóxica que el obtenido con solventes orgánicos, pero con las ventajas que esta técnica presenta.

Organización de la Tesis.

Esta tesis está organizada por capítulos. En el capítulo uno se presenta el contenido de los bioactivos, los limonoides, comprendiendo el estudio desde su fuente principal, los cítricos, la razón por la cual se sintetizan, su química, y sus actividades biológicas.

En el capítulo dos, se abordan los fundamentos de las metodologías empleadas para el desarrollo del trabajo de investigación, como lo es la extracción tipo soxhlet, la extracción con fluidos supercríticos, la evaluación de la citotoxicidad y el análisis cromatográfico.

En los capítulos tres y cuatro se presentan los resultados de la investigación. El capítulo tres se enfoca en la evaluación del proceso para la obtención del extracto de limonoides mediante soxhlet y la comparación de tres diferentes semillas cítricas. En el capítulo cuatro se estudia el proceso de extracción mediante fluidos supercríticos de la semilla con mayor citotoxicidad evaluada en el capítulo tres, además de hacer una comparación entre los extractos obtenidos por ambos métodos de extracción e incluyendo su análisis cromatográfico. Estos dos capítulos se presentan con el formato de publicación científica, con introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, y conclusiones.

Finalmente, en el capítulo cinco se presentan todas las conclusiones del trabajo de investigación, además de las perspectivas a trabajar para enriquecer los resultados.

CAPÍTULO UNO

LOS CÍTRICOS Y SUS LIMONOIDES COMO POTENCIAL CITOTÓXICO

1.1. LOS CÍTRICOS

Los cítricos son un conjunto de especies que ocupan el primer lugar en la producción mundial de frutos; éstos son conocidos por su sabor y por su gran versatilidad como producto alimentario, además de que son ampliamente aceptados por los consumidores debido a su alto contenido de fitoquímicos como el ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides (licopeno y β -caroteno), limonoides (limonina y nomilina), flavonoides (hesperidina, naringinas y rutinósidos), el complejo de vitamina B, además de sus nutrientes asociados (tiamina, riboflavina, ácido nicótico, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, ácido fólico, colina e inositol) que en conjunto funcionan como nutraceuticos (Ladaniya, 2010).

Los cítricos pertenecen a la clase Angiospermae, a la subclase dicotiledónea, al orden Rutales, a la familia Rutaceae, al género Citrus y donde este último cuenta con más de 145 especies, entre las que se destacan: naranja clase Angiospermae (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*), limón (*Citrus limon*), lima (*Citrus aurantifolia*), y toronja (*Citrus paradisi*) figura 1.1 (Espinal y col., 2005).

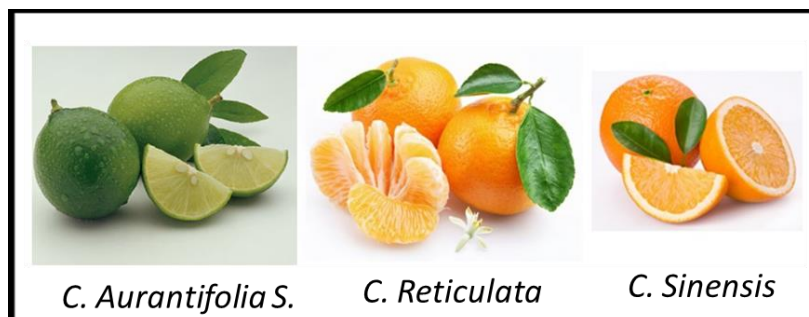


Figura 1-1 Principales cítricos producidos en México.

Estos frutales se cultivan en casi todas las regiones del mundo en donde lo permitan las condiciones climáticas. Las áreas subtropicales actualmente producen grandes cantidades de fruta destinadas a la exportación, mientras que en las áreas tropicales su consumo es principalmente local. El desarrollo de la citricultura en las zonas tropicales está condicionado a factores económicos, técnicos y políticos. Entre los aspectos técnicos debe considerarse selección y mejoramiento de variedades para los diferentes ambientes tropicales, y el desarrollo de una tecnología apropiada para el fruto en específico (Baraona y col., 1998).

Se cree que el cultivo cítrico se originó al sureste de Asia (especialmente en Vietnam del Sur y regiones cercanas a China) o bien, en el sureste de Arabia, exceptuando aquellas áreas donde hay bosque tropical húmedo o jungla. Esto se remonta a los 2400 a.C. (Baraona y col., 1998). El movimiento de dispersión de los diferentes tipos de cítricos ocurrió dentro del área general de origen desde antes de que existiera registro histórico (Espinal y col., 2005).

En relación con el origen geográfico de las distintas especies, *C. sinensis* y *C. reticulata* parecen provenir de China e Indochina; *C. paradisse*, proviene de Malasia e Indonesia donde se daban de manera silvestres; aunque existen serias dudas en lo que concierne a la determinación del lugar exacto de origen del limonero, se puede designar su procedencia de países del Sureste Asiático y Malasia (Ladaniya, 2010).

El color de la fruta se deriva de los pigmentos de carotenoides, clorofila y posiblemente los flavonoides. El aroma característico se obtiene de los aceites esenciales volátiles encontrados en la cáscara. Todos estos componentes químicos y muchos otros que se presentan en cantidades más pequeñas, son el resultado de las influencias combinadas de mecanismos regulados genéticamente, que en conjunto

con factores fisicoquímicos, biológicos y ambientales interactúan con frutas durante su crecimiento, incluso después de su cosecha (Ladaniya, 2010).

1.1.1. Estructura macroscópica y microscópica

Los frutos cítricos se cubren con una cáscara o piel para proteger la pulpa o porción comestible de la fruta. La cáscara se compone por fuera de una cutícula delgada cubriendo una capa de la epidermis (flavedo) conteniendo numerosas bolsas de aceite o glándulas, llenas de un aceite esencial. Además de estas bolsas de aceite, el flavedo contiene materia colorante que no se distribuye uniformemente a lo largo de esta capa pero se concentra en cuerpos diminutos llamados cromatóforos, con color verde en fruta joven y volviéndose amarillo gradualmente en la fruta madura como la naranja (Figura 1.2.).

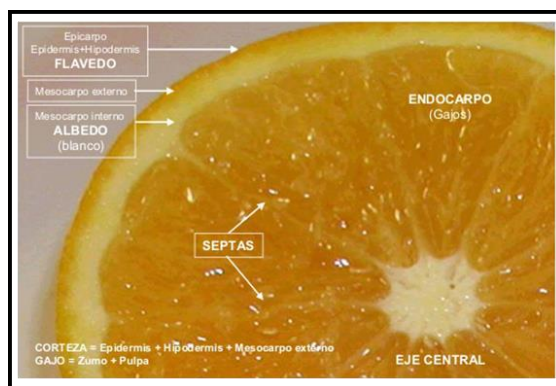


Figura 1-2 Vista de la sección cruzada de una naranja.

Una porción blanca esponjosa de células parenquimatosas, conocida como el albedo, queda directamente bajo el flavedo. Las células de esta capa esponjosa se colocan flojamente con grandes espacios intercelulares y son formas irregulares. Esta capa contiene aproximadamente 20 % de sustancias pécticas que pueden recuperarse en forma de pectina cítrica (Ladaniya, 2010).

La pulpa interna o carne de la fruta consiste en segmentos (lóculos), separados por una membrana de tejido delgado epidermal y las numerosas bolsas de jugo formadas conteniendo vesículas y semillas. Las bolsas de jugo se atan a la pared en cada segmento de ésta y están en contacto con la cáscara por medio de los hilos finos de longitud variante. Incluido el tejido celular en la parte central de cada vesícula de jugo que son gotas de aceite. Pueden observarse cromatóforos amarillos de origen cristalino cuando se aplastan las bolsas de jugo y éstos se examinan microscópicamente (Ladaniya, 2010).

El eje central (centro) de la fruta está compuesto de un tejido esponjoso blanco similar al encontrado en el albedo. Al centro y membranas del segmento se le llaman colectivamente gajo, donde se extrae el jugo.

La corteza o cáscara: Constituye la parte no comestible del fruto. En las naranjas, las mandarinas y las clementinas está poco desarrollada, mientras que en los cidros o en los pomelos constituye la mayor parte del fruto. La corteza está formada por el epicarpio y por el mesocarpio externo e interno. Con la maduración del fruto, el epicarpio (o epidermis) adquiere un color naranja o amarillo. El epicarpio y el mesocarpio externo constituyen el flavedo, donde se encuentran localizadas las glándulas oleíferas ricas en aceites esenciales. El mesocarpio interno constituye el albedo, más o menos espeso, de color blanco y de textura esponjosa (Ladaniya, 2010).

La pulpa: Es la parte comestible del fruto y está formada por el endocarpio. Este endocarpio está constituido por un conjunto de pelos vesículas que contienen el jugo, y están agrupadas en los segmentos. El número de estos segmentos o gajos varía de 5 a 18.

- De 9 a 11 para las naranjas
- De 8 a 11 para las limas
- De 9 a 14 para las mandarinas
- De 12 a 15 para las toronjas

Las semillas: La fruta de los cítricos puede presentarse con o sin semilla. Las semillas de cítrico son diferentes en forma, la cual depende de la variedad; las formas principales son: fusiforme, cuneiforme, ovoide, deltoide, globosa o semiesférica. Una capa de mucílago y pectina en la parte externa de la semilla previene su desecamiento y la hace resbaladiza. El tegumento exterior de la semilla o testa es amarillento en color y con rebordes. El final del ángulo agudo es el punto de la semilla donde está insertado el embrión de la fruta. El tegumento interno o tegmen es membranoso y muy delgado. Dentro de la semilla hay dos cotiledones más o menos semiesféricos más el embrión. Los cotiledones en su mayoría son de color marfil pálido o amarillos, excepto en las mandarinas donde éstos son verdes (Ladaniya, 2010).

Las semillas de cítricos son reconocidas como fuente de aceite comestible para uso humano, ya que contienen ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico y linóleo (Martínez Guerrero, 2007). Las semillas

poseen una cubierta dura (lignocelulósica) y contienen una importante cantidad de fibra, grasas y proteínas, que son muy poco abundantes en el resto del fruto (García Herrera, 2007).

El porcentaje que representa la semilla en los cítricos va de 0.5 a 4 % en peso del fruto. Asimismo, dentro de estas semillas se encuentra la mayor concentración de limonoides en forma aglicona; éstos son compuestos de naturaleza triterpenoide y que poseen una amplia variedad de actividades benéficas para el ser humano. Se ha encontrado que los tres principales limonoides (limonina, nomilina y obacunona), son ubicados entre la mayoría de las especies cítricas. Y cada especie contiene concentraciones características de limonoides totales e individuales (Rouseff y col., 1982).

1.1.2. Efecto de factores climáticos en la composición química de las frutas.

La composición química de cada fruta está determinada por las características de las diferentes variedades existentes, influenciada también por factores externos. El suelo en el que se plantan los árboles determina características especiales, tales como la cantidad y tiempo de aplicación de fertilizantes. La temperatura del área donde crecen, no solamente tiene influencia en la calidad interna de la fruta, sino también en su apariencia externa y en la textura. El desarrollo del color superficial está fuertemente influenciado por la temperatura del ambiente de crecimiento (Ross y Kasum, 2002).

Las condiciones climáticas son el principal factor que afecta la calidad de la fruta. La alimentación de la planta también tiene influencia en las características que tendrán sus frutos, por ejemplo, utilizar fertilizantes ricos en potasio afecta la calidad del jugo, puede aumentar el tamaño de la fruta, ocasiona que la textura de la corteza sea más gruesa, se presenta una madurez tardía y un bajo contenido de sólidos solubles en el jugo, lo que no sucede cuando se utilizan fertilizantes bajos en potasio (Barret et al, 2005).

La variabilidad química de los compuestos bioactivos y su relación con los factores genéticos y climáticos ha sido estudiada por diversos autores; se han realizado comparaciones de la influencia de la variedad a niveles inter e intraespecíficos en el contenido de los micronutrientes de diferentes jugos de cítricos. Existen algunas evidencias de los efectos de la variedad y del medio ambiente en la producción de metabolitos secundarios en los cítricos. El contenido de flavonoides en las frutas depende principalmente de las características genéticas (Cano y col., 2004).

1.1.3. Procesamiento

Por otra parte, se sabe que en el ciclo 2013 México ocupó el cuarto lugar a nivel mundial en la producción cítrica, al producir siete millones cuatrocientos setenta mil toneladas de cítricos anualmente, siendo naranja y limón los cultivos con mayor producción, de la producción total (SIAAP, 2015). Esta producción de cítricos está dividida en 4'409,967 toneladas de naranjas; 2'138,736 toneladas de limas y limones; 493,642 toneladas de tangerinas y mandarinas; 425,432 toneladas de toronjas y 1,700 toneladas correspondientes a otros cítricos (FAO, 2014). Los cítricos se consumen principalmente como fruta fresca y generalmente se procesan para obtener jugos (concentrado, fresco, pasteurizado, etc.), mermeladas o jaleas (Ladaniya, 2010).

Los principales países productores de cítricos son China, Brasil y E. U. A, quienes transforman la mayoría de la fruta en jugo; los otros países productores (India, México, España e Italia) solo destinan un promedio de entre el 25- 30 % a esta actividad (Russo y col. 2014, Rousef y col., 2009, Bocco y col., 1998). En México se transforman alrededor de dos millones doscientos cuarenta y un mil toneladas de cítricos anualmente; considerando que el 50% de los frutos procesados corresponden a cáscaras y semillas (Fernández y col., 2004) se puede suponer que se generan aproximadamente 1'200,000 toneladas de subproducto al año.

Si consideramos que el fruto contiene en promedio aproximadamente un 2% en semillas, podríamos hablar de 22,400 toneladas de semillas desaprovechadas anualmente, las cuales contienen alrededor del 20-30% de aceite vegetal, mismo que hasta la fecha no es aprovechado. Ambos subproductos, cáscaras y semillas, son entonces fuentes interesantes de moléculas que pudieran presentar un efecto nutracéutico, debido al contenido de compuestos fenólicos, en los que incluimos a los tocoferoles, ácidos fenólicos y flavonoides, como polimetosilato, el glicosilato, naringina y la hesperidina, y al contenido de limonoides como limonina, nomilina, y obacunona, entre otros bioactivos.

Esta cantidad de subproductos se convierte en un problema de contaminación debido a que son susceptibles a sufrir deterioro microbiano y rara vez son aprovechados, y cuando se utilizan, no se aprovecha su potencial nutracéutico, porque solo son utilizados como alimento para ganado ó compostas, pudiendo ser una fuente de pectinas, d-limoneno, ácido ascórbico (Russo y col. 2014, Bhimanagouda y col. 2009; Fernández y col., 2004, Rousef y col., 2009) o de compuestos fenólicos, aceites esenciales, flavonoides, ácidos fenólicos, entre otros, los cuales han mostrado diversas

actividades biológicas (Manthey y col., 1996; Benavente y col., 1997; Bocco y col., 1998; Cowan, 1999; Manthey y col., 2001; Stange y col., 2002) incluso también pudieran ser una fuente importante de limonoides, los cuales podrían representar una alternativa contra neoplasias (Manners y col, 2007, Breksa y col. 2007, Bagge, 2003, Jaiprakash y col. 2010, Jaiprakash y col. 2009, kotomballi y col 2011).

1.2.LIMONOIDES

Los limonoides son triterpenoides oxigenados con un esqueleto de 4, 4,8-trimetil-17-furanilsteroidal presentes en la gran mayoría de las familias de las Rutaceae y Meliaceae. Son considerados metabolitos secundarios a los cuales no se les ha encontrado una relación directa con el crecimiento o desarrollo de las plantas.

Estos limonoides presentan ciertas características estructurales como un anillo furano unido a un anillo D en el carbono C-17, además de contener en C-3, C-4, C-16 y C-17 un grupo epóxido y un grupo metilo u oximetileno en el carbono C-19. Naturalmente, las moléculas de los diferentes limonoides comparten dichas características estructurales (Figura 1.3). Sin embargo, no hay una cifra general para el peso molecular de limonoides debido a sus diversas estructuras químicas (Yu, 2004).

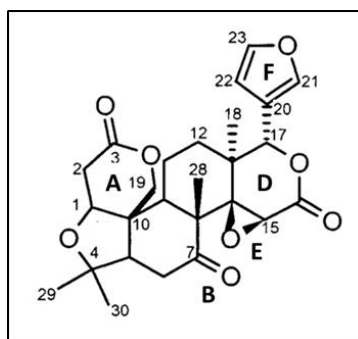


Figura 1-3 Características Estructurales comunes en limonoides:

Anillo furano (F) en C-17, grupo quetona (B) en C-7, grupo epóxido (E) C-14,15 (exceptuando la desoxilimonina), anillos lactona (A y D), grupos funcionales oxigenados en el C-3, C-4, C-16 y C-17 y un metil ó un oximetileno en el C-19.

Aunque a principios del siglo pasado se tenía esta información, aún no era posible determinar una estructura química, ni mucho menos su peso molecular debido a su diversidad estructural y sus sensibles modificaciones (Bhimanagouda y col. 2009). Y no fue sino hasta 1938 cuando se pudo aislar el primer limonoide en jugo de naranja, y fue la limonina. Mientras tanto, investigadores también

aislaron compuestos similares a la dilactona, esto en la corteza del árbol de corcho (*Phyllodendron amurense* Rupr), aunque enseguida fueron identificados como obaculactona, que prácticamente era limonina (Hasegawa y col. 2000).

Al mismo tiempo que se identificaba a la limonina, también se pudieron identificar otros limonoides como la obacunona, la nomilina y el ácido obacunoico, pero los esfuerzos se enfocaron únicamente en encontrar la estructura química de la limonina, esto por su relación con el amargor en el jugo de cítricos; veinte años después se estableció su estructura, composición $C_{26}H_{30}O_8$ y peso molecular (470) mediante cristalografía con rayos X (Hasegawa y col. 2000). El peso molecular de la Nomilina, otro limonoide aglicona encontrado, fue determinado con una fórmula de $C_{26}H_{32}O_8$. Los eventos importantes en los avances de la investigación en limonoides se pueden observar en la tabla 1.1

Tabla 1-1 Hitos en la investigación de limonoides en cítricos

| Año | Logro |
|------|--|
| 1841 | Identificación de limonoides por Bernay. |
| 1938 | Aislamiento de limonina e Isolimonina a partir de semilla de naranja. |
| 1940 | Identificación de limonina en diferentes semillas de <i>Citrus spp.</i> |
| 1946 | Identificación de obacunona, ácido obacunoico, ácido isolimonoico |
| 1946 | Se estableció la estructura de la limonina comprobando la estabilidad del grupo lactona |
| 1948 | Aislamiento de nomilina en semillas de naranja y limón y se estableció su fórmula $C_{26}H_{32}O_8$ |
| 1951 | Aislamiento de obacunona en semillas de cítricos |
| 1951 | Se detectan modificaciones en la estructura de la limonina |
| 1960 | Se identifican dos anillos lactona en limonina, los cuales pueden ser abiertos reversiblemente, sustitución β en anillo furano, oxigenación en el anillo cetónico. |
| 1960 | Se establece la estructura de la limonina mediante cristalografía de rayos X |
| 1961 | Presencia de dobles enlaces en anillo furano, insaturación β de lactona en la obacunona |
| 1960 | Aplicación de espectroscopia de RMN |
| 1965 | Aplicación de RMN para la elucidación de la estructura de limonoides |
| 1965 | Limonina, limonoide mayoritario en toronja. |
| 1968 | Identificación de limonina monolactona, como precursor de limonina. |
| 1970 | Desarrollo de cromatografía de capa fina para la identificación de limonoides. |
| 1975 | Desarrollo de HPLC para cuantificación de limonoides |
| 1986 | Se reportan limonoides glucosilados a partir de <i>Melia azedarach</i> |
| 1989 | Se reportan limonoides glucosilados en <i>Citrus spp.</i> |
| 2000 | Se desarrolla cromatografía de líquidos acoplada a espectroscopía de masas en el análisis de limonoides. |
| 2002 | Obtención de limonoides glucosilados |
| 2006 | Escalamiento de un proceso de purificación de limonoides |

Bhimanagouda y col. 2009

Una vez identificados los limonoides principales y ya con acceso a nuevas técnicas, como cromatografía y resonancia magnética nuclear, comenzó el descubrimiento de nuevos limonoides, como Dreyer y col., 1965 quienes descubrieron la deacetilnomilina, deoxilimonina, rutaevina y la ichangina. Estudiándose enseguida la relación entre estos limonoides, ya que muchos de ellos son precursores o productos durante la síntesis de limonoides por la planta.

También fue posible entender el contenido de limonoides en las diferentes partes de las plantas, donde en particular los limonoides en cítricos se encuentran distribuidos en los tejidos conectivos del árbol, pero conforme el árbol crece y madura, los limonoides se distribuyen en las diferentes partes, tanto del árbol como en el fruto (Endo y col. 2002, Berhow y col.; 2000) y dentro de la distribución de los limonoides en el fruto, la mayor cantidad se presenta en las semillas, siendo menor en cascarilla de semillas, después en el albedo, flavedo y por último, en mucho menor concentración, en las vesículas del jugo como se aprecia en la Figura 1.4.

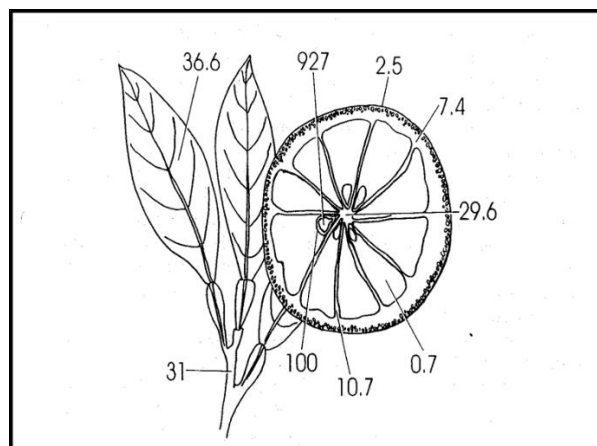


Figura 1-4 Distribución de limonina en toronja blanca y tejidos vegetales ($\mu\text{g}/100\text{mg}$).

Dentro del género *Citrus*, se encontró que los limonoides pueden estar presentes en forma natural de dos maneras: en forma glicosilada (principalmente en el jugo y tejidos del fruto) y en forma aglicona (principalmente dentro de las semillas) (Vahdettin y col., 2010). La forma glicosilada de los limonoides se encuentra enlazada a una molécula de glucosa mediante un enlace β -glucosídico a la posición 17 del anillo-A lactona del limonoide (Herman y col., 1990, Hasegawa y col, 2000; Berhow y col. 2000). Éstos forman una molécula polar soluble en agua con un sabor insípido. Los limonoides aglicona son la forma hidrolizada de los limonoides glicosilados ya que no contienen la molécula de glucosa

enlazada a su estructura, por lo tanto son moléculas no polares insolubles en agua y poseen un sabor amargo (Vahdettin y col., 2010).

La Figura 1.5 muestra la diferencia estructural entre una molécula de limonoide aglicona y su forma glicosilada.

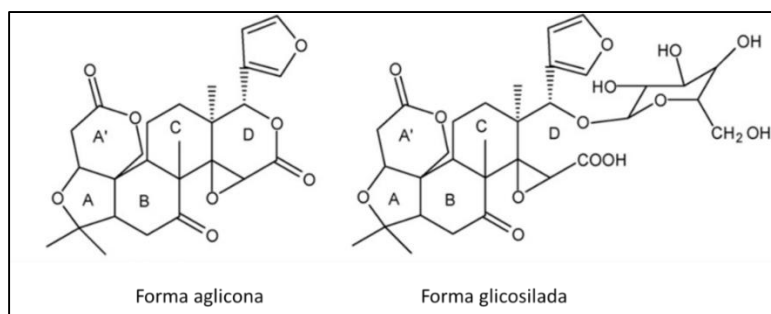


Figura 1-5 Limonoide en estado aglicona y glicosilado.

Los limonoides aglicona se clasifican en limonoides monolactonas y en limonoides dilactonas. Los primeros tienen un anillo-D abierto (como el D-limonoato lactonano). Y los segundos tienen el anillo-D cerrado (como la limonina) (Yu, 2004). En la Figura 1.6 se muestran las principales formas de aglicona de los limonoides limonina (1), nomilina (2), y obacunona (3), mientras que la limonina 17 alfa-D-glucopiranosida es la forma glicosilada predominante (Ruberto y col., 2002).

Estos metabolitos al ser constituyentes importantes en los cítricos, exhiben un amplio rango de actividades biológicas, como la antibacteriana, antifúngica, antiviral, citotóxica y actividad insecticida; esta última es una de las razones de ser de los limonoides aglicona (Hazrat y col. 2012, Hafeez y col. 2011;), porque estas propiedades se desarrollan para proteger a la semilla de la gran cantidad de insectos, incluso, estos limonoides aglicona se pueden encontrar a lo largo de la planta cítrica en estado joven, y se cree que es para su protección del ataque de ciertos insectos y microorganismos patógenos durante el crecimiento de la planta (Cowan, 1999; Manners, 2003; Hasegawa y col., 2000; Ruberto y col., 2002).

1.2.1. Biosíntesis de limonoides

Las rutas de la biosíntesis de los limonoides han sido propuestas con base en un estudio de rastreo radioactivo desarrollado por Hasegawa y col. 2000. La nomilina es frecuentemente el precursor de todos los demás limonoides aislados del género *Citrus* y de sus híbridos. La nomilina es biosintetizada

en la región del floema del tejido del tallo, esto a través de las rutas biosintéticas de los terpenoides del acetato y mevalonato, a partir del farnesil pirofosfato. Misma que es entonces transportada del tallo hacia las hojas, a los tejidos de la fruta, a la cáscara y semillas, donde posteriormente se metaboliza dentro de los otros tejidos, generando los demás limonoides a través de al menos cuatro diferentes rutas: la ruta de la limonina, Figura 1.7, la ruta de la calamina, la ruta de ichangensis y la ruta del 7-acetato- limonoide (Hasegawa y col., 2000).

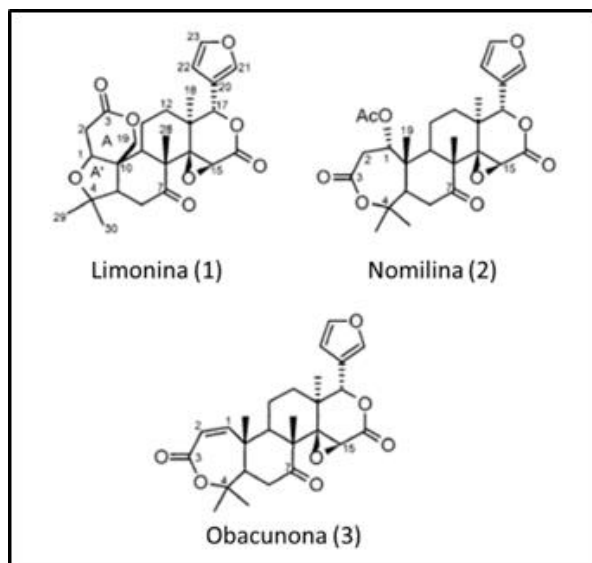


Figura 1-6 Estructura de los principales limonoides aglicona dentro de las semillas cítricas.

Existen cinco grupos de enzimas involucradas en la biosíntesis y biodegradación de los limonoides en los cítricos. Un grupo está presente sólo en la región del floema del tejido del tallo y se dedica a la producción de nomilina. Un segundo grupo que está encargado de la conversión de la nomilina en otros limonoides aglicona como se observa en la figura 1.7 y que está presente en todos los tejidos del cítrico incluyendo las hojas, el tallo, cáscara y semillas, a pesar de la madurez del fruto.

La enzima anillo-D lactona hidrolasa limonoide se encuentra en las semillas y se encarga de catalizar la lactonización del anillo-D. Las recién sintetizadas monolactonas son transformadas a dilactonas dentro de las semillas mediante esta enzima durante el crecimiento del fruto. La UDP-D glucosa glucosiltransferasa limonoide, es la enzima que cataliza la conversión de los limonoides aglicona en sus respectivos glicósidos durante la maduración, esta actividad ocurre dentro de los tejidos del fruto y semillas.

La actividad de la β -glucosidasa glicosida limonoide, que cataliza la hidrólisis de los limonoides glicosilados para liberar los limonoides aglicona y glucosa durante la germinación de la semilla sucede sólo en las semillas (Hasegawa y col., 2000).

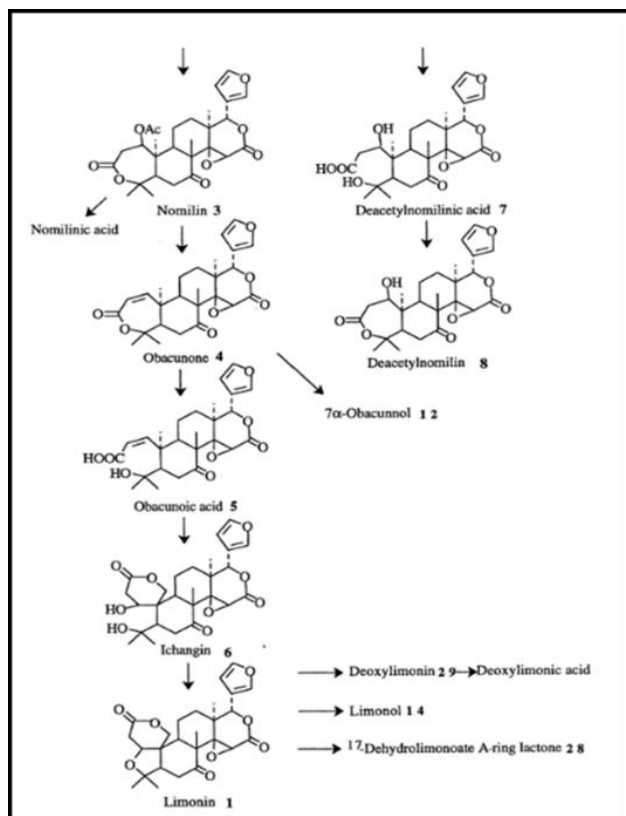


Figura 1-7 Síntesis de limonina a partir de Nomilina.

1.2.2. Estabilidad de los limonoides

Debido a su amargura la cantidad de limonina se considera un indicador de calidad en la industria procesadora de cítricos. El umbral de amargura de ésta es de 6.5 ppm, y éste es maximizado a un pH de 3.8 debido a que a este pH se suprime su amargura. Las propiedades térmicas de la limonina son muy estables y tiene un punto de fusión de 298 °C. La estabilidad y velocidad de degradación de estos compuestos se puede ver afectada por diversos factores como la humedad, temperatura, pH, y nivel de oxígeno.

La limonina es estable en un rango de pH de 2-9 y su máximo de estabilidad es a pH 5 y 45 °C. Sin embargo, la limonina se degrada completamente en un rango de pH 10 – 12. Por otro lado, se genera un isómero de la limonina llamado ácido limonéxico por el ataque a un anillo furano por un ácido fuerte.

Además, la estabilidad de la limonina se ve afectada por la temperatura en condiciones ácidas o básicas. La limonina exhibe un máximo de estabilidad a 45°C (Jinhee y col., 2012).

1.2.3. Actividad biológica de los limonoides

Diferentes estudios epidemiológicos sugieren la relación inversa entre el consumo de frutas cítricas y muchos tipos de cáncer (Vahdettin y col., 2010). Los limonoides tienen el potencial para detener, desacelerar o matar células cancerígenas (Jayaprakasha y col. 2008). También han demostrado inhibir la proliferación celular del cáncer de mama (Guthri y col. 2000), así como detener el desarrollo de neuroblastomas a nivel laboratorio (Poulose y col 2006). Además no producen efectos secundarios, a diferencia de los fármacos actualmente utilizados contra estos padecimientos (Manners, 2007). Por lo tanto, estos compuestos pueden ser utilizados como ingredientes activos en alimentos funcionales (Vahdettin y col., 2010).

Por otro lado, los limonoides aglicona (limonina, nomilina y obacunona) tienen la habilidad de inducir un sistema de enzimas desintoxicantes de la glutatión-S-transferasa (GTS) en el hígado y en la mucosa intestinal (Hasegawa y col., 2000). Esta inducción se reflejó en la inhibición de la formación de tumores en animales de laboratorio (Miller y col., 1989).

Tabla 1-2 Hitos sobre la actividad biológica de limonoides

| Año | Investigación |
|------------|---|
| 1983 | Evaluación de limonoides cítricos contra cultivos celulares de leucemia |
| 1986 | Actividad insecticida de limonoides cítricos |
| 1989 | Inhibición de neoplasia estomacal en ratones por limonoides cítricos. |
| 1989 | Inducción de GST por limonoides cítricos |
| 1989 | Inhibición de carcinogénesis oral por limonoides |
| 1997 | Inhibición de la maduración de larvas de mosquito |
| 2000 | Regulación de la producción de apo-B por limonoides cítricos |
| 2001 | Inhibición de carcinogénesis de colon en ratas |
| 2003 | Actividad antiviral contra VIH |
| 2004 | Inhibición de carcinogenesis oral por limonoides |
| 2006 | Inhibición de carcinogénesis de colon en ratones |
| 2006 | Inhibición de líneas celulares de neuroblastomas |
| 2008 | Inhibición de cultivos celulares de cáncer de colon |

Bhimanagouda y col. 2009

Varios limonoides cítricos, principalmente limonina, nomilina y obacunona, han demostrado poseer actividades interesantes para el ser humano, algunas de las cuales se pueden observar en la tabla 1.2, en donde también se observa actividad insecticida y antialimentaria contra una variedad de insectos plaga, incluyendo el gusano de mazorca (*Helicoverpa zed*), el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), el escarabajo de las papas de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*) y el gusano del abeto (*Lepidoptera tortricidae*). Los limonoides también incrementan la mortalidad y reducen el desarrollo del mosquito adulto (*Culex quinquefasciatus*) (Bhimanagouda y col. 2006).

1.3.EL CANCER

El cáncer puede ser considerado como una enfermedad genética compleja, que es el resultado de cambios continuos en los genes, generalmente de proliferación, diferenciación y muerte celular (Boccardo y col. 2004). Se caracteriza por el crecimiento desordenado y no controlado de las células, que en la actualidad se relaciona con el término neoplasia maligna (Almeida y col., 2005). La evidencia de las mutaciones en los casos de cáncer, inicialmente surgió de la observación de los cambios genéticos recurrentes y en algunos tipos de tumores específicos. Se sabe que estos cambios afectan a diferentes pasos en las vías que regulan los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Cavenee y col., 1995; Boccardo y col. 2004).

Las células que sufren la transformación neoplásica generalmente expresan antígenos que parecen ser del tipo normal, incluso pueden tener otros signos de inmadurez, aparentes anomalías cromosómicas cualitativas o cuantitativas, incluyendo diversos cambios y la aparición de secuencias de genes amplificadas. Estas células proliferan en exceso y forman tumores locales, que pueden comprimir o invadir estructuras normales adyacentes (Katzung, 2010). Si sumado a esto y a la complejidad y no existencia de vías alternas en el control de la proliferación celular, la aparición de alteraciones sucesivas adicionales en diferentes genes, repercuten en la formación de tumores.

En el proceso de progresión tumoral, algunas células tumorales pierden su capacidad de adhesión, invaden la membrana basal del tejido de origen mediante la producción de enzimas proteolíticas, cruzan la pared del vaso sanguíneo, caen en las zonas de circulación y su forma de proliferación en otros tejidos aumenta, y es a lo que se le llama metástasis (Adorjan, 2010). Esta capacidad del crecimiento desmedido y su invasión a tejidos cercanos y formar metástasis es la responsable de la muerte de dos de cada tres pacientes con un diagnóstico de cáncer (Otake y col., 2006).

Hay diferentes tipos de cáncer y cada uno corresponde a diferentes tipos de células del cuerpo. Como ejemplo, el término que se refiere al carcinoma es el que comienza en los tejidos epiteliales; en el caso del que comienza en el tejido conectivo, se convierte en sarcoma; y linfoma, se refiere a todos los tipos de cáncer del sistema linfático o leucemia (Brandão y col., 2010). Actualmente hay más de un centenar de tipos de cáncer conocidos, diferenciados por la etimología, el proceso de evolución y tipo de tratamiento, por lo tanto, el cáncer no puede ser considerado como una sola enfermedad (Carvalho, 2006).

El proceso de la carcinogénesis, es decir, la transformación de una célula normal en una célula tumoral, generalmente se produce lentamente, y le puede llevar varios años a una célula cancerosa dar lugar a un tumor detectable. Este proceso pasa por varias etapas antes de alcanzar el tumor, y éste es a menudo el resultado de un sistema complejo y multifactorial, que incluye principalmente la interacción de genética y tres categorías de agentes o factores externos como: carcinógenos físicos (como la radiación ultravioleta y ionizante), carcinógenos químicos (como diversos componentes del humo del cigarrillo o contaminantes del agua y los alimentos) y carcinógenos biológicos (como la infección por ciertos virus, bacterias y parásitos) (Almeida y col., 2005; WHO, 2011).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados y en vías de desarrollo, por lo tanto, es una preocupación mundial. Estadísticas globales publicadas en 2007 por Jemal y col. indican que el número total de muertes por cáncer en 2007 fue de 7.6 millones, o alrededor de 20,000 muertes por día, con un 38% en los países desarrollados y el 62% en los países en desarrollo. En 2050, se prevé que ocurran 27 millones de nuevos casos y 17.5 millones de muertes por cáncer en el mundo (Jemal y col., 2007). Por lo que numerosas investigaciones se han dedicado a estudiar o desarrollar nuevos enfoques para reducir la amenaza causada por el cáncer.

El reto para los tratamientos del cáncer es distinguir las células malignas de las normales, ya que son relativamente similares. La quimioterapia es una opción importante en el tratamiento moderno del cáncer, ya que se basa en la búsqueda de la destrucción de las células cancerosas, que se caracterizan por el hecho de que se dividen mucho más rápido que la mayoría de las células normales. Sin embargo, los efectos indeseables significativos pueden ocurrir en las células normales de crecimiento rápido, tales como el tracto gastrointestinal, los capilares y el sistema inmunológico, lo que da como resultado la aparición de diarrea, náuseas, vómitos, alopecia y aumento de la susceptibilidad

a las infecciones (Almeida y col., 2005; Brandão y col., 2010). Actualmente existen muchos fármacos contra el cáncer disponibles clínicamente, incluso algunos de ellos proceden de productos naturales y se utilizan para tratar ciertas leucemias, linfomas y tumores sólidos (Chabner y col., 2005; Devita y col., 2008) pero ninguno cumple con los requisitos del fármaco ideal contra el cáncer, erradicar las células cancerosas sin dañar los tejidos normales, por lo que el uso clínico de estos fármacos requiere valorar que los beneficios sobrepasen la toxicidad o efectos secundarios en busca de un índice terapéutico favorable (Katzung, 2010).

1.3.1. El cancer y bioactivos de origen natural

Estudios recientes reafirman la importancia de los productos naturales como una fuente de medicamentos, por lo que la contribución de los productos naturales en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos es incuestionable (Barreiro, 2009). Esto basado sólo mediante el cálculo de que en los últimos 25 años, más del 75% de los agentes contra el cáncer probados y validados se derivan de productos naturales (Nogueira y col., 2010).

Tradicionalmente, los fármacos para el tratamiento del cáncer han sido descubiertos por el cribado a gran escala de productos químicos sintéticos y productos naturales utilizados en contra de tumores en animales, principalmente leucemias murinas, como la L5178Y. Por lo que este paso es importante en la evaluación de bioactivos contra el cáncer (Goodman, 2006).

En la actualidad, la biología del cáncer ha sido muy estudiada y una de las principales líneas de investigación en esta área es el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. Siendo las plantas una amplia fuente de bioactivos que pudieran generar medicamentos a base de éstos, debido a una impresionante variedad de estructuras y funciones que pudieran presentar actividad contra el cáncer (Cragg y col., 2005).

Entre ellos se encuentran desde los alcaloides de la vinca, vinblastina y vincristina *Catharanthus roseus* G. (Apocynaceae), cuyo aislamiento ha introducido una nueva era de la utilización de las plantas medicinales como agentes anticancerígenos (Cragg y col., 2005). El descubrimiento del paclitaxel, de la familia taxano que es un complejo diterpeno que se extrajo en 1962 a partir de los extractos de corteza de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) o mejor conocido como Yew (Altmann y col.,

2007), el cual mostró una excelente actividad contra el cáncer en cultivos *in vitro* y en 1977 comenzaron las pruebas preclínicas por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI).

Otro hallazgo importante en el área del cáncer son las sustancias del género *Podophyllum* (etopósido y tenipósido), tales como *P. peltatum* y *P. emodii*, utilizado por las poblaciones nativas de América y Asia en el tratamiento de cáncer de piel y verrugas. Todas estas sustancias naturales y sus derivados trabajan en diferentes tipos de cáncer, revelando diferentes espectros de actividad y toxicidad.

Teniendo en cuenta estos aspectos, es obvio el lugar y la importancia que los productos naturales ocupan en la industria farmacéutica, es por eso que se consideran importantes como fuente de nuevos bioactivos para el tratamiento del cáncer. Basándose en los avances significativos en la investigación de la biología del cáncer y en busca de moléculas que funcionan con mecanismos específicos para cada tipo de la enfermedad (Vieira y col., 2010).

De hecho, más de un centenar de derivados de compuestos de productos naturales se encuentran en fase de ensayo clínico, en especial para el tratamiento del cáncer y contra algunas enfermedades infecciosas. Además de que existe un total de 13 derivados de productos naturales que ya como medicamento han sido aprobados para uso clínico entre 2005 y 2007 (Harvey, 2008; Costa y col., 2010).

Teniendo en cuenta lo anterior, las fuentes naturales todavía están disponibles en abundancia y ofrecen las mejores posibilidades de encontrar sustancias de interés terapéutico, más aún en los subproductos del procesamiento de alimentos, como en este trabajo, el aprovechamiento de las semillas de cítricos para la obtención de extractos de limonoides.

BIBLIOGRAFÍA

- Adorjan, B.; Buchbauer, G. (2010) "Biological Properties of Essential Oils: An Updated Review". J. of Flavor and Fragrances, Vol. 25, p. 407-426.
- Almeida, V. D., Leitão, A., Reina, L. D. C. B., Montanari, C. A., Donnici, C. L., y Lopes, M. T. P. (2005). "Cancer and cell-cycle specific anti-neoplastic agents and non-cell cycle specific that interact with DNA: An Introduction". Quim Nova, Vol. 28, 118-29.

- Altmann, Karl-Heinz, y Jürg Gertsch. (2007) "Anticancer drugs from nature—natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents." *Natural product reports* Vol. 24.2: 327-357.
- Bagge, D. (2003). *Limonoids: Pesticide to anticancer applications from secondary metabolites of the Rutaceae and Meliaceae*. Colorado, USA. Colorado State University Fort Collins, Colorado.
- Baraona Cockrell, M., y Sancho Barrantes, E. (1998). "Cítricos" Vol. 2. Costa Rica.
- Barreiro, E. J.; Bolzani, V. S. (2009) "Biodiversity: a potential source for drug discovery". *Quím. Nova*, Vol. 32, n. 3, p. 679-688.
- Barret, D.M., Somogui, Laszio, S., Ramaswamy, H. (2005). "Lemons and orange fruits. *Processing Fruits*", Science and Technology, 2ª ed., CRC Press. C.25-26.
- Benavente, O.G.; Castillo, J.; Marin, F.R.; Ortuño, A.; Del Río, J.A. (1997). "Uses and properties of Citrus flavonoids". *Review. J. Agric. Food Chem.* Vol. 45 (12): 4505-4515.
- Berhow, M.A., Hasegawa, S., Manners, G.D., (2000). *Citrus limonoids. Functional Chemicals in Agriculture and Food*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 253–260.
- Bhimanagouda Patil, S., Brodbelt Jennifer, S., Miller Edward, G., y Turner Nancy, D. (2006). "Potential Health Benefits of Citrus: An Overview Potential Health Benefits of Citrus" Vol. 936, pp. 1-16: American Chemical Society.
- Bhimanagouda S. Patil, G. K. Jayaprakasha, K.N. Chidambara Murthy, y Amit Vikram, (2009) "Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities, and Challenges, *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 57, 8142–8160.
- Boccardo, E., Villa, L. L., Ferreira, C. G., y Rocha, J. C. C. (2004). "Viruses and cancer" Ferreira CG, Rocha JCC. *Oncologia molecular*. São Paulo: Atheneu, 123-132.
- Bocco, A.; Cuvelier, M.E.; Richard, H.; Berset, C. (1998) "Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts". *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46: 2123-2129.
- Braddock, R. J. (1999). Braddock, R. J., & E. Weiss (Eds.), "Handbook of citrus by-products and processing technology". Wiley: New York.
- Brandão, H. N.; David, J. P.; Couto, R. D.; Nascimento, J. A. P.; David, J. M., (2010). "Chemistry and Pharmacology of Anticancer Derived From Plants". *Química Nova*, Vol. 33, p. 1359-1369,
- Breska A.P. y P. Ibarra (2007) "Colorimetric method for the estimation of total limonoid aglycones and glucoside contents in Citrus juices", *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 13, pp. 5013–5017

- Cano, A. y Arnao, M.B. (2004). "Actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica y contenido en vitamina C en zumos de naranja comerciales: relación con sus características organolépticas". *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, Vol. 4, No. 3, 185-189.
- Carvalho, J. E., (2006) "Antiulcer and Anticancer Natural Products Synthesis and activity". *Multi-Science: Constructing the History of Natural Products*, Vol. 7, pags. 1-18.
- Cavenee, W. K.; White, R. L. (1995) "The genetic basis of cancer. An accumulation of genetic defects can apparently cause normal cells to become cancerous and cancerous cells to become increasingly dangerous". *Scient. American*, Vol. 272, p.72-79.
- Chabner, B.A., Amrein, P.C., Druker, B.J., Michaelson, M.D., Mitsiades, C.S., Gross, P.E., Ryan, D.P., Ramachandra, S. Richardson, P.G., Supko, J.G., Wilson, W.H., (2005). In: Brunton, L.L., Laso, J.S., Parker, K.L. (Eds.), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1315–1403.
- Cowan, M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* Vol. 12(4): 564-582.
- Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I.; Newman, D. J.; (2005) *Anticancer Agents from Natural Products*, Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton,.
- Devita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. (2008). "Cancer: Principles and Practice of Oncology". 8th ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia,
- Dreyer, D. L. (1965) "Citrus bitter principles: application of NMR to structural and stereochemical problems". *Tetrahedron*, Vol. 21 (1), 75–87.
- Endo, T., Kita, M., Shimada, T., Moriguchi, T., Hidaka, T., Matsumoto, R. y Omura, M. (2002). "Modification of Limonoid Metabolism in Suspension Cell Culture of Citrus". *Plant Biotechnology*, Vol. 19(5), 397-403.
- Espinal G., C. F., Martínez Covalada, H. J., y Peña Marín, Y. (2005). *La Cadena de los Cítricos En Colombia: Una Mirada Global De Su Estructura Y Dinámica 1992-2005*. In O. A. Colombia (Ed.), Documento de Trabajo No. 66 (pp. 61). Bogotá, Colombia: Ministerio De Agricultura Y Desarrollo Rural.
- FAOSTAT. (2014). Consultado 15 de Agosto 2014, de <http://faostat.fao.org/>
- Fernández-López J; Fernández-Ginés J., Aleson Carbonell L; Sendra, E; Sayas-Barbera E; Pérez-Alvarez J. (2004). "Application of functional citrus by products to meat products". *Trends food Sci. Tech.* Vol. 15, pags 176-185.
- García Herrera, T. (2007). "Desarrollo de un Proceso para el Aprovechamiento de la Semilla del Limón Mexicano Utilizando un Sistema de Lechos Fuente en Multietapa para el Secado". Doctorado en Ingeniería Química, Universidad de Guadalajara.

- Goodman y Gilman, (2006) As bases Farmacológicas da Terapêutica, Editorial Mac Graw Hill – 11a Edición.
- Hafeez Faisal, Akram Waseem, Abdel-Salam Shaalan, (2011) “Mosquito larvicidal activity of citrus limonoids against *Aedes albopictus*” Parasitology Research , Vol. 109, Issue 1, pp 221-229.
- Hasegawa Shin y Mark Berhow; (2000). “Analysis of Limonoids by Thin-Layer Chromatography” ACS Symposium SeriesBook citrus limonoid: chapter 3, pages 31-39.
- Hasegawa Jacob, R. S., y Manners, G. (2000). “The Potential of Citrus Limonoids as Anticancer Agents”. Perishables Handling Quarterly Vol. 102, pags. 6-8.
- Hazrat Bilal, Waseem Akram, y Soaib Ali-Hassan, (2012) “Larvicidal Activity of Citrus Limonoids against *Aedes albopictus* Larvae”, J Arthropod Borne Dis. Vol. 6(2): 104–111.
- Herman, Z., Fong, C. H., Ou, P., y Hasegawa, S. (1990). “Limonoid glucosides in orange juices by HPLC”. J. of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 38(9), 1860-1861.
- Jaiprakash P., G. Jayaprakasha, M. Chidambara, B. Mahadev and P. Bhimanagouda, (2010) “Characterization of Citrus aurantifolia bioactive compounds and their inhibition of human pancreatic cancer cells through apoptosis”, J. Microchemical, Vol. 94, 108–117.
- Jaiprakash P., M. Chidambara, G. Jayaprakasha, C. Mahadev and P. Bhimanagouda, (2009) “Bioactive compounds from Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) juice induce apoptosis in human pancreatic cells”, J. of Agriculture and Food Chemistry, Vol. 57, 10933–10942.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., & Thun, M. J. (2007). “Cancer statistics, 2007”. CA: a cancer journal for clinicians, Vol. 57(1), 43-66.
- Jinhee Kim, G. Jayaprakasha, R. Uckoo, P. Bhimanagouda, (2012), “Evaluation of chemopreventive and cytotoxic effect of lemon seed extracts on human breast cancer (MCF-7) cells”, Food and Chemical Toxicology Vol. 50, 423–430.
- Katzung, B. G. (2010) Farmacologia Clínica Básica. 10. ed. Porto Alegre: AMGH.
- Kotamballi N., M. Chidambara, G. Jayaprakasha, K. Vinod, R. Keerti, P. Bhimanagouda, (2011) “Citrus limonin and its glucoside inhibit colon adenocarcinoma cell proliferation through apoptosis”, J. of Agriculture and Food Chemistry, Vol. 59, 2314–2323.
- Ladanyia, M., (2010). Citrus fruit: biology, technology and evaluation. Academic press.

- Manners Gary D., Breksa III Andrew P., Schoch Thomas K., Hidalgo Marlene B., (2003) “ Analysis of Bitter Limonoids in Citrus Juices by Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Electrospray Ionization Liquid Chromatography-Mass Spectrometry” J. Agric. Food Chem., Vol. 51 (13), pp 3709–3714.
- Manners, G. D., (2007) “Citrus limonoids: analysis, bioactivity, and biomedical prospects”. J. Agric. Food Chem., Vol. 55, pags: 8285–8294.
- Manthey, J.A.; Grohmann, K. (1996). Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. J. Agric. Food Chem. Vol. 44: pags: 811-814.
- Manthey, J.A.; Grohmann, K. (2001). “Phenols in citrus peel byproducts. Concentrations of hidroxicinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses”. J. Agric. Food Chem. Vol. 49, pags: 3268-3273.
- Martínez Guerrero, L. A. (2007). “Extracción del aceite de la semilla de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* swingle) por medio de CO₂ en condiciones supercríticas”. Maestría en Ingeniería Química, Universidad de Guadalajara.
- Miller, E. G., Fanous, R., Rivera-Hidalgo, F., Binnie, W. H., Hasegawa, S., y Lam, L. K. T. (1989). “The effects of citrus limonoids on hamster buccal pouch carcinogenesis”. Carcinogenesis, Vol. 10(8), pags: 1535-1537.
- Nogueira, R. C., Cerqueira, H.F., Soares, M. B. P., (2010), Patenting Bioactive Molecules from Biodiversity: The Brazilian Experience. Expert Opinion Ther. Patents, Vol. 20, n. 2, pags 1-13.
- Otake, A. H.; Chammas, R.; Zatz, R., (2006), New Targets for Cancer Treatment, Ciencia de Hoy. Vol. 38, n. 223, pags. 28-33.
- Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). “Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety”. *Annual review of Nutrition*, Vol. 22(1), pags: 19-34.
- Rouseff, R. L., y Nagy, S. (1982). “Distribution of limonoids in citrus seeds”. Phytochemistry, Vol. 21(1), 85-90.
- Ruberto, G., Renda, A., Tringali, C., Napoli, E. M., y Simmonds, M. S. J. (2002). “Citrus Limonoids and Their Semisynthetic Derivatives as Antifeedant Agents against *Spodoptera frugiperda* Larvae. A Structure–Activity Relationship Study”, J. of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 50 (23), pags: 6766-6774.
- Russo M., Bonaccorsi, G. Torre, M. Sarò, P. Dugo, L. Mondello, (2014) “Underestimated sources of flavonoids, limonoids and dietary fibre: availability in lemon’s by-products”, J. of Functional Foods 918–26.
- Stange, R.; Midland, S.L., Sims, J.; McCollum, T.G. (2002) “Differential effects of citrus peel extracts on growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, and *P. expansum*”. Physiological and molecular plant pathology. Vol. 61, pags: 303-311.

- Tian, Q., Miller, E. G., Jayaprakasha, G. K., y Patil, B. S. (2007). "An improved HPLC method for the analysis of citrus limonoids in culture media". *Journal of Chromatography B*, Vol. 846 (1-2), pags: 385-390.
- Vahdettin, B., y Vahit, K. (2010). "Biochemical and Physiological Evaluations of Limonoids as Potential Cancer Destroyers", *Animal and Veterinary Advances*, Vol. (9), pags: 1099-1107.
- WHO. Câncer. (2011).<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en>
- Yu, J. (2004), "Citrus Limonoids and Flavonoids: Extraction, Antioxidant Activity and Effects on Hamster Plasma Cholesterol". Doctor Of Philosophy, Texas A&M University

CAPÍTULO DOS

FUNDAMENTOS DE LA METODOLOGÍA

2.1.INTRODUCCIÓN

Existen diversas técnicas de extracción para compuestos bioactivos de plantas, algunas tradicionales como la maceración, algunas tecnificadas como la extracción soxhlet y algunas otras modificaciones a éstas, como la extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, o incluso algunas técnicas novedosas como la extracción con fluidos supercríticos.

En el proceso de extracción, la mayoría de las modificaciones a la técnica se realizan con el fin de acortar el tiempo de extracción, disminuir el consumo de disolvente, aumentar el rendimiento de extracción, y mejorar la calidad de los extractos. Por lo que en este capítulo se presentan las bases para entender y comparar la extracción soxhlet convencional y los nuevos métodos alternativos utilizados para la extracción de nutraceuticos de las plantas como lo son los fluidos supercríticos, y

finalmente cómo estas dos técnicas son empleadas de manera puntual, para la obtención de limonoides a partir de componentes cítricos.

También, en este capítulo se presentarán las bases para la identificación de los limonoides obtenidos y cómo la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) ha sido una herramienta muy útil para la identificación de compuestos bioactivos en plantas.

Finalmente se presenta la importancia de la evaluación de su actividad biológica en cultivos *in vitro*, y la versatilidad del ensayo MTT.

2.2.EXTRACCIÓN

Muchas sustancias biológicas, así como compuestos inorgánicos y orgánicos, se encuentran como mezclas de diferentes componentes en un sólido. Para separar el soluto deseado o eliminar un soluto indeseable de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase líquida. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos se difunden desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes originales del sólido. Este proceso se llama lixiviación sólido-líquido, o simplemente, lixiviación. La operación unitaria se puede considerar como una extracción. En la industria de procesos biológicos y alimenticios, muchos productos se separan de su estructura natural original por medio de una lixiviación (Geankoplis, 1998).

En la lixiviación de materiales solubles del interior de una partícula por acción de un disolvente, el proceso general consiste en los siguientes pasos: el disolvente se transfiere del volumen de solución a la superficie del sólido. Después, dicho solvente penetra o se difunde en el sólido. El soluto se disuelve en el disolvente. Entonces, el soluto se difunde a través de la mezcla de sólido y disolvente hasta la superficie de la partícula.

Finalmente, el soluto se transfiere a la solución general. Los numerosos fenómenos que se presentan en este proceso hacen poco práctico y casi imposible aplicar una teoría definida a la acción de lixiviación. En general, la velocidad de transferencia del disolvente de la solución general hasta la superficie del sólido es bastante rápida y la velocidad hacia el interior del sólido puede ser rápida o lenta (Geankoplis, 1998).

La velocidad de difusión del soluto a través del sólido y la del disolvente hasta la superficie del sólido, suelen ser la resistencia que controla el proceso global de lixiviación y dependen de diversos factores, tales como el tamaño de partícula del sólido, la concentración del disolvente, la temperatura del medio, el tiempo de contacto, el número de extracciones, la proporción sólido-disolvente, entre otros.

El éxito en la extracción de bioactivos con solventes a partir de matrices de plantas se basa en la correcta elección del disolvente, junto con el uso de calor y/o agitación. Existen técnicas clásicas utilizadas para obtener bioactivos de plantas como: la extracción tipo soxhlet, la hidrodestilación, la maceración, entre otras.

La extracción tipo soxhlet se ha utilizado durante décadas, desde que en 1879, von Soxhlet desarrolló un nuevo sistema de extracción (Extractor Soxhlet), a pesar de ser una técnica que requiere de mucho tiempo y de un alto consumo de solventes es una técnica estándar utilizada por más de un siglo, siendo la referencia principal para evaluar la extracción sólido-líquido. La extracción soxhlet es una técnica bien establecida, que sobrepasa en desempeño a otras técnicas de extracción convencionales, excepto en la extracción de compuestos termolábiles (Wang y col., 2006).

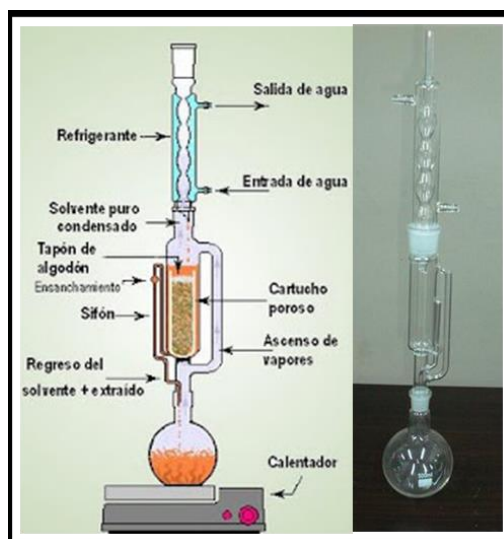


Figura 2-1 Extractor Soxhlet

En un sistema soxhlet convencional, como se muestra en la Fig. 2.1, el material vegetal se coloca dentro de un soporte poroso, se coloca el solvente en un matraz de destilación y comienza a destilarse, los vapores del solvente llegan al condensador y al condensarse comienzan a inundar la zona del material vegetal. Cuando el líquido alcanza el nivel de desbordamiento, un sifón aspira la

solución del soporte poroso del material y lo descarga de nuevo en el matraz de destilación, llevando los solutos extraídos en el líquido al fondo del matraz. En el matraz de solvente, el soluto se separa del disolvente mediante destilación y el proceso se repite hasta agotar los solutos, mismos que se acumularán en el fondo del matraz del solvente. (Wang y col., 2006).

2.2.1. Elección del solvente

La selección del solvente adecuado para la extracción, dependerá de la molécula a extraer y debe ser seleccionado en función de la polaridad del soluto. Diferentes solventes obtendrán diferentes extractos y diferentes composiciones de extracto (Luque de Castro y col., 2010; Zarnowski y Suzuki, 2004). El solvente más utilizado para extraer aceites de origen vegetal es hexano. El hexano tiene un intervalo de punto de ebullición bastante estrecho de aproximadamente 63-69 °C y es un excelente disolvente de aceites en términos de solubilidad, además de su facilidad de recuperación. Sin embargo, el n-hexano, el principal componente del hexano comercial, está catalogado como el número 1 en la lista de 189 contaminantes peligrosos del aire por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (Mamidipally y Liu, 2004). Esta situación también se presenta para los disolventes alternativos tales como isopropanol, etanol, acetona, cloroformo, entre otros, lo que ha aumentado las preocupaciones en salud, seguridad y medio ambiente (Mamidipally y Liu, 2004).

En la obtención de limonoides, es necesario un desgrasado previo, en donde prácticamente en todos los estudios reportados, utilizaron al hexano como solvente para tal efecto, mientras que para su obtención se utiliza una amplia gama de solventes, como acetato de etilo, diclorometano, metanol, acetona, etanol, e incluso agua, para la obtención de los limonoides glucosilados (Manners y col., 2007; Breksa y col., 2007; Bagge, 2003; Jaiprakash y col., 2010; Jaiprakash y col., 2009; Kotomballi y col., 2011).

2.2.2. Características de la matriz

La extracción Soxhlet depende fuertemente de las características de la matriz y principalmente del tamaño de partícula, debido a que la difusión interna es la etapa limitante durante la extracción. Una evidencia de ello es la extracción de la grasa total a partir de semillas oleaginosas, donde se logra una extracción del 99% en 2 horas si el tamaño de las partículas promedio es menor de 0.4mm, sin embargo, este mismo nivel de extracción se logra en 12 horas si se utiliza un tamaño de partícula de 2.0 mm. (Luque de Castro y col., 2010; Wang y col., 2006).

2.2.3. Operación del sistema

Durante la extracción Soxhlet el disolvente generalmente se recupera por evaporación. Las temperaturas de extracción y evaporación tienen un efecto significativo en la calidad de los productos finales. Mamidipally y Liu (2004) encontraron que D- limoneno extraído era ligeramente más oscuro en comparación con el aceite extraído con hexano, probablemente debido a las temperaturas altas de extracción y evaporación usadas durante su obtención. La temperatura alta de ebullición para la recuperación del disolvente se puede disminuir mediante el uso de vacío o mediante una membrana de separación para recuperar el disolvente (Luque de Castro y col., 2010; Wang y col., 2006).

2.2.4. Ventajas y desventajas de la extracción soxhlet

Las ventajas de extracción Soxhlet incluyen: (1) el desplazamiento de la transferencia de equilibrio trayendo repetidamente nuevo disolvente en contacto con la matriz sólida; (2) el mantenimiento de una extracción relativamente a temperatura alta con el calor desde el matraz de destilación y (3) no se requiere filtración alguna después de la lixiviación. Además, el método Soxhlet es muy simple y económico (Luque de Castro y García-Ayuso, 1998).

Las principales desventajas de la extracción Soxhlet incluyen: (1) el tiempo de extracción es largo; (2) se utiliza una gran cantidad de disolvente; (3) no se puede proporcionar agitación en el dispositivo soxhlet para acelerar el proceso; (4) la gran cantidad de disolvente utilizado y que requiere de concentración mediante evaporación y (5) la posible degradación térmica de los compuestos termolábiles. (Luque de Castro y García-Ayuso, 1998).

2.3. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

2.3.1. Historia

En 1822 fue por primera vez reportada la fase supercrítica por el Barón Charles Cagniard de la Tour, en la cual atestiguó visualmente la desaparición de la barrera gas líquido, al calentar ciertos materiales en contenedores cerrados. Los informes consecuentes por Hannay y Hogart (1879) demostraron el poder solvatante del etanol supercrítico ($T_c=243^\circ\text{C}$, $P_c= 63 \text{ atm}$) para el cloruro de cobalto, cloruro de fierro, bromuro de potasio, y el yoduro de potasio, entre ciertos sólidos. Ellos descubrieron que el incremento en la presión del etanol provocaba que los solutos se disolvieran y que una disminución

en la presión causó que los materiales disueltos precipitaran repentinamente. Años después, se demostró que las solubilidades de ciertos materiales orgánicos no volátiles en CO₂ en condiciones supercríticas eran superiores por órdenes de magnitud a las esperadas en base a las presiones vapores de los compuestos puros (Yu, 2004).

En el siglo XX la extracción con fluidos supercríticos era una técnica descuidada y no existía un interés en las bases y fundamentos del proceso, en cambio los esfuerzos se encaminaban a desarrollar nuevas aplicaciones para ésta. En 1964 la patente de Zosel promovió un desarrollo significativo para la extracción mediante fluidos supercríticos en lo que respecta a la química del proceso. Esta patente consistía en la descafeinización del café verde con CO₂ supercrítico, donde los granos se remojan en agua previamente para después ser sumergidos en CO₂ supercrítico.

Desde 1980, las aplicaciones para la extracción con fluidos supercríticos aumentaron en cantidad y en variedad, por ejemplo se empleó para la extracción de lúpulo (Laws y col., 1980), la remoción del colesterol de la mantequilla (Krukonis, 1988), para desarrollar perfumes y esencias a partir de productos naturales (Coenen y col., 1983), la obtención de ácidos grasos insaturados del aceite de pescado (Krukonis Val, 1988), de fitoquímicos a partir de frutas y otras fuentes vegetales (Rozzi y col., 2002).

En la actualidad se estudia la aplicación de los fluidos supercríticos en las siguientes áreas: descontaminación de suelos, reacciones químicas y de síntesis de químicos orgánicos, remoción de cafeína en café, limpieza de partes electrónicas, etc. (Yu, 2004).

2.3.2. Propiedades de los fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico (FSC) es cualquier compuesto a una temperatura y presión por arriba de su punto crítico. En este punto el compuesto es compresible, se comporta como un gas; características que no tiene cuando está en estado líquido (fluido no compresible que ocupa el fondo del contenedor). No obstante tiene la densidad de un líquido y por lo tanto su poder disolvente (Luque de Castro y col., 1993).

En el diagrama de fases de la Figura 2.2 el punto crítico (PC) se encuentra marcado al final de la curva del equilibrio líquido-gas, y el área sombreada indica la región de fluido supercrítico. El punto crítico

de un compuesto se encuentra en la intersección de la temperatura y la presión crítica (Bhimanagouda y col., 2006).

Temperatura crítica: Por arriba de esta temperatura el componente gaseoso del compuesto puro no puede ser licuado sin importar la presión aplicada.

Presión crítica: Por encima de esta presión, el componente líquido del compuesto puro no puede ser evaporado sin importar la temperatura aplicada.

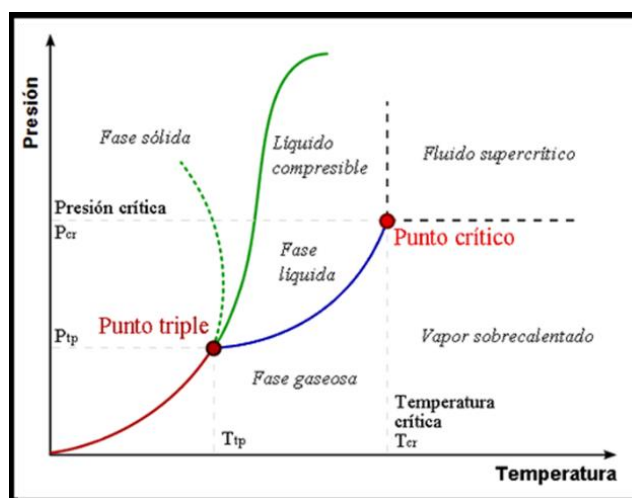


Figura 2-2 Diagrama de fases sólido/líquido/gas/fluido supercrítico.
 PT: punto triple; PC: punto crítico; P_c: presión crítica; T_c: temperatura crítica disolvente

El comportamiento de un fluido en estado supercrítico puede ser descrito como el de un líquido muy móvil. Su solubilidad se aproxima a la de la fase líquida mientras que su penetración en una matriz sólida se facilita debido a su alta difusividad y baja viscosidad. Como consecuencia, las velocidades de extracción y separación de fases pueden ser significativamente más rápidas para los procesos de extracción convencionales (Bhimanagouda y col., 2006)

Las características de un fluido supercrítico se resumen en la Figura 2.3.

La extracción por fluidos supercríticos es dependiente de la densidad del fluido, la cual a su vez es manipulada mediante el control de la presión y temperatura del sistema. El principio básico de la extracción con FSC es que la solubilidad de un compuesto dado (solute) en un solvente varía con ambas: presión y temperatura. A condiciones ambientales la solubilidad de un soluto en un gas usualmente está relacionada directamente con la presión vapor del soluto y es generalmente

despreciable. Sin embargo en un FSC se han reportado solubilidades de hasta 10 órdenes mayores que las predichas por la ley de los gases ideales (Simándi y col., 2009).

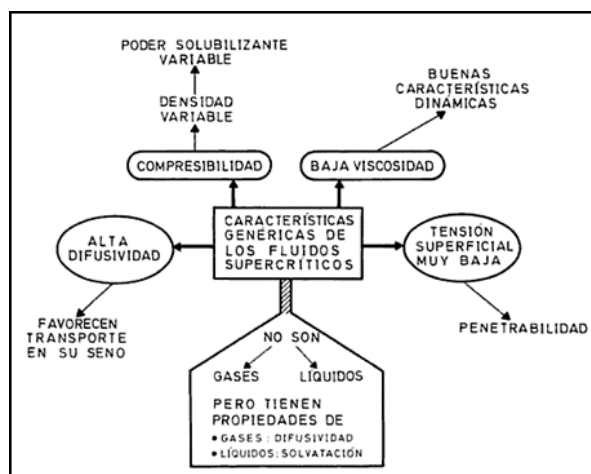


Figura 2-3 Panorama general de las características más sobresalientes de los fluidos supercríticos

Una isoterma de solubilidad típica en la región supercrítica presenta una forma sigmoidea Figura 2.4. Esto indica un incremento exponencial en la solubilidad del fluido hacia un compuesto en particular a una temperatura constante. Estas condiciones incrementan la posibilidad de extraer cierto tipo o grupo de compuestos eligiendo temperaturas y presiones donde la solubilidad para estos compuestos se maximiza. Cambiando estas condiciones cambiará la selectividad para diferentes compuestos (Bhimanagouda y col., 2006)

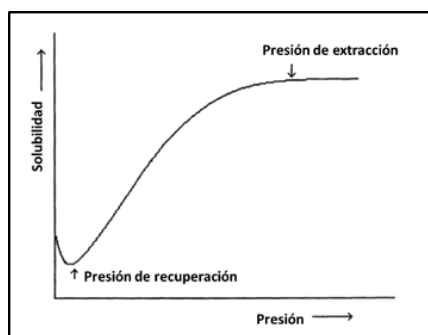


Figura 2-4 Solubilidad de un soluto en función de la presión a temperatura constante

Dicho comportamiento sigmoideo de la solubilidad permite la fácil recuperación de los compuestos disueltos. Cerca del punto crítico, el calor latente de vaporización es muy bajo, esto quiere decir que la separación del producto de una extracción es simple y consume muy poca energía (Bhimanagouda

y col., 2006). En la tabla 2.1 se muestran los fluidos supercríticos comúnmente utilizados así como sus parámetros críticos.

2.3.4. Dióxido de carbono como solvente supercrítico

De entre todos los fluidos supercríticos el CO₂ ha sido mayormente estudiado y aplicado debido a sus bajos parámetros críticos (31.1°C, 73.8 bar), a que es un gas económico, de fácil disponibilidad en estado puro, no tóxico y no flamable (Lang y col., 2001; Bhimanagouda y col., 2006; Yu, 2004). Además de las características propias de los fluidos supercríticos, la baja temperatura crítica del dióxido de carbono lo convierte en un solvente adecuado para compuestos termo-sensibles. Por otro lado, el uso del CO₂ como solvente propicia una condición anaeróbica para los compuestos altamente insaturados. Desde el punto de vista del proceso, manejar el CO₂ es seguro y no existen problemas de residuos de solvente en los productos finales (Bhimanagouda y col., 2006).

Tabla 2-1 Fluidos supercríticos comúnmente usados.

| COMPUESTO | TEMPERATURA CRÍTICA (K) | PRESIÓN CRÍTICA (BAR) |
|---------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Dióxido de carbono | 304.1 | 73.8 |
| Etano | 305.4 | 48.8 |
| Etileno | 282.4 | 50.4 |
| Propano | 369.8 | 42.5 |
| Propileno | 364.9 | 46 |
| Trifluorometano | 299.3 | 48.6 |
| Clorotrifluorometano | 302 | 38.7 |
| Amoniac | 405.5 | 113.5 |
| Agua | 647.3 | 221.2 |
| Ciclohexano | 553.5 | 40.7 |
| n-Pentano | 469.7 | 33.7 |
| Tolueno | 591.8 | 41 |

(Yu, 2004)

Cuando se considera la estructura química y orientación de los átomos en la molécula del CO_2 , posee dos átomos de oxígeno ligados a un átomo de carbono de manera perfectamente simétrica, esto lo convierte en un solvente no polar que puede ser utilizado para la extracción de solutos no polares. A fin de incrementar la polaridad del CO_2 supercrítico, regularmente se utiliza un co-solvente en cantidades pequeñas (1-5% mol). El sistema de co-solvente se encuentra en un estado supercrítico cuando la presión y la temperatura se encuentran por arriba del punto crítico de la mezcla, que usualmente no son muy diferentes a los valores para el CO_2 puro (Bhimanagouda y col., 2006).

Trabajos recientes de extracción a partir de cítricos utilizando CO_2 supercrítico han reportado la viabilidad para la extracción de limonoides y flavonoides a partir de las semillas y los subproductos de éstas (Yu, 2004).

2.3.5. Proceso de extracción supercrítica

Un proceso de extracción supercrítica consiste en dos pasos: La extracción del componente soluble en el solvente supercrítico y la separación del soluto extraído del solvente. La matriz de extracción puede ser sólida líquida o viscosa (Martínez, 2007). En la Figura 2.5 se muestra un diagrama general del proceso.

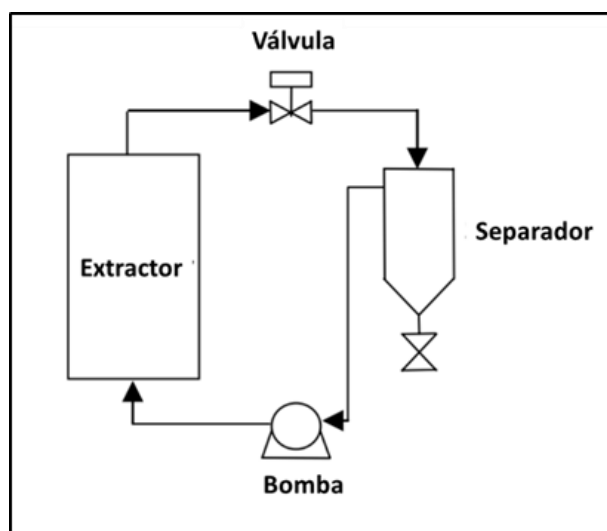


Figura 2-5 Diagrama básico para una extracción supercrítica

La forma en que opera el sistema se resume a continuación. El material a extraer se coloca dentro del extractor, después se hace pasar el fluido supercrítico dentro del recipiente de extracción mediante

una bomba de solvente. El sistema se presuriza hasta alcanzar la presión y la temperatura de extracción, aquí el solvente solubiliza los componentes afines de la matriz; en ese momento se hace fluir lentamente el solvente fuera del recipiente de extracción hacia el separador, manteniendo la presión y la temperatura en el sistema. Una vez en el recipiente de separación la caída de presión provoca que el fluido cambie de fase y se separe abruptamente de los componentes disueltos para poder ser recuperados fácilmente, y el solvente pueda ser recirculado al sistema y poderse reutilizar.

Dependiendo del objetivo de la extracción se pueden presentar dos escenarios (Martínez, 2007):

- 1) Separación del material portador. En este caso el material de alimentación es el producto final después de la remoción de compuestos indeseables.
- 2) Separación del material extraído. El compuesto extraído del material de alimentación constituye el producto final.

Algunas de las ventajas y desventajas de la extracción por solventes supercríticos en comparación con los métodos convencionales se resumen en la Tabla 2.2.

La temperatura, la presión y el tiempo de operación son factores característicos de la matriz, del solvente a utilizar y del componente a extraer. Investigaciones previas utilizando CO₂ en estado supercrítico recomiendan, para las semillas cítricas, una presión de extracción en el rango de 350 – 400 bar y una temperatura entre 40 – 60 °C, con un tiempo de extracción de aproximadamente 2 h (Martínez, 2007; Ueno y col., 2008; Yu y col., 2007).

A nivel industrial, la extracción con fluidos supercríticos ha sido empleada en el desarrollo y comercialización de una gran variedad de procesos dentro del ramo alimenticio, ambiental, extracción de productos naturales y la industria farmacéutica, por mencionar algunas (Herrero y col., 2010).

Tabla 2-2 Ventajas y Desventajas de la Extracción Supercrítica.

| Ventajas | Desventajas |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Debido a su baja viscosidad y alta difusividad, el fluido supercrítico puede penetrar dentro de un sólido poroso con mayor facilidad, lo que resulta en una extracción más rápida. • La disolución del FSC es controlada en función de la presión y/o temperatura. • En la extracción supercrítica se hace pasar fluido fresco a través de la muestra continuamente. • Los FSC son fácilmente recuperados del extracto mediante despresurización. • Los compuestos termolábiles pueden ser extraídos sin daño alguno debido a las bajas temperaturas empleadas. • La extracción supercrítica utiliza solventes no hostiles con el medio ambiente. • El FSC puede ser reciclado o reusado, minimizando la generación de desperdicios. | <ul style="list-style-type: none"> • Debido a la naturaleza del proceso se requieren presiones elevadas para llevar a cabo la extracción. • Alta inversión de capital para el equipo y mantenimiento. • La compresión del solvente requiere medidas elaboradas de recirculación para reducir los costos energéticos. |

(Lang y col., 2001; Luque de Castro y col., 1999; Simándi y col., 2009).

2.4. EXTRACCIÓN DE LIMONOIDES

A razón de las investigaciones acerca de las funciones bioactivas de los limonoides, la demanda por limonoides purificados se ha incrementado significativamente (Yu, 2004). Por desgracia, los limonoides aún no están disponibles de manera comercial. En la industria de los cítricos, las cáscaras, semillas y las melazas son tres de los mayores subproductos que contienen muchos compuestos con actividades biológicas favorables para la salud humana. Para la industria cítrica es práctico y económicamente benéfico brindar un valor agregado a sus subproductos, especialmente en forma de compuestos bioactivos tales como los limonoides.

En la Tabla 2.3 se resumen diferentes métodos desarrollados para la obtención de limonoides, de manera más específica la extracción de la limonina a partir de la semilla de diferentes cítricos.

La técnica tradicional de extracción de este tipo de compuestos se realiza por medio de solventes orgánicos (Chen y col., 2007). En la Tabla 2.3 se presenta esta técnica (Soxhlet) así como algunas variaciones (macerado, agitación, asistida por ultrasonido, Flash), los rendimientos obtenidos por medio de este método son similares a los reportados para las demás técnicas, pero la extracción mediante solventes orgánicos puede presentar inconvenientes tales como la degradación de componentes termolábiles, los largos tiempos de operación, la necesidad de grandes cantidades de solvente, así como no ser una técnica amigable con el medio ambiente (Chen y col., 2007; Liu y col., 2012; Jaiprakash y col. 2009; Vikram y col., 2007).

La extracción mediante solventes hidrotrópicos (Tabla 2.3) es una técnica desarrollada con vista en las crecientes preocupaciones ambientales y busca una manera de extraer los limonoides utilizando el mínimo de solventes orgánicos. Desafortunadamente requiere largos tiempos de proceso y tiene rendimientos bajos en comparación con los demás métodos (Dandekar y col., 2008).

Tabla 2-3 Estudios sobre la obtención de limonina a partir de semillas cítricas.

| Método | Sistema | Semilla | Rendimiento de limonina (mg/g semilla) |
|---|--|---|--|
| Extracción con solventes (soxhlet) (Jaiprakash y col. 2009) | Hexano (8 h) | Limón mexicano | 3.9 |
| | EtOAc (8 h) 60-70 °C | (<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle) | |
| Extracción con solventes (soxhlet) (Vikram y col., 2007) | Hexano (4 h) EtOAc (4 h) 60-70 °C | Naranja agria (<i>Citrus aurantium</i>) | 1.1 |
| | | Mandarina Cleopatra (<i>Citrus reshni</i>) | 2.1 |
| | Mandarina (<i>Citrus reticulata</i> Blanco) | 2.8 | |
| | Toronja Rio Red (<i>Citrus paradisi</i> Rio Red) | 6.2 | |
| Extracción por macerado (Liu y col., 2012) | Semilla triturada | Mandarina (<i>Citrus reticulata</i> Blanco) | 5.3 |
| | Etanol 70% 5h 50°C | | |
| Extracción con agitación (Liu y col., 2012) | Semilla triturada | Mandarina (<i>Citrus reticulata</i> Blanco) | 6.1 |
| | Agitador magnético Etanol 70% 5h 50°C | | |

| | | | |
|---|--------------------------------------|--|------|
| Extracción con ultrasonido (Liu y col., 2012) | Etanol 70% | Mandarina <i>(Citrus reticulata</i> Blanco) | 6.4 |
| | Ultrasonido a 20 KHz | | |
| | 5h 50°C | | |
| Extracción Flash (Liu y col., 2012) | Etanol 70% | Mandarina <i>(Citrus reticulata</i> Blanco) | 6.5 |
| | Cabeza cortante rotatoria a 4000 rpm | | |
| | 5min | | |
| Extracción por solventes hidrotropicos (Dandekar y col., 2008) | Recipiente agitado | Naranja agria <i>(Citrus aurantium)</i> | 0.65 |
| | Na-CuS 2 M | | |
| | 45°C | | |
| | 6h 10% carga sólida | | |
| Extracción con fluidos supercriticos (Yu y col., 2007) | 483 bar | Toronja (<i>Citrus paradisi</i> Macf.) | 6.3 |
| | 50°C | | |
| | 60 min | | |

El uso del dióxido de carbono en estado supercrítico ha demostrado ser un método efectivo para la obtención de moléculas bioactivas a partir de fuentes vegetales, por ejemplo la extracción de β -sitosterol, vitamina E y escualeno de las semillas del yuzu (*Citrus junos*) (Ueno y col., 2008), varios flavonoides tales como la naringina se lograron extraer de la cáscara de la toronja (*Citrus paradisi*) en un menor tiempo y uso de solvente que las técnicas convencionales (Giannuzzo y col., 2003). En estudios recientes se han aislado con éxito isoflavonas, carotenoides y ácidos grasos de diferentes matrices naturales (Herrero y col., 2010). La extracción con CO₂ supercrítico es un método particularmente efectivo para aislar triterpenos, entre éstos la limonina (Tabla 2.3), en un tiempo corto de proceso (2 horas en promedio) y un rendimiento equiparable al obtenido por el método clásico de

solventes, además de no utilizar solventes tóxicos, por lo que es un proceso sustentable desde el punto de vista ambiental (Chen y col., 2007; Hsu y col., 2001; Yu y col., 2007).

2.5.CROMATOGRAFÍA

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) ha sido una herramienta muy útil para la identificación de compuestos bioactivos en plantas. Usualmente se utilizan sistemas de elución binarios con un disolvente acuoso acidificado polar, como puede ser ácido acético, ácido perclórico, ácido fosfórico o ácido fórmico (disolvente A), y un disolvente orgánico menos polar como el metanol o acetonitrilo, posiblemente acidificado (disolvente B). Las columnas utilizadas son casi exclusivamente de fase reversa, C18, en un intervalo de 100- 300mm de longitud, con un diámetro interno de 4.6mm. Los análisis generalmente son de una hora máximo y con un flujo de 1.0 a 1.5mL/min (Schieber y col., 2001).

La identificación de los compuestos por la técnica de HPLC se basa en el tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna, denominado tiempo de retención y se considera una propiedad característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. El método es también una herramienta muy valiosa para la cuantificación de diferentes bioactivos (Merken y Beecher, 2000).

Actualmente existen varios métodos para el análisis de limonoides en la literatura, los cuales funcionan correctamente para la detección de limonoides agliconas y glucósidos contenidos en las frutas cítricas y en sus semillas. La mayoría de los métodos analíticos reportados están dirigidos a la separación y cuantificación de la limonina (Vikram y col., 2007), debido a su contribución a la amargura y al ser el limonoide mayoritario. Se han explorado una variedad de técnicas para determinar el contenido de limonina en diferentes variedades de cítricos, dentro de las que destacan la fluorometría, cromatografía de gases, cromatografía en capa fina, ensayos radioinmunológicos incluyendo las enzimas involucradas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ionización HPLC-electrón / espectroscopia de masas y HPLC-ionización química a presión atmosférica / espectrometría de masas (Vikram y col., 2007).

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución es un método analítico destacado para el análisis de limonoides en cítricos debido a la facilidad de operación y a su versatilidad, pudiendo utilizarse columnas tanto en fase normal como reversa (Vikram y col., 2007). El HPLC en fase normal ha sido

descrito por Rouseff y Fisher, 1980 para el análisis de limonina en zumos de cítricos. Herman y col., 1990 utilizaron HPLC de fase reversa C18 para cuantificar limonoides glucosilados; los limonoides agliconas se separaron en columna de fase reversa C18 eluyendo con metanol-acetonitrilo-agua, mientras que los limonoides glucosilados se separaron en columna de fase reversa C18 con ácido fosfórico 3 mM y acetonitrilo (Vikram y col., 2007). Recientemente, otro método de HPLC de fase normal ha sido descrito para la separación de limonoides agliconas en una fase neutra (Vikram y col., 2007).

La espectroscopía de masas acoplada con cromatografía de líquidos también se ha empleado en la determinación de limonoides cítricos. Un método de cribado para detectar limonoides glucosilados fue desarrollado por Tian y Ding, 2000, empleando Cromatografía Líquida de Alta Resolución en columna de fase reversa C18 con detector de arreglo de diodos y con espectroscopía de masas.

2.6.CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado, por lo general cuando son expuestas a un agente específico (Farlex, 2012; Miller y Keane, 2003).

Actualmente existen diferentes pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de diferentes compuestos, utilizando como modelos experimentales, cultivos primarios, órganos aislados y líneas celulares establecidas, esto como una alternativa a la experimentación animal (Huggins, 2003).

Dentro de las distintas pruebas *in vitro* se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con la estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia, proliferación y/o funciones celulares. Dentro de éstos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes o productos celulares, regulación iónica y división celular (Repetto, 2002). La citotoxicidad se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado.

Dentro de los ensayos más conocidos y ya validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y por último el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5

dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazóico (MTT) (Fentem, 1994), siendo este último el que se utilizó en este trabajo de investigación.

2.6.1. Ensayo de reducción del MTT

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo, lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables (Shayne, 1999). El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazóico), es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan. Figura 2.6. El producto de la reacción, el formazan queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas.

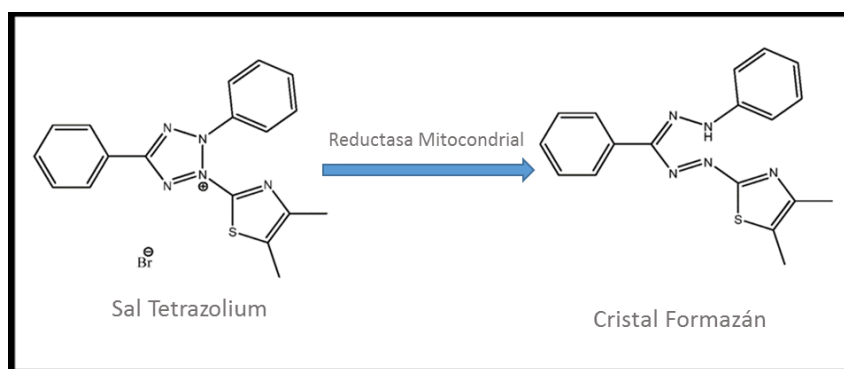


Figura 2-6 Reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazóico (MTT).

De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul (Eisenbrand y col., 2002). La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT a formazan después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa (Jiménez y col. 2007).

Las células deben ser conservadas en condiciones de esterilidad en N₂ líquido (- 190 °C). El período de exposición a la sustancia de ensayo varía, pudiendo ser durante períodos cortos (1-2 h de tratamiento), o largos de 24 ó 72 h. La demanda de oxígeno debe medirse al concluir el tiempo de incubación 550 nm utilizando un filtro de 620 nm como referencia (Pareja y col., 2007). Por lo general

se deben realizar al menos 3 réplicas de cada concentración que se evalúa. Se deben evaluar hasta 6 concentraciones del compuesto, alcanzando una concentración de 1000 µg/mL o hasta el límite máximo de solubilidad del producto en el medio.

Es necesario tener en cuenta que si el producto que se evalúa se precipita en el medio de cultivo, estos resultados deben ser descartados. Debe utilizarse en el ensayo un control de medio, un control de solvente y es recomendable un control positivo. Los resultados se expresarán como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación: $\% = \frac{\text{D.O. de las células tratadas}}{\text{D.O. de las células controles}} \times 100$. La curva dosis respuesta debe ser calculada teniendo en cuenta el rango de concentración utilizado y el porcentaje de reducción del crecimiento celular correspondiente. A partir de ello se calcula la concentración que produce la reducción de la viabilidad celular en un 50 %.

Si las células utilizadas en esta prueba son células cancerosas, entonces se puede utilizar de manera confiable y los compuestos que resulten tóxicos para estas células podrían ser considerados anticancerígenos.

2.7.CONCLUSIONES

Con base en los fundamentos de las metodologías analizadas podemos establecer que los limonoides contenidos en semillas de cítricos, al ser principalmente de naturaleza no polar, podrían ser obtenidos mediante extracción tipo soxhlet con acetona, metanol, y mediante dióxido de carbono en estado supercrítico. Aunado a esto una vez obtenidos dichos extractos podrían ser analizados mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con la finalidad de identificar y cuantificar a los limonoides de una manera adecuada, finalmente para validar la actividad biológica de los extractos, el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico resultará efectivo utilizando cultivos celulares de L5178Y.

Para cada técnica a utilizar dentro de esta investigación, fue necesario establecer los factores a controlar, siendo entonces los factores: tiempo de extracción (5 y 8 horas) y el tipo de solvente (metanol y acetona) los seleccionados para realizar la extracción soxhlet. Mientras que para la extracción con dióxido de carbono fueron la presión (38.5 y 48.5 MPa) y la temperatura (323 y 333 K). Finalmente para el análisis de los extractos y la evaluación de la citotoxicidad las metodologías que se utilizaron ya estaban establecidas en estudios anteriores.

BIBLIOGRAFÍA

- Bagge, D. (2003). Limonoids: Pesticide to anticancer applications from secondary metabolites of the Rutaceae and Meliaceae. Colorado, USA. Colorado State University Fort Collins, Colorado.
- Bhimanagouda Patil, S., Brodbelt Jennifer, S., Miller Edward, G., y Turner Nancy, D. (2006). "Potential Health Benefits of Citrus: An Overview Potential Health Benefits of Citrus" Vol. 936, pp. 1-16: American Chemical Society.
- Breska A.P., Ibarra ,(2007), "Colorimetric method for the estimation of total limonoid aglycones and glucoside contents in Citrus juices" J. Agric. Food Chem., Vol. 13, pp. 5013–5017
- Chen, Y., Xie, M.-Y., y Gong, X.-F. (2007). "Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*". J. of Food Engineering, Vol. 81(1), 162-170.
- Coenen, H., Hagen, R., y Knuth, M. (1983). U. S. Patent.
- Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; Alves, A. P. N. N.; Madeira, S. V. F.; Pessoa, C.; Moraes, M. E. A.; Moraes, M. O. A. (2010), "Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs Studies in the National Experimental Oncology at the Federal University of Ceará Laboratory". Revista Virtual de Química, Vol. 2, n. 1, p. 47-58,.
- Dandekar, D. V., Jayaprakasha, G. K., y Patil, B. S. (2008). "Hydrotropic extraction of bioactive limonin from sour orange (*Citrus aurantium* L.) seeds". Food Chemistry, Vol. 109 (3), 515-520.
- Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer B.J, Boobis A., (2002) "Methods of in vitro toxicology". Food Chem Toxicol; Vol. 40(2):193-236.
- Farlex Partner Medical Dictionary. (2012). Retrieved July 8 2015 from <http://medicaldictionary.thefreedictionary.com/cytotoxicity>
- Fentem J.H., (1994), "The use of human tissues in in vitro toxicology, Summary of general discussions". Human Experimental Toxicology; Vol. 13 (2):445-449.
- Geankoplis, C.J. (1998). "Procesos de transporte y operaciones unitarias", 3ª ed., editorial CECSA.
- Giannuzzo, A. N., Boggetti, H. J., Nazareno, M. A., y Mishima, H. T. (2003). "Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of *Citrus paradisi*". Phytochemical Analysis, Vol. 14(4), 221-223.
- Guthri, N.; Morley, K.; Hasegawa, S.; Manner Gary, D.; Vandenberg, T., (2000) "Inhibition of Human Breast Cancer Cells by Citrus Limonoids". In Citrus Limonoids; American Chemical Society: Washington DC, pp 164-174.
- Hannay, J. B., & Hogarth, J. (1879). "On the solubility of solids in gases". Proceedings of the royal society of London, Vol.30 (200-205), 178-188.
- Harvey, A. L. (2008) "Natural products in drug discovery". Drug Discov Today, Vol. 13, n.19-20, p. 894-901.

- Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., y Ibáñez, E. (2010). "Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications". *J. of Chromatography A*, 1217(16), 2495-2511. doi: 10.1016/j.chroma.2009.12.019
- Hsu, R. C., Lin, B. H., y Chen, C. W. (2001). The Study of Supercritical Carbon Dioxide Extraction for *Ganoderma Lucidum*†. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Vol. 40(20), 4478-4481.
- Huggins J. (2003) "Alternatives to animal testing: research, trends, validation, and regulatory acceptance". *Alternatives to Animal Experimentation*; Vol. 20:3-61.
- Jaiprakash P., G. Jayaprakasha, M. Chidambara, B. Mahadev and P. Bhimanagouda, (2010) "Characterization of *Citrus aurantifolia* bioactive compounds and their inhibition of human pancreatic cancer cells through apoptosis". *J. Microchemical* Vol. 94, pp.108–117.
- Jaiprakash P., M. Chidambara, G. Jayaprakasha, C. Mahadev and P. Bhimanagouda, (2009), "Bioactive compounds from Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) juice induce apoptosis in human pancreatic cells", *J. of Agriculture and Food Chemistry* Vol. 57, 10933–10942.
- Jayaprakasha, G. K.; Mandadi, K. K.; Poulose, S. M.; Jadegoud, Y. Nagana Gowda, G. A.; Patil, B. S., (2008), "Novel triterpenoid from *Citrus aurantium* L. possesses chemopreventive properties against human colon cancer cells". *Bioorg. Med. Chem.*, Vol. 16 (11), 5939–5951.
- Jiménez N, González M, Fernández C, López J., (2007) "Estudio de la biocompatibilidad in vitro de polímeros metacrílicos derivados de pirrolidona". *J. Biomecánica*; Vol. 15 (1):63-71.
-
- Kotamballi N., M. Chidambara, G. Jayaprakasha, K. Vinod, R. Keerti, P. Bhimanagouda, (2011) "Citrus limonin and its glucoside inhibit colon adenocarcinoma cell proliferation through apoptosis", *J. of Agriculture and Food Chemistry* Vol.59, 2314–2323.
- Krukoniš Val, J. (1988). "Processing with Supercritical Fluids Supercritical Fluid Extraction and Chromatography", Vol. 366, pp. 26-43: American Chemical Society.
- Lang, Q., y Wai, C. M. (2001). "Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies a practical review". *Talanta*, Vol. 53 (4), 771-782.
- Laws, D. R. J., Bath, N. A., Ennis, C. S., y Wheldon, A. G. (1980). U. S. Patent.
- Liu, J., Liu, C., Rong, Y., y Rong, L. (2012). "Extraction of Mogroside and Limonin with Different Extraction Methods and its Modeling". *International J. of Food Engineering*, 8(2).
- Luque de Castro, M. D., & Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 369, 1–10.
- Luque de Castro, M. D., y Valcárcel, M. (1993). *Extracción con Fluidos Supercríticos en el Proceso Analítico*: Reverté.

- Luque de Castro, M., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J. of Chromatography A*, Vol. 1217(16), 2383-2389.
- Mamidipally, P. K., & Liu, S. X. (2004). "First approach on rice bran oil extraction using limonene". *European J. of Lipid Science and Technology*, Vol. 106, 122–125.
- Manners, G. D. (2007) "Citrus limonoids: analysis, bioactivity, and biomedical prospects". *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 55, 8285–8294.
- Manners, G. D. (2007) "Citrus limonoids: analysis, bioactivity, and biomedical prospects". *J. of Agricultural and Food Chemistry.*, 55, 8285–8294.
- Martínez, J. L. (2007). *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*: CRC Press.
- Merken, H.M., Beecher, G.R., (2000). "Measurement of Food Flavonoids by HighPerformance Liquid Chromatography: A Review". *J. of Agricultural Food Chemistry*. 48: 578-599.
- Miller-Keane (2003). "Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health" Seventh Edition. <http://medicaldictionary.thefreedictionary.com/cytotoxicity>, Página visitada en Julio 2015.
- Pareja A, García C, Abad P.J, Márquez M.E. (2007) "Estudio in vitro de la citotoxicidad y genotoxicidad de los productos liberados del acero inoxidable 316L con recubrimientos cerámicos bioactivos". *IATREIA*; Vol. 20 (1):12-20.
- Poulouse, S. M.; Harris, E. D.; Patil, B. S. (2006) "Antiproliferative Effects of Citrus Limonoids Against Human Neuroblastoma and Colonic Adenocarcinoma Cells". *Nutr. Cancer*, Vol. 56 (1), 103–112
- R.L. Rouseff, J.F. Fisher, *Anal. Chem.* Vol. 52 (1980) 1224.
- Repetto, M. (2002). "Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro". Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición; p.303-305.
- Rouseff, R. L., Ruiz Perez-Cacho, P., & Jabalpurwala, F. (2009). "Historical review of citrus flavor research during the past 100 years". *J. of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 57(18), 8115-8124.
- Rozzi, N. L., Singh, R. K., Vierling, R. A., y Watkins, B. A. (2002). "Supercritical Fluid Extraction of Lycopene from Tomato Processing Byproducts". *J. of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50 (9), 2638-2643.
- Schieber, A., Keller, P., and Carle, R. (2001). "Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by HPLC". *J. of Chromatography A*, Vol. 910: 265-273.
- Shayne G.C. (1999). "Alternatives to in vivo studies in toxicology". In: Balantyne B, Marrs T, Syversen T. *General and applied toxicology*, Vol 1. USA: Grove's dictionaries Inc;. P.178-182.
- Simándi, B., y Sawinsky, J. (2009). *Supercritical fluid extraction: Introduction of the physico-chemical properties of the supercritical fluids*. Consultado 20 de agosto, 2012, de <http://sfe.vemt.bme.hu/angol/supercritical.html>

- Tian Q., X. Ding, J. (2000) *Chromatogr A* Vol. 874 pag.13.
- Ueno, H., Tanaka, M., Machmudah, S., Sasaki, M., y Goto, M. (2008). "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Valuable Compounds from Citrus junos Seed". *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 1(4), 357-363.
- Vieira, P. M.; Paula, J. R.; Chen-Chen, L. (2010), "Solanum paniculatum L. Leaf and Fruit Extracts: assessment of modulation of cytotoxicity and genotoxicity by micronucleus test in mice". *J. of Medicinal Food*, Vol. 13, n. 6, p. 1-7,.
- Vikram, A., Jayaprakasha, G. K., y Patil, B. S. (2007). "Simultaneous determination of citrus limonoid aglycones and glucosides by high performance liquid chromatography". *Analytica Chimica Acta*, Vol. 590 (2), 180-186.
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants". *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 17 (6), 300-312.
- Yu, J. (2004). "Citrus Limonoids And Flavonoids: Extraction, Antioxidant Activity And Effects On Hamster Plasma Cholesterol". Doctor Of Philosophy, Texas A&M University
- Yu, J., Dandekar, D. V., Toledo, R. T., Singh, R. K., y Patil, B. S. (2007). "Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds". *Food Chemistry*, 105(3), 1026-1031.
- Zarnowski, R., & Suzuki, Y. (2004). "Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains". *J. of Food composition and Analysis*, Vol. 17(5), 649-663.

CAPÍTULO TRES

CITOTOXICIDAD DE LIMONOIDES EXTRAÍDOS MEDIANTE SOLVENTES A PARTIR DE SEMILLAS DE CÍTRICOS.

3.1.INTRODUCCIÓN

En México se producen alrededor de siete millones cuatrocientos setenta mil toneladas de cítricos anualmente, siendo naranja y limón los cultivos con mayor producción, de la producción total (SIAAP, 2015), de los cuales se transforman alrededor del 25- 30 % (Russo y col. 2014, USFDA 2009, Bocco y col., 1998), lo que corresponde a dos millones doscientos cuarenta y un mil toneladas de cítricos anualmente; considerando que el 50% de los frutos procesados corresponden a cáscaras y semillas (Fernandez y col. 2004), se puede estimar que se generan aproximadamente un millón ciento veinte mil toneladas de subproductos al año, lo que se convierte en un problema grave de contaminación y de manejo de estos subproductos, debido a que son susceptibles a sufrir deterioro microbiano y rara vez son aprovechados.

Los usos que actualmente se les da, no explotan su potencial nutracéutico y solo son utilizados como alimento para ganado, compostas, en algunos casos para obtención de pectinas, D-limoneno, ácido cítrico, ascórbico además de aceites esenciales, (Benelli y col., 2010; Marin y col., 2007; Fernandez y col., 2004; Braddock, 1999), compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos entre otros, los cuales han mostrado diversas actividades biológicas principalmente antioxidantes y microbicidas que resultan de interés en distintas industrias (Manthey y col., 1996; Manthey y col., 2001; Stange y col., 2002; Cowan, 1999; Bocco y col., 1998; Benavente y col., 1997; Russo y col., 2014; Bhimanagouda y col., 2009).

Dentro de las semillas de cítricos se ha reportado el contenido de bioactivos muy interesantes, como son los limonoides, estos se encuentran distribuidos en los tejidos conectivos del árbol, pero conforme el árbol crece y madura, los limonoides se distribuyen en las diferentes partes tanto del árbol como en el fruto (Bhimanagouda y col., 2009; Russo y col., 2014; Berhow y col., 2000; Vikram y col., 2010; Manners y col., 2003) y dentro de la distribución de los limonoides en el fruto, la mayor cantidad se presentan en las semillas, siendo menor en cascarilla de semillas, después en el albedo, flavedo y por último en mucho menor concentración en las vesículas del jugo.

Actualmente y mediante técnicas de rayos X, resonancia magnética nuclear, HPLC, entre otras, se tienen identificados más de 39 limonoides en estado aglicona y 17 limonoides glucosilados en las diferentes especies de cítricos (Manners y col., 2004; Jayaprakasha y col., 2008; Bhimanagouda y col., 2009; Bresca y col., 2008).

Los limonoides se pueden encontrar tanto en su estado glicosilado o en estado aglicona, como se mencionó en el Capítulo 1, los limonoides glicosilados, se pueden comportar como ingredientes nutracéuticos porque no resultan amargos, comparados con su estado aglicona, y una vez que se hidrolizan exhiben su efecto bioactivo y potencian bioactividades interesantes en el sector agroindustrial, lo que resulta atractivo dado a que se puede disminuir la degradación de la actividad biológica por la presencia de la molécula del glucósido; pero el tener este glucosido impide el que se pueda controlar la dosificación de los mismos, ya que sus efectos dependerían de la eficiencia de su hidrolisis, lo que ha dado como resultado un sin número de trabajos de investigación, en función a utilizar limonoides aglicona o glucosilados (Jinhee y col., 2011; Manners y col., 2007; Jayaprakasha y col., 2008; Bhimanagouda y col., 2009; Bayazit y col., 2010; Ruberto y col., 2002).

Para la extracción de limonoides, existe una ambigüedad sobre los tiempos y solventes a utilizar en la extracción, ya que según Vikram y col., 2007, el acetato de etilo con un tiempo de extracción en Soxhlet por 4 horas es recomendado, aunque en el 2010, el mismo Vikram y col. 2010, utilizan 8 horas de extracción, otros autores como Poulou y col. 2007, consideran que la extracción es mejor con metanol y un tiempo de extracción de 24 horas, Schoch y col., 2001, recomiendan también utilizar metanol pero con un tiempo de 12 horas, finalmente Hasegawa y col., 2000, sugieren que la extracción de limonoides se puede realizar con diferentes solventes que van desde diclorometano, metanol o acetona, siendo esta última y con un tiempo de extracción de 6 horas, la que recomienda para obtener el mayor rendimiento de limonoides.

Actualmente los limonoides han despertado el interés debido a la diversidad de propiedades biológicas que presentan, especialmente actividad anticancerígena. La limonina y nomilina presentaron un efecto inhibidor de neoplasia en estómago de ratones (Tian y col., 2001), además de que existen evidencias de inhibición de cáncer de colon, ovario y de neuroblastomas en cultivos de células cancerígenas *in vitro* (Kotamballi y col., 2011; Manners, 2007), también se ha reportado la inhibición del crecimiento de células cancerígenas de mama, afectándose el receptor positivo-negativo de estrógenos con limonoides (Guthrie y col., 2000). Algunos limonoides han incluso presentado actividad antitumoral, sobre tumores en boca de hamsters (Miller y col., 2000). Otros estudios reportan que la limonina y nomilina presentan un efecto antiviral contra el virus de VIH-1 (Battinelli y col., 2003), si aunado a estas actividades biológicas agregamos que en diferentes estudios *in vivo* se ha encontrado que los limonoides no resultan tóxicos (Jinhee y col., 2011; Manners y col., 2007) entonces se pueden considerar a las semillas cítricas como un fuente importante de bioactivos con un beneficio potencial a la salud.

Por lo que en este capítulo se presenta una metodología confiable para la obtención de limonoides a partir de semillas de *Citrus sinensis* (naranja), de *Citrus aurantifolia swingle* (limón mexicano) y *Citrus reticulata* (mandarina) mediante solventes, en donde se compararon dos tiempos de extracción, además de los dos tipos de solventes más utilizados en la extracción de limonoides, con la finalidad de obtener extractos de limonoides con actividad citotóxica *in vitro* contra linfoblastos L5178Y, validando así el proceso de extracción de limonoides a partir de un subproducto generado del procesamiento de cítricos.

3.2.MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Materia Prima

Se emplearon semillas de tres cítricos diferentes, semillas de *Citrus reticulata* (Mandarina), semillas de *Citrus sinensis* (Naranja) y semillas de *Citrus aurantifolia swingle* (Limón mexicano), figura 3.1, estas semillas son consideradas subproductos del proceso para la obtención de jugos cítricos. Las semillas de *C. reticulata* y *C. sinensis* se colectaron como desechos de procesadoras locales, mientras que las semillas de *C. aurantifolia swingle* correspondían a la cosecha del 2011 del municipio de Tecomán, Colima, las cuales fueron proporcionadas por la empresa Frutech Co. en bolsas de papel de 10 Kg, estas semillas estaban deshidratadas y molidas. Por lo que a las semillas de *C. reticulata* y *C. sinensis* fue necesario acondicionarlas, deshidratándolas a la sombra y moliéndolas con ayuda de un molino de cuchillas marca IKA modelo MF 10 Basic, a una velocidad de operación de 5000 RPM previo al proceso de extracción.

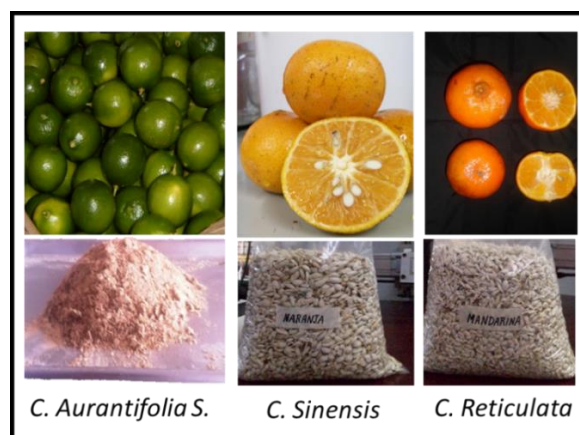


Figura 3-1 Semillas deshidratadas de *Citrus reticulata* (Mandarina), semillas de *Citrus sinensis* (Naranja) y semillas de *Citrus aurantifolia swingle* (Limón mexicano)

3.2.2. Caracterización de Semillas

A las semillas deshidratadas y molidas se les analizó su contenido de humedad, el contenido de extracto etéreo, el contenido de proteína y el contenido de carbohidratos, siguiendo las normas

NMX-F-083-1986, NMX-F-615-NORMEX-2004, NMX-F-608-NORMEX-2011 y NMX-F-607-NORMEX respectivamente.

3.2.3. Extracción con solventes

La extracción de limonoides se inicia con la remoción del aceite vegetal mediante lixiviación con hexano en un arreglo tipo soxhlet, una vez removido el aceite se realiza una segunda lixiviación con diferentes solventes. Este proceso resulta sencillo pero difiere en los tiempos de remoción de aceite y también en el tipo de solvente para la segunda lixiviación.

Las semillas molidas de cada cítrico, *C. reticulata*, *C. sinensis* y *C. aurantifolia* Swingle, fueron tamizadas utilizando solo las que pasaban el tamaño de malla 30; iniciando el proceso con la remoción del aceite de cada semilla mediante extracción soxhlet y utilizando hexano (Karal®) en una relación 1:10 durante 6 horas como se observa en la figura 3.2.



Figura 3-2 Remoción de aceite vegetal de semillas mediante hexano en extracción soxhlet

Enseguida, diecisiete gramos de cada semilla ya desgrasadas, se sometieron nuevamente a extracción soxhlet, evaluando ahora dos tipos de solventes (Metanol y Acetona) en relación 1:10 y evaluando dos tiempos de extracción (5 y 8 horas) como se observa en la figura 3.3. Una vez obtenidos los extractos de limonoides, éstos se filtraron a través de un papel filtro Whatman no.1 y se evaporaron en un rotavapor (B-490 Buchi) hasta sequedad (Kotomballi y col., 2011; Cowan, 1999; Vikram y col.;

2007; Battinelli y col., 2003; Manners, 2007; Ruberto y col., 2002; Balestrieri y col., 2011). Los experimentos se realizaron por triplicado y se realizó un diseño experimental del tipo multifactorial multinivel, donde los factores fueron: tipo de semilla en tres niveles (*C. sinensis*, *C. reticulata* y *C. aurantifolia swingle*), el tipo de solvente en dos niveles (Metanol y Acetona) y el tercer factor fue el tiempo de extracción en dos niveles (5 y 8 horas), mientras que las variables de respuesta fueron el rendimiento de extracto de limonoides y actividad citotóxica de los extractos de limonoides, finalmente el análisis estadístico de los datos se hizo con el software estadístico Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., USA).



Figura 3-3 Obtención de extractos de limonoides mediante extracción soxhlet

3.2.4. Evaluación de citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad de los extractos se realizó en cultivos celulares de linfoma L5178Y, iniciando con la extracción de las células L5178Y por punción en el peritoneo del ratón, extrayendo 1 mL del mismo, figura 3.4 , colocándose enseguida en un tubo de vidrio 13 x 100. Después, el extracto celular de L5178Y se lavó con 3 mL de una solución salina isotónica y se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm, recuperando así el botón celular L5178Y para enseguida resuspenderlo en 3 mL de medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI).

Se tomó una muestra de 20 microlitros y se agregaron 20 microlitros de Poldinisazobi-1-aminonaftoldisulfonato de sodio (azul tripano) y se realizó el conteo celular en la cámara de Neubauer en un número total de 5 cuadrantes x 2 x 5 x 10,000 lo que es igual al número total de células L5178Y

/mL para enseguida contar el total de células L5178Y y realizar el ajuste matemático para obtener la cantidad deseada de células (5×10^4).



Figura 3-4 Extracción de las células L5178Y por punción en el peritoneo del ratón

La evaluación de la citotoxicidad de los extractos se realizó en cultivos celulares de linfoma L5178Y puestos en cajas de 96 pozos (costar 3595) a los cuales se aplicaron diferentes concentraciones (120 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$) de los extractos de semillas de *C. sinensis*, *C. reticulata* y *C. aurantifolia swingle*, mientras que la cantidad de células fue de 5×10^4 células, el volumen final de cada pozo fue de 200 μL en medio de cultivo RPMI 1640 Gibco, con el pH ajustado a 7 y adicionado con 10 % de suero bovino fetal (Gibco) previamente inactivado, el medio de cultivo también estaba adicionado con el antibiótico penicilina 5,000 U. I./mL y estreptomycinina 5,000 $\mu\text{g/mL}$ (Gibco), dosificando 10 mL por cada 500 mL de medio RPMI (Jinhee y col., 2012).

Se utilizó ciclofosfamida (CY-Sigma) (160 mg/mL) como control positivo de citotoxicidad y además se trabajó un control negativo en donde no se aplicó extracto alguno. Enseguida los cultivos de células fueron incubados por 24 h a 37 °C en atmosfera de CO₂ al 5% y humedad relativa del 95 %. Al final del periodo de incubación se determinó la citotoxicidad evaluando la viabilidad celular mediante la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa y midiendo un compuesto coloreado de color azul (formazan), generado por la funcionalidad mitocondrial de las células. La intensidad del formazan se midió a una absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas modelo 680 marca BioRad. Estas evaluaciones citotóxicas se realizaron por triplicado para cada semilla y concentración de extracto (Jaiprakash y col., 2009; Jaiprakash y col., 2010).

3.3.RESULTADOS

El análisis proximal realizado a las semillas de cítricos se hizo por duplicado, y los resultados se reportan como un promedio (TABLA 3.1) en donde se aprecia que el contenido de proteína en las semillas va desde un 12.45 % para *C. sinensis* hasta un 17.78 % para *C. aurantifolia swingle*, siendo mayor al 3.90-9.56% reportado por Anwar y col., 2008 y menor al 21.27% reportado por Arriola y col. 2006, sobresaliendo el contenido de proteína de *C. aurantifolia swingle*, por otra parte el contenido graso va desde un 21.95% hasta un 34.4%, valores similares a lo reportado en estudios anteriores (27-39%) , el contenido de carbohidratos va desde un 39.3% para *Citrus aurantifolia swingle* hasta un 57.22% para *Citrus sinensis*.

Tabla 3-1 Análisis Bromatológico de Semillas de Cítricos

| DETERMINACIÓN | C. SINENSIS | C. RETICULATA | C. AURANTIFOLIA |
|----------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| <i>Humedad</i> | 5.47 | 6.25 | 8.11 |
| <i>Proteína</i> | 12.45 | 11.78 | 15.78 |
| <i>Cenizas</i> | 2.91 | 2.95 | 2.41 |
| <i>Fibra cruda</i> | 38.24 | 39.46 | 31.3 |
| <i>Grasas</i> | 21.95 | 24.5 | 32.4 |
| <i>Carbohidratos</i> | 57.22 | 54.52 | 41.3 |

3.3.1. Extracción con solventes

La evaluación del tipo de solvente y del tiempo de extracción de las diferentes semillas de cítricos permitió encontrar que el contenido de limonoides depende del tipo de solvente utilizado y del tipo de semilla, más no así del tiempo de extracción, esto se puede observar en la tabla 3.2 de análisis de varianza, lo que puede establecerse como un aporte significativo al proceso de obtención de limonoides, debido a que la mayoría de los estudios reportan tiempos mayores a las 5 horas, Poulouse y col., 2007 sugiere un tiempo de 24 horas de extracción, Schoch y col., 2001 recomienda un tiempo de 12 horas, finalmente Hasegawa y col. 2000 recomiendan un tiempo de 6 h, solo Vikram y col., 2007 reportan un tiempo de extracción menor, recomendando 4 horas de extracción.

Tabla 3-2 Análisis de Varianza del Rendimiento de Extracto de Limonoides.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Solvente | 51.4358 | 1 | 51.4358 | 14.57 | 0.0008 |
| B:Tiempo | 1.97626 | 1 | 1.97626 | 0.56 | 0.4616 |
| C:Semilla | 236.438 | 2 | 118.219 | 33.49 | 0.0000 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 9.33991 | 1 | 9.33991 | 2.65 | 0.1169 |
| AC | 47.4055 | 2 | 23.7028 | 6.71 | 0.0048 |
| BC | 1.83763 | 2 | 0.918813 | 0.26 | 0.7730 |
| ABC | 2.05093 | 2 | 1.02546 | 0.29 | 0.7505 |
| RESIDUOS | 84.7241 | 24 | 3.53017 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 435.208 | 35 | | | |

Además, la interacción entre el tipo de solvente y la semilla del cítrico resultó significativa respecto al rendimiento del extracto de limonoides de *C. sinensis*, no así para *C. aurantifolia swingle* y *C. reticulata* en donde el rendimiento de extracto no se afectó significativamente por el tipo de solvente utilizado como se aprecia en la figura 3.5, en donde se refleja un rendimiento mayor de limonoides en los extractos obtenidos con metanol que los obtenidos con acetona, esto difiere con Jaiprakash y col 2010, quienes reportan un 74% más de rendimiento en los extractos de limonoides utilizando metanol (2.48%), comparados con los obtenidos con acetona (0.64%) y un 80% más que los obtenidos con acetato de etilo para *C. aurantifolia swingle*, Pero coinciden con Jinhee y col. 2012 quienes también reportan un rendimiento dependiente del tipo de solvente y obteniendo un mayor rendimiento de extracto con metanol (9.23%) que con acetona (0.68%), incluso que con acetato de etilo (3.27%) esto obtenido de semillas de limón, solo que no se reporta el nombre científico, lo que impide contrastar los resultados con los obtenidos en este trabajo y los obtenidos por Jaiprakash y col., 2010, Vikram y col., 2007 reportan rendimientos del orden del 3.5% pero obtenidos con acetato de etilo para *C. reticulata Blanco* y *C. paradissi* aunque el tiempo de extracción fue menor con 4 horas de extracción. Estas variaciones se deben a las diferentes polaridades de los solventes y que sumado a la diferencias en la composición de limonoides aglicona (limonina, nomilina y obacunona) contenidos en las semillas, se ve reflejado en el rendimiento de extracto de limonoides.

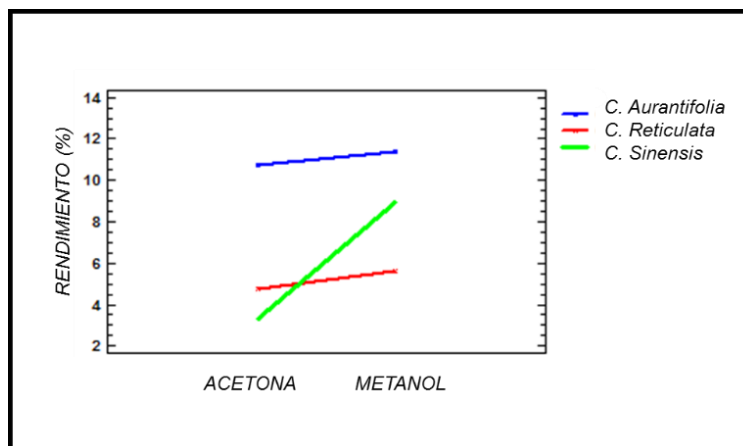


Figura 3-5 Rendimiento de extracto de limonoides en función del tipo de solvente utilizado para cada cítrico.

La semilla con mayor rendimiento en extracto de limonoides fue la semilla *C. aurantifolia swingle*, en particular la extraída con metanol con un rendimiento de $11.43\% \pm 0.37$, seguido por el rendimiento obtenido con acetona del mismo *C. aurantifolia swingle*, el rendimiento más bajo lo mostró *C. sinensis* con un $3.32\% \pm 1.4$, también obtenido con acetona, lo que se aprecia en la tabla 3.3.

Los rendimientos de extracto son dependientes del tipo de semilla y la variación que existe es evidente, ya que se observan rendimientos bajos similares a los reportados por Jaiprakash y col., 2010 con un 0.44% para extractos obtenidos con acetato de etilo a partir de *C. aurantifolia swingle*, y a los rendimientos de 0.68% reportados por Jinhee y col., 2012 obtenidos con acetona a partir de semilla de limón, rendimientos de 3.5% obtenidos con acetato de etilo a partir de *C. reticulata Blanco* y *C. paradissi* son reportados por Vikram y col., 2007, incluso hasta rendimientos del 25% de extracto obtenidos con metanol a partir de semillas de *C. reticulata* por Balestrieri y col., 2011.

Todos estos rendimientos se obtienen con procesos que difieren en tiempo de extracción, sin embargo, en este trabajo el tiempo de extracción no resultó significativo para maximizar el rendimiento de extracto de limonoides, ya que no existe una diferencia importante entre las 5 y 8 horas de procesamiento como se aprecia en la figura 3.6, lo que permite reducir las diferencias entre rendimientos debido a esta factor, siendo afectado el rendimiento de extracto de limonoides solo por el solvente y tipo de semilla. Además, también se puede establecer un tiempo máximo de 5 horas de extracción, reduciendo hasta en un 80 % el tiempo recomendado por Poulosse y col., 2007, en un 70% el recomendado por Jinhee y col., 2012 y en un 60 % el recomendado por Schoch y col., 2001.

Esta reducción en tiempo dependerá de la actividad biológica, y se validará si el tiempo de extracción tampoco afecta la actividad citotóxica de los extractos sobre L5178Y.

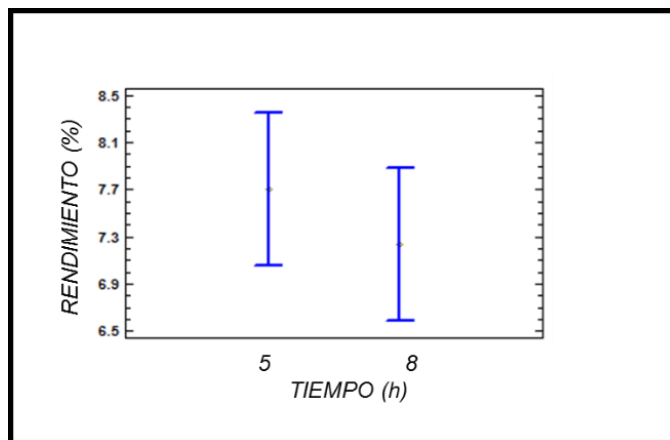


Figura 3-6 Efecto del tiempo de extracción sobre el rendimiento de extracto de limonoides.

El efecto particular del tipo de semilla de cítrico sobre el rendimiento de extracto de limonoides de cada fruto se puede apreciar en la figura 3.7 donde se observan dos grupos homogéneos, uno formado por *C. sinensis* y *C. reticulata* y el otro por el *C. aurantifolia swingle*, estas relaciones son independientemente del tipo de solvente utilizado y del tiempo de extracción, evidenciando que el cítrico con mayor contenido de limonoides es *C. aurantifolia swingle*, además estos grupos sugieren una diferenciación entre los cítricos dulces y las limas, lo que concuerda con lo reportado por varios estudios en donde se reportan mayores rendimientos en semillas de *C. aurantium* que de cítricos como *C. reticulata* Blanco, *C. paradissi*, *C. tangerina*, *C. sinensis*, entre otros (Jinhee y col., 2012; Poulouse y col., 2007; Jaiprakash y col., 2010; Bhimanagouda y col., 2009; Vikram y col., 2007; Manners, 2007; Rosuseff y Nagy, 1982; Hasegawa y col., 2000).

Tabla 3-3 Rendimientos de extracto de limonoides obtenidos para cada cítrico

| <i>Semilla</i> | <i>Solvente</i> | <i>Rendimiento (%)</i> | <i>std (±)</i> |
|------------------------|-----------------|------------------------|----------------|
| <i>C. sinensis</i> | Metanol | 8.95 | 1.24 |
| | Acetona | 3.32 | 1.4 |
| <i>C. aurantifolia</i> | Metanol | 11.39 | 1.3 |
| | Acetona | 10.37 | 2.21 |
| <i>C. reticulata</i> | Metanol | 5.63 | 0.787 |
| | Acetona | 4.78 | 0.73 |

Los resultados obtenidos sobre el rendimiento de extracto de limonoides solamente ayudan a conocer qué semilla de cítrico presenta mayor potencial respecto al rendimiento del extracto de limonoides, en este sentido fue necesario evaluar la actividad citotóxica de los extractos obtenidos para así complementar mediante una actividad biológica que las semillas cítricas son una alternativa para la obtención de bioactivos de interés para el ser humano.

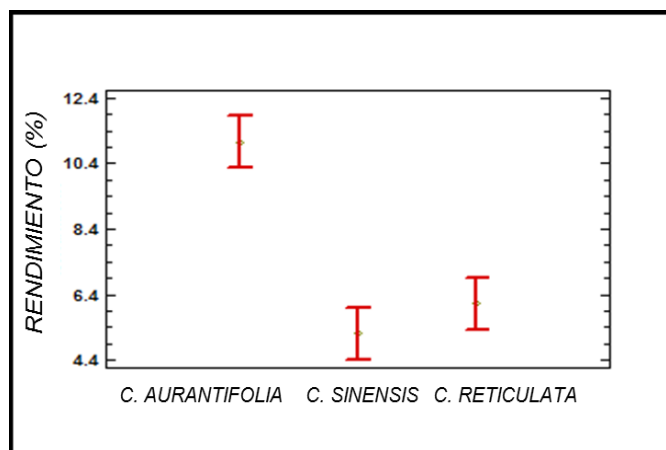


Figura 3-7 Rendimiento de extracto de limonoides en función del tipo de cítrico.

3.3.2. Citotoxicidad de extractos de semillas de cítricos

La evaluación citotóxica de los extractos obtenidos mostró que los factores tipo de solvente, tipo de semilla y tiempo de extracción tuvieron un efecto significativo sobre la viabilidad celular de linfoma L5178Y, además de que se agregó otro factor a evaluar en este diseño, que fue la

concentración del extracto, mostrando también un efecto significativo sobre la viabilidad celular, misma que se afectó por la dosis del extracto, presentando un comportamiento del tipo “dosis-respuesta”; finalmente el tiempo de extracción, contrario al rendimiento de extracto de limonoides sí fue significativo como se observa en el análisis de varianza en la tabla 3.4.

Tabla 3-4 Análisis de Varianza de la Viabilidad Celular

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|-------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Concentración | 51293.5 | 3 | 17097.8 | 56.47 | 0.0000 |
| B: Semilla | 158700. | 2 | 79349.8 | 262.08 | 0.0000 |
| C: Solvente | 12928.7 | 1 | 12928.7 | 42.70 | 0.0000 |
| D: Tiempo | 1926.39 | 1 | 1926.39 | 6.36 | 0.0132 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 47537.5 | 6 | 7922.91 | 26.17 | 0.0000 |
| AC | 5246.36 | 3 | 1748.79 | 5.78 | 0.0011 |
| AD | 1580.68 | 3 | 526.892 | 1.74 | 0.1635 |
| BC | 56031.1 | 2 | 28015.6 | 92.53 | 0.0000 |
| BD | 30942.5 | 2 | 15471.3 | 51.10 | 0.0000 |
| CD | 5681.0 | 1 | 5681.0 | 18.76 | 0.0000 |
| RESIDUOS | 30882.3 | 102 | 302.768 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 441842. | 143 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Analizando la citotoxicidad que presentan los extractos de semillas, en la figura 3.8 se observa que la mayor citotoxicidad la presentan los extractos de limonoides obtenidos de la semillas de *C. aurantifolia swingle*, seguida de los obtenidos de *C. sinensis* y finalmente los obtenidos de las semillas de *C. reticulata*; así como también se observa la citotoxicidad de la ciclofosfamida (CY-Sigma) cuando se utiliza una concentración de 160 µg/mL, validando su uso como control positivo, además del eficiente control negativo por el crecimiento de las células sin aplicarles ningún extracto o tratamiento durante el proceso.

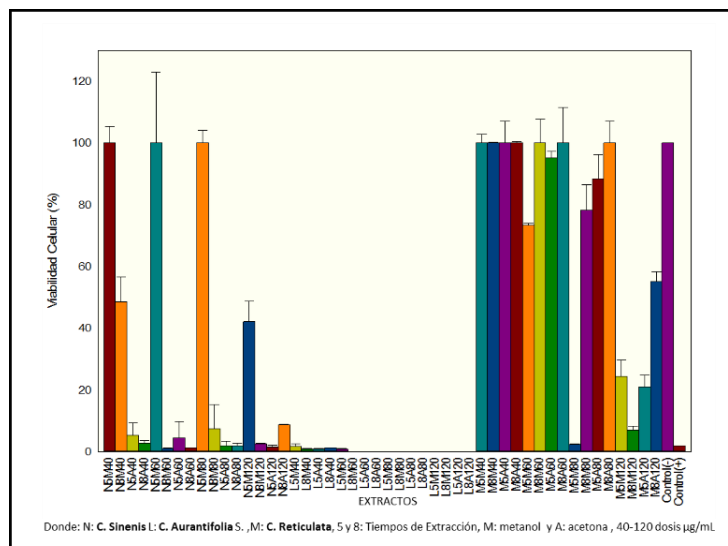


Figura 3-8 Citotoxicidad de extractos de semillas de cítricos obtenidos por diferentes extractos, solventes y tiempos de extracción

Con base en los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la citotoxicidad y haciendo el análisis de varianza, fue posible determinar cómo el tipo de solvente utilizado en la extracción de limonoides sí afecta la capacidad citotóxica del extracto obtenido, siendo los extractos de limonoides obtenidos con acetona, los que mayor citotoxicidad presentaron, como se observa en la figura 3.9, este comportamiento coincide con los resultados obtenidos por Jaiprakash y col., 2010, quien reportó un efecto citotóxico dependiente del tipo de solvente contra células cancerígenas de páncreas (Panc-28) y donde la mayor citotoxicidad la mostró el extracto obtenido con acetona a partir de semillas de *C. aurantifolia* Swingle, Jinhee y col., 2012 reportan un comportamiento similar de toxicidad dependiente de solventes, pero evaluando la inhibición de proliferación de células de cáncer de mama (MCFE-7).

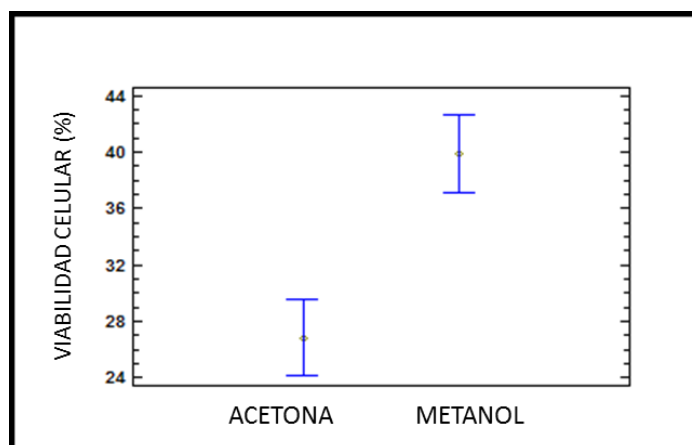


Figura 3-9 Efecto del tipo de solvente sobre la citotoxicidad de extractos de semillas de cítricos.

También al hacer el análisis de los resultados, se observó que la interacción de los factores que afectan la citotoxicidad fue importante, y se pudo observar que para aumentar la citotoxicidad, el solvente interactúa de manera particular con cada tipo de semilla, como se observa en la figura 3.10 donde se aprecia que para los extractos de semillas de *C. sinensis* la citotoxicidad es mayor si se utiliza acetona como solvente, esto puede explicarse debido a que este cítrico tiene un menor contenido de limonina y nomilina, contrario a los extractos de semillas de *C. reticulata* los cuales muestran un contenido mayor en esos limonoides y donde los extractos obtenidos con metanol presentaron una mayor citotoxicidad (Vikram y col., 2007; Rouseff y Nagy, 1982); finalmente para los extractos de las semillas de *C. aurantifolia swingle* no hubo diferencia significativa en el tipo de solvente, este comportamiento fue similar al rendimiento, y se explica por las diferencias en la composición de limonoides (limonina, nomilina y obacunona) contenidos en las semillas.

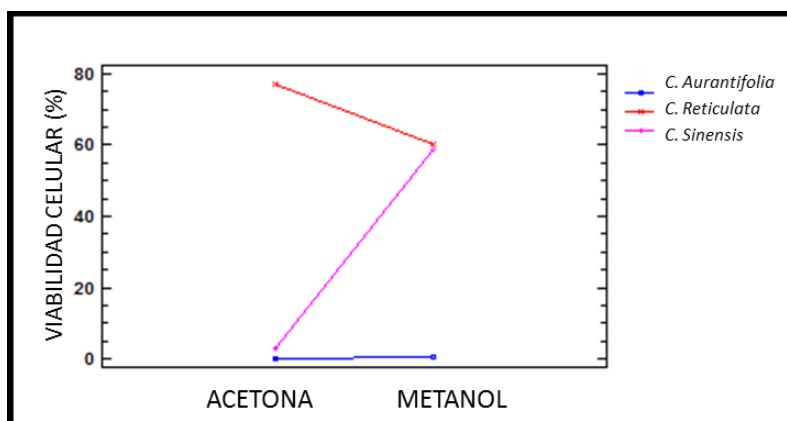


Figura 3-10 Viabilidad celular de L5178Y ante extractos de semillas obtenidos por diferentes solventes.

A diferencia del rendimiento, la citotoxicidad se afectó conforme se aumentó el tiempo de extracción, lo que sugiere que con 8 hrs de extracción se obtiene un extracto con mayor citotoxicidad como se observa en la figura 3.11, aunque esto dependerá del tipo de semilla cítrica y en donde es posible apreciar que para *C. sinensis* y *C. reticulata* el tiempo sí es relevante, mientras que no es así para *C. aurantifolia swingle*, esto se debe a la sensibilidad que presenta este cultivo celular a pequeños cambios en la concentración de este tipo de extractos, aunque cuando se analiza la interacción entre el tiempo y en particular el tipo de cítrico se puede apreciar que no es significativo para *C. aurantifolia swingle*, figura 3.12.

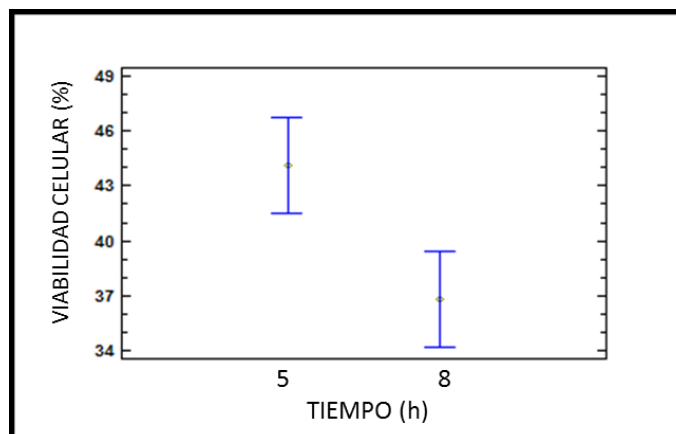


Figura 3-11 Efecto del tiempo de extracción de limonoides sobre la Viabilidad celular de L5178Y.

Al analizar el comportamiento por tipo de cítrico se observó que la interacción entre el tiempo de extracción y el tipo de semilla muestra un comportamiento contrario entre *C. sinensis* y *C. reticulata*, recomendando un tiempo de extracción de 8 horas para una mayor citotoxicidad en la semilla de *C. sinensis* y un tiempo de extracción de 5 horas para *C. reticulata*; finalmente la citotoxicidad de los extractos de semilla de *C. aurantifolia* swingle no se afectó por el tiempo de extracción, siendo indistinto si el tiempo de extracción, ya sea 5 u 8 horas, como se puede observar en la figura 3.12, mostrando un comportamiento similar al rendimiento de extracto de limonoides.

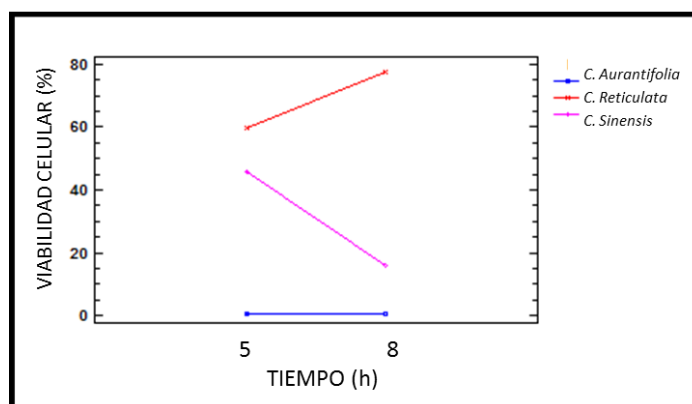


Figura 3-12 Viabilidad celular de L5178Y ante extractos de semillas a diferentes tiempos de extracción.

Por otra parte, el factor concentración mostró el comportamiento esperado del tipo dosis-respuesta, donde al aumentar la concentración del extracto de limonoides se aumentó la citotoxicidad de los extractos, y esto es evidente en la figura 3.13 donde se aprecia que desde la menor concentración evaluada existe una citotoxicidad significativa de un orden mayor al 50%. Comportamientos similares se observan en estudios reportados por Kotombali y col. 2011 quien evaluó extractos de *C. reticulata*

contra células de cáncer de colon (SW480) y fibroblastos (112CoN) o en el reportado por Guthrie y col. 2000 de extractos de jugo de naranja y toronja contra células de cáncer de mama (MDA-MB-435), o también el mismo efecto dosis-respuesta se observa en el estudio de Zaki y col., 2011 contra células de leucemia tipo CCRF-CEM y CEM/ADR5000 de extractos de semillas de *C. jambhiri Hassk* y *C. pyriformis Lush*.

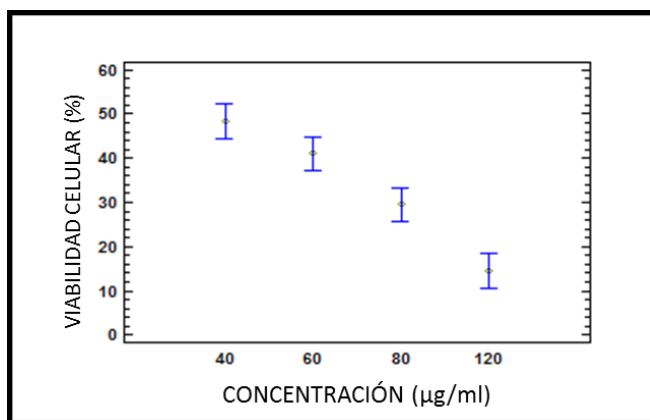


Figura 3-13 Efecto de la concentración de extracto de limonoides sobre la Viabilidad celular de L5178Y.

Aunado a eso, se encontró que la citotoxicidad también es dependiente del tipo de semilla de manera importante, lo que refleja las diferencias en cuanto al contenido de limonoides, donde la semilla que presentó una mayor citotoxicidad fue la de *C. aurantifolia swingle*, seguida de *C. sinensis* y *C. reticulata*, como se observa en la figura 3.14, esto coincide con los resultados obtenidos de rendimiento, donde también *C. aurantifolia swingle* presentó el mayor rendimiento de extracto de limonoides y sugiere una mayor citotoxicidad en limas que en cítricos dulces.

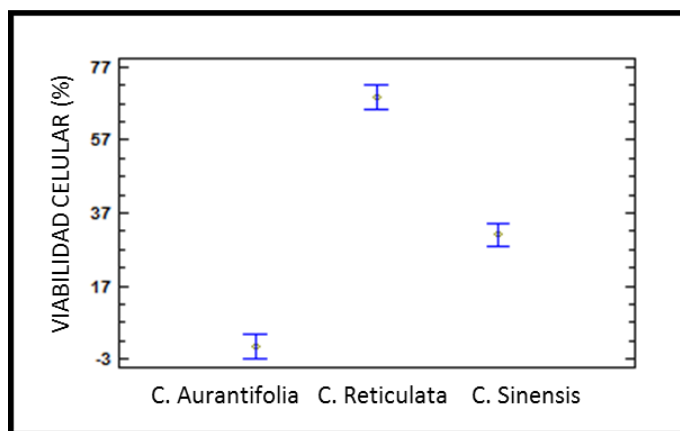


Figura 3-14 Viabilidad celular de L5178Y ante extractos de *C. aurantifolia swingle*, *C. sinensis* y *C. reticulata*.

Finalmente, el efecto de la concentración de los extractos de limonoides sobre la citotoxicidad, se puede apreciar en la figura 3.15, donde se evidencia el comportamiento dosis respuesta para los cítricos *C. reticulata* y *C. sinensis*, más no así para el extracto de limonoides obtenido a partir de *C. aurantifolia swingle*. Además, el extracto de limonoides obtenido de *C. reticulata* mostró una menor citotoxicidad que el extracto de limonoides de *C. sinensis*, y este último mostró una menor citotoxicidad que el extracto de limonoides de *C. aurantifolia swingle*, logrando determinarse las dosis citotóxicas medias para *C. reticulata* y *C. sinensis*, CD50 de 95 $\mu\text{g/ml}$ y CD50 50 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. La dosis citotóxica media para el extracto de limonoides obtenido a partir de la semilla de *C. aurantifolia* no se pudo determinar en esta prueba debido a que la dosis menor evaluada (40 $\mu\text{g/ml}$) tuvo un efecto citotóxico importante, por lo que fue necesario evaluar a dosis menores, mismas que se mencionan enseguida en el capítulo IV.

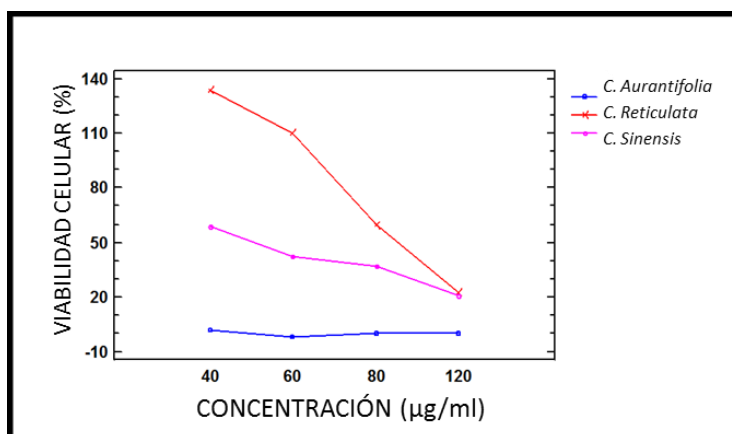


Figura 3-15 Efecto de la concentración de extractos de limonoides de *C. aurantifolia swingle*, *C. sinensis* y *C. reticulata* sobre la viabilidad celular de L5178Y.

Los resultados obtenidos hasta este momento, muestran que la semilla del cítrico con mayor citotoxicidad fue *C. aurantifolia* por lo que este cítrico se eligió como base para la obtención y evaluación de extractos de limonoides mediante dióxido de carbono en estado supercrítico.

3.4. CONCLUSIONES

La evaluación de la actividad citotóxica de los extractos de semillas de cítricos contra linfoblastos de L5178Y resultó adecuada para obtener una alternativa de aprovechamiento de un sub-producto, debido al contenido de limonoides en las semillas. Los resultados de la evaluación de los extractos de las semillas de *C. aurantifolia*, *C. sinensis* y *C. reticulata* mostraron una actividad citotóxica significativa, evidenciando diferencias importantes entre cada cítrico, siendo los extractos de *C. aurantifolia swingle* los que presentaron mayor potencial citotóxico, al mostrar una dosis letal casi del cien por ciento en concentraciones de extracto de 40 µg/ml. Además de mostrar una misma afinidad al tipo de solvente utilizado para su extracción, se puede utilizar acetona o metanol; comportamiento similar respecto al tiempo de duración del proceso, debido a que se podría utilizar cinco u ocho horas de procesamiento; a diferencia de *C. sinensis* y *C. reticulata* los cuales sí se vieron afectados por estos factores.

Al haber evaluado dos tiempos menores de extracción que los reportados en otras investigaciones, se puede concluir que no es necesario que la extracción de limonoides sea mayor a las ocho horas, debido a que el tiempo de extracción no es significativo y dependerá del tipo de cítrico a procesar, por lo que será necesario optimizar el tiempo de extracción para cada cítrico. La mayoría de estudios reportados para la obtención de extractos de limonoides a partir de semillas de cítricos, sólo evalúa un tiempo de extracción, y en muchos de ellos este tiempo es mayor a las cinco y ocho horas de extracción, tiempos evaluados en esta investigación.

Similar al factor tiempo, el tipo de solvente resultó un factor importante que depende del tipo de semilla, esto se puede atribuir a las diferencias en composición de limonoides que existen entre los cítricos y que se vio reflejado tanto en el rendimiento de extracto de limonoides como en la actividad citotóxica de los extractos, siendo las semillas de *C. reticulata* las que presentaron un menor rendimiento y una menor citotoxicidad, contrario a *C. aurantifolia swingle* que mostró el mayor rendimiento de extracto de limonoides y la mayor citotoxicidad.

Finalmente, es importante mencionar que con el objetivo de tener un extracto con actividad citotóxica significativa contra linfoblastos L5178Y, se logró establecer una metodología donde se recomienda utilizar la semilla de *C. aurantifolia swingle*, desgrasándola durante seis horas con hexano y con una

extracción tipo soxhlet, seguido de una segunda extracción de igual manera tipo soxhlet, y empleando metanol o acetona durante ocho horas. Y una vez evaporado el solvente se pueda tener un extracto de limonoides con una actividad citotóxica a una concentración máxima de 40 µg/mL.

Por lo que el siguiente paso en esta investigación, será obtener un extracto de esta semilla mediante una tecnología libre de solventes, como lo es la extracción con dióxido de carbono en estado supercrítico, con el objetivo de ampliar aún más las posibilidades de aprovechamiento de los limonoides presentes en las semillas de *C. aurantifolia swingle*, esto debido al sinnúmero de ventajas que se le sumarían a estos extractos por el uso de esta tecnología.

BIBLIOGRAFÍA

- Anwar Farooq, Rehana Naseer, Bhangar I., Ashraf Samia, Talpur Farah Naz, Aladedunye Felix Adekunle, (2008) "Physico-Chemical Characteristics of Citrus Seeds and Seed Oils from Pakistan" J Am Oil Chem Soc Vol. 85:321–330.
- Arriola-Guevara Enrique, García-Herrera Tania, Guatemala-Morales Guadalupe, García-Fajardo Jorge, (2006) "Preliminary Study of the Properties of Mexican Lime Seed (*Citrus aurantifolia swingle*) for its Possible Uses" Información Tecnológica-Vol. 17 N°6, pág.: 97-102
- Balestrieri E., F. Pizzimenti, A. Ferlazzo, S. Giofrè, D. Iannazzo, A. Piperno, R. Romeo, M. Chiacchio, A. Mastino, B. Macchi, (2011) "Antiviral activity of seed extract from *Citrus bergamia* towards human retroviruses", Bioorganic and Medicinal Chemistry Vol. 19, 2084–2089.
- Battinelli, L.; Mengoni, F.; Lichtner, M.; Mazzanti, G.; Saija, A.; Mastroianni, C. M.; Vullo, V. (2003), "Effect of limonin and nomilin on HIV-1 replication on infected human mononuclear cells". *Planta Med.*, Vol. 10, 910–913.
- Bayazit, V. y Konar, V. (2010). "Biochemical and physiological evaluations of limonoids as potential cancer destroyers". *J. of Animal and Veterinary Advances*. Vol. 9, 1099-1107.
- Benavente, O.G.; Castillo, J.; Marin, F.R.; Ortuño, A.; Del Río, J.A. (1997). "Uses and properties of Citrus flavonoids". *Review. J. Agric. Food Chem*. Vol. 45 (12): 4505-4515.
- Berhow, M., Hasegawa S y Manners G. (2000). "CitrusLimonoids: Increasing Importance as Anticancer agents." Volumen 758. Ed. American Chemical Society.
- Bhimanagouda S. Patil, G. K. Jayaprakasha, K.N. Chidambara Murthy, y Amit Vikram, (2009) "Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities, and Challenges, *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 57, 8142–8160.

- Bocco, A.; Cuvelier, M.E.; Richard, H.; Berset, C. (1998) "Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts". *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46: 2123-2129.
- Braddock, R. J. (1999). Braddock, R. J., & E. Weiss (Eds.), *Handbook of citrus by-products and processing technology*. Wiley: New York.
- Breksa Iii Andrew P., Dragull Klaus, Wong Rosalind Y., (2008), "Isolation and Identification of the First C-17 Limonin Epimer, Epilimonin" *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 56, 5595–5598.
- Cowan, M.M. (1999), "Plant products as antimicrobial agents". *Clin. Microbiol. Rev.* Vol. 12(4): 564-582.
- Fernández-López J; Fernández-Ginés J.M; Aleson Carbonell L; Sendra, E; Sayas-Barbera E; Pérez-Alvarez J. A. (2004). "Application of functional citrus by products to meat products". *Trends food Sci. Tech.* Vol. 15, pages 176-185.
- Guthrie, N., Hasegawa, S., Manners, G., Vandenberg, T. (2000). "Inhibition of human breast cancer cells by citrus limonoides". In: *Citrus Limonoids: Functional Chemicals in Agriculture and Foods*, Ed. Berhow, M., Hasegawa, S. and Manners, G. ACS Symposium series Vol. 758. Pp.164-174.
- Hasegawa Shin y Mark Berhow; (2000). "Analysis of Limonoids by Thin-Layer Chromatography" *ACS Symposium Series Book citrus limonoid: chapter 3*, pages 31-39.
- Jaiprakash P., G. Jayaprakasha, M. Chidambara, B. Mahadev and P. Bhimanagouda, (2010) "Characterization of Citrus aurantifolia bioactive compounds and their inhibition of human pancreatic cancer cells through apoptosis", *J. Microchemical* Vol. 94, 108–117.
- Jaiprakash P., M. Chidambara, G. Jayaprakasha, C. Mahadev and P. Bhimanagouda, (2009) "Bioactive compounds from Mexican lime (Citrus aurantifolia) juice induce apoptosis in human pancreatic cells", *J. of Agriculture and Food Chemistry* Vol. 57, 10933–10942.
- Jayaprakasha, G. K.; Mandadi K.; Poulouse, S. M.; Jadegoud, Y.; Nagana Gowda, G. A.; Patil, B. (2008) "Novel triterpenoid from Citrus aurantium L. possesses chemopreventive properties against human colon cancer cells." *Bioorg. Med. Chem.*, Vol. 16 (11), 5939–5951.
- Jinhee Kim, G. Jayaprakasha, M. Muthuchamy, P. Bhimanagouda, (2011), "Structure–function relationships of citrus limonoids on p38 MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells", *European J. of Pharmacology* Vol. 670, 44–49.
- Jinhee Kim, G. Jayaprakasha, R. Uckoo, P. Bhimanagouda, (2012), "Evaluation of chemopreventive and cytotoxic effect of lemon seed extracts on human breast cancer (MCF-7) cells", *Food and Chemical Toxicology* Vol. 50, 423–430.

- Kotamballi N., M. Chidambara, G. Jayaprakasha, K. Vinod, R. Keerti, P. Bhimanagouda, (2011) "Citrus limonin and its glucoside inhibit colon adenocarcinoma cell proliferation through apoptosis", *J. of Agriculture and Food Chemistry* Vol. 59, 2314–2323.
- Manners Gary D., Breksa III Andrew P. (2004) "Identifying Citrus Limonoid Aglycones by HPLC-EI/MS and HPLC-APCI/MS Techniques" *Phytochem. Anal.* Vol. 15, 372–381.
- Manners Gary D., Breksa III Andrew P., Schoch Thomas K., Hidalgo Marlene B. (2003) "Analysis of Bitter Limonoids in Citrus Juices by Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Electrospray Ionization Liquid Chromatography-Mass Spectrometry" *J. of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 51 (13), pp 3709–3714.
- Manners, G. D. (2007) Citrus limonoids: analysis, bioactivity, and biomedical prospects. *J. of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 55, 8285–8294.
- Manthey, J.A.; Grohmann, K. (1996). Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. *J. of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 44: 811-814.
- Manthey, J.A.; Grohmann, K. (2001). Phenols in citrus peel byproducts. Concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses. *J. of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 49:3268-3273.
- Marín Francisco R., Soler-Rivas Cristina, Benavente-García Obdulio, Castillo Julian, Pérez-Alvarez José, (2007) "By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres". *Food Chemistry* 100 736–741.
- Miller, E. G.; Taylor, S. E.; Berry, C. W.; Zimmerman, J. A.; Hasegawa, S. (2000), "Citrus limonoids: increasing importance as anticancer agents. In *Citrus Limonoids: Functional Chemicals in Agriculture and Foods*"; En Berhow, M. A., Hasegawa, S., Manners, G. D., Eds.; ACS Symposium Series 758; American Chemical Society: Washington, DC,; pp 132-144
- P. Benelli, C. Riehl, A. Smania, E. Smania, S. Ferreira, (2010), "Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition", *J. of Supercritical Fluids*, Vol. 55, 132–141.
- Poulouse Shibu M, Guddadarangavvanahally K Jayaprakasha, Richard T Mayer, Basavaraj Girenavar y Bhimanagouda S Patil, (2007) "Purification of citrus limonoids and their differential inhibitory effects on human cytochrome P450 enzymes" *J Sci Food Agric*, Vol. 87:1699–1709.
- Rouseff R.L. y Nagy S. (1982). Distribution of limonoids in citrus seeds. *Phytochemistry*. Vol. 21, 85-90.

- Ruberto, G.; Renda, A.; Tringali, C.; Napoli, E.M.; Simmonds, M.S. (2002). "Citrus Limonoids and Their Semisynthetic Derivatives as Antifeedant Agents against Spodopterafrugiperda Larvae. A Structure - Activity Relationship Study". *J. of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 50, 6766-74.
- Russo M., I. Bonaccorsi, G. Torre, M. Sarò, P. Dugo, L. Mondello, (2014), "Underestimated sources of flavonoids, limonoids and dietary fibre: availability in lemon's by-products", *J. of Functional Foods* Vol. 9, 18–26.
- Schoch, Thomas K, Gary D. Manners, y Shin Hasegawa (2001) "Analysis of Limonoid Glucosides from Citrus by Electrospray Ionization Liquid Chromatography-Mass Spectrometry" *J. of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 49, 1102-1108.
- SIAP 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, en su página <http://www.siap.gob.mx/> visitada el 02 de Julio del 2015.
- Stange, R.; Midland, S.L., Sims, J.; McCollum, T.G. (2002) "Differential effects of citrus peel extracts on growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, and *P. expansum*". *Physiological and molecular plant pathology*. Vol. 61:303-311.
- Tian, Q.; Miller, E. G.; Ahmad, H.; Tang, L.; Patil, B. S. (2001) "Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoides". *Nutr. Cancer*, Vol. 40 (2), 180–184.
- USFDA Global Agricultural Information Network Report no. SP1020 (2009).
- Vikram A., G. Jayaprakasha, P. Bhimanagouda, (2007) "Simultaneous determination of citrus limonoid aglycones and glucosides by high performance liquid chromatography", *Analytica Chimica Acta* Vol. 590, 180–186.
- Vikram Amit, Jesudhasan Palmy R., Jayaprakasha G.K., B.S. Pillai, Bhimanagouda S. Patil, (2010) "Grapefruit bioactive limonoids modulate *E. coli* O157:H7 TTSS and biofilm" *International J. of Food Microbiology*, Vol. 140 109–116.
- Zaki M., D. Hamdan, N. Farrag, A. El-Shazly, M. Wink, (2010) "Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from citrus species in human colon and leukaemia cell lines," *European J. of Pharmacology*, Vol. 626, 139–145.

CAPÍTULO CUATRO

CITOTOXICIDAD DE LIMONOIDES DE C. AURANTIFOLIA EXTRAÍDOS MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

4.1.INTRODUCCIÓN

Las plantas de cítricos se cultivan en todo el mundo y en México no es la excepción, donde básicamente existen cuatro especies con importancia comercial de cítricos, entre los que destacan *Citrus sinensis* (naranja dulce) y *Citrus aurantifolia Swingle* (Limón mexicano), donde además de su importancia comercial, destacan por el sinnúmero de metabolitos que contienen, y de los que ya han sido aislados en las distintas especies del género *Citrus*. Entre los principales metabolitos secundarios podemos encontrar a los flavonoides y limonoides (Gerolino y col., 2015).

En el procesamiento industrial de los cítricos se generan grandes cantidades de subproductos, y como una parte de estos subproductos se encuentra a las semillas, éstas se obtienen durante el procesamiento de los cítricos, principalmente para la obtención de su jugo y representan entre el 2-4% del fruto. En particular para *C. aurantifolia Swingle*, una fruta cítrica amarga que se consume en todo el mundo como fruta fresca debido a su sabor amargo y a los beneficios para la salud (Navarro y

col., 2014; Khan y col., 2014); presenta una cantidad de semillas de aproximadamente el 4% del peso total procesado, siendo similar en cantidad de semillas a *C. reticulata*.

La investigación a partir de las semillas de cítricos ha demostrado la existencia de compuestos bioactivos con propiedades en beneficio a la salud, ya que contienen un grupo de metabolitos secundarios, denominados limonoides, los cuales son compuestos triterpenoides con una estructura de 4, 4, 8-trimetil-17-furanilsteroidal (Vadehttin y col., 2010; Manners, 2007; Miller y col., 2000; Yu, 2004).

Limonoides en semillas de cítricos se encuentran principalmente en su forma aglicona como por ejemplo limonina, nomilina y obacunona, entre otros (Manners, 2007; Jaiprakash y col., 2009; Bhimanagouda y col., 2009) a diferencia de las que se encuentran en el jugo, donde la mayoría se encuentran en la forma glicosilada (Jaiprakash y col., 2009; Breksa y col., 2007). Estos limonoides presentes en las semillas, le otorgan un potencial de aprovechamiento a los subproductos, debido a que los limonoides han demostrado una diversidad de bioactividades importantes, tales como antivirales, antimicrobianos, actividades insecticidas, actividad citotóxica, entre otras (Russo y col., 2010).

En particular, para la actividad anticancerígena, se ha encontrado que existen varios estudios *in vitro* (cultivos de células) que explican la capacidad de los limonoides cítricos para inhibir las células cancerosas y para actuar como compuestos anticancerígenos. Algunos extractos de limonoides se evaluaron en cultivos celulares (*in vitro*), encontrando evidencias de su citotoxicidad, inhibiendo el crecimiento de células cancerígenas de ovario, de cuello uterino, estómago, hígado, incluso células de carcinoma de mama (Manners, 2007; Jaiprakash y col., 2009; Langeswaran y col., 2013; Jinhee y col., 20011; Hamdan y col., 2011). Además, varios estudios *in vivo* han demostrado cómo los limonoides pueden afectar algunos mecanismos fuertemente asociados con el inicio de la mayoría de los tipos de cáncer, como el cáncer de colon, cáncer de hígado y cáncer de pulmón (Vadehttin y col., 2010; Langeswarana y col., 2012; Jaiprakash y col., 2010; Kotamballi y col., 2011).

En el capítulo 3 se evaluaron tres tipos de semillas de cítricos *C. aurantifolia swingle*, *C. reticulata* y *C. sinensis*, como parte del aprovechamiento de dichas semillas para la obtención de un extracto de limonoides, al cual enseguida, se le evaluó su citotoxicidad contra linfoblastos de L5178Y, siendo los extractos obtenidos a partir de semillas de *C. aurantifolia Swingle*, los que presentaron el mayor

rendimiento y la mayor actividad citotóxica, definiéndose una metodología para la obtención de extractos de limonoides mediante solventes en extracción soxhlet.

La extracción de limonoides es comúnmente efectuada usando solventes orgánicos mediante la técnica soxhlet (Chen y col., 2007; Balestrieri y col., 2011; Jinhee y col., 2012) así como también algunas variaciones a la misma, como soxhlet asistido con ultrasonido o simplemente mediante maceración, maceración con agitación, entre otros. Sin embargo, los rendimientos obtenidos y la composición de limonoides por estos métodos es dependiente del tipo de solvente y del tiempo, como los obtenidos por Jaiprakashy col., 2010, con un rendimiento de 3.9 mg de limonina/g de semilla seca obtenido por acetato de etilo, 1.6 mg de limonina/g de semilla seca obtenido con metanol y 0.48 mg de limonina/g de semilla seca obtenidos con acetona, éstos para semillas de *C. aurantifolia* Swingle.

Más aún, la extracción con solventes orgánicos podría degradar algunos componentes debido a los tiempos largos de extracción. Esto con base en que diferentes estudios dividen la extracción en dos periodos: el primer periodo con una duración de 8 horas, con el objeto de remover el aceite contenido en las semillas, y un segundo periodo, para la extracción de limonoides, con un tiempo recomendado de 8 horas (según los resultados del capítulo 3), esto evidencia que la técnica soxhlet, a pesar de ser una técnica efectiva, no es eficiente ni amigable con el medio ambiente debido al uso de solventes y los tiempos largos de extracción, en el caso particular para los limonoides, suelen ser de por lo menos 8 horas (Jaiprakash y col., 2009; Chen y col., 2007; Jayaprakasha y col., 2011; Liu y col., 2012; Vikram y col., 2007).

Actualmente se desarrollan otras alternativas de extracción, como la extracción con solventes hidrotropicos, en donde se utiliza una mínima cantidad de solventes orgánicos, incluso se puede prescindir de ellos. Sin embargo, todavía existe cierta preocupación al respecto desde un punto de vista ambiental, ya que este método utiliza grandes cantidades de sales y de agua, además de mostrar rendimientos bajos (0.65 mg /g de semilla seca) en limonoides comparado con otros métodos, esto sin mencionar que también se requiere de tiempos largos de proceso con 6 horas como mínimo (Dandekar y col., 2008).

La extracción mediante dióxido de carbono en estado supercrítico ha demostrado ser también un método efectivo para la obtención de moléculas bioactivas de diferentes plantas. Algunos estudios reportan la obtención en diferentes matrices alimentarias de compuestos con polaridades similares a

los limonoides, como isoflavonas, carotenoides, escualenos, naringina, entre otros (Jaiprakash y col., 2010; Ueno y col., 2008; Benelli y col., 2010; Giannuzzo y col., 2003).

La extracción mediante fluidos en estado supercrítico ha sido comparada constantemente con la extracción mediante solventes orgánicos, donde la extracción con fluidos supercríticos resulta ser una tecnología efectiva en la extracción, con muy pocos o sin residuos de solventes; en algunos casos se obtienen purzas mayores de los bioactivos, mayores rendimientos de extracción, y esto en un menor tiempo de extracción. En promedio el proceso de extracción con fluidos supercríticos puede durar entre 2-6 horas comparado con las 8-16 horas de una extracción soxhlet, pero estos tiempos dependerán del material vegetal (Chen y col., 2007; Rai y col., 2014; De Melo y col., 2014; Shortle y col., 2013; Sovova, 2012; Hsu y col., 2001; Herrero y col., 2010).

En particular para limonoides se ha reportado la extracción a partir de semillas de toronja mediante CO₂ en estado supercrítico, obteniendo un rendimiento de limonina de 6.3 mg/ g de semilla seca, este contenido fue similar al obtenido mediante la extracción con solventes orgánicos, pero el tiempo de extracción se redujo en 14 horas; esta reducción se debe a que para la extracción mediante CO₂ la remoción del aceite vegetal y la evaporación del solvente no es necesaria, lo que deja el tiempo de extracción para fluidos supercríticos en 2 horas (Yu y col., 2007).

Por lo que en este capítulo 4, se evaluó una técnica de extracción con CO₂ supercrítico, debido a que esta técnica ha demostrado ser una técnica con ventajas tanto económicas como medioambientales, y además tiene la capacidad de obtener compuestos con un alto grado de pureza sin producir la degradación térmica del mismo. También esta tecnología puede ser efectiva para la purificación de componentes orgánicos y más específicamente de limonoides a partir de semillas cítricas, por lo que se consideró como una alternativa con un gran potencial para realizar la extracción de limonoides de las semillas de *Citrus aurantifolia swingle*.

Así pues, se realizó la extracción mediante dióxido de carbono en estado supercrítico a partir de semilla *Citrus aurantifolia swingle* evaluando su citotoxicidad contra linfoblastos de L5178Y y se comparó con los resultados obtenidos mediante solventes en el capítulo 3.

4.2.MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas *C. aurantifolia Swingle* utilizadas en este estudio fueron originarias de Tecomán, Colima, México, y fueron proporcionadas por una empresa de procesamiento de cítricos (Frutech Co.) las cuales eran un desecho industrial real. Las semillas corresponden a la cosecha de cítricos de 2011 y se deshidrataron al sol (8% de humedad) para ser molidas por la misma empresa, las semillas deshidratadas y molidas se entregaron envasadas en bolsas de 10 kg y se almacenaron previamente a ser utilizadas en el estudio.

4.2.1. Extracción con solventes

Diecisiete gramos de semillas de *C. aurantifolia Swingle* fueron desgrasadas con hexano (Kara®) 1:10, mediante extracción Soxhlet durante 6 h. Enseguida, la semilla desgrasada se extrajo nuevamente por la técnica de Soxhlet, evaluándose dos tipos de disolventes (metanol y acetona) 1:10, y dos tiempos de extracción (5 y 8 h). Los extractos crudos se filtraron a través de papel filtro Whatman no.1, enseguida se evaporó el solvente en un evaporador rotatorio (B-490 Buchi). Los solventes se evaporaron hasta sequedad antes de determinar el rendimiento (%). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado efectuándose un diseño 2²; para el análisis estadístico se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., EE.UU.). Una vez obtenidos los extractos se les evaluó su actividad citotóxica (Jaiprakash y col., 2009; Jaiprakash y col., 2010; Vikram y col., 2007; Poulouse y col., 2007).

4.2.2. Extracción mediante fluidos supercríticos

4.2.2.1.Descripción del equipo

El equipo utilizado en este trabajo se observa en la figura 4.1, y fue un extractor supercrítico Waters® SFE-500MR que se describe a continuación:



Figura 4-1 Sistema de extracción supercrítica SFE-500MR

Como se muestra en la Figura 4.1 el equipo supercrítico consta de diferentes módulos, que a continuación se detallan brevemente para el mejor entendimiento del proceso de extracción.

Bomba CO₂

Figura 4.2 - Es de tipo recíprocante, con una capacidad máxima de flujo de 50g/min, y una presión de operación de hasta 60.0 MPa. La temperatura de los pistones se controla mediante un enfriador externo que hace circular anticongelante a través del sistema. La presión de entrada del CO₂ a la bomba tiene que ser mayor a 40 MPa para que el sistema pueda alcanzar las condiciones de operación. Cuenta con un manómetro que registra la presión interna del equipo.

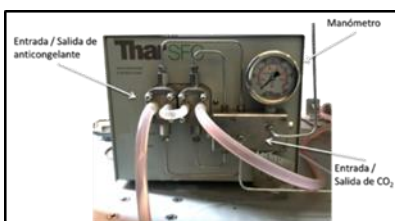


Figura 4-2 Bomba de CO₂ Líquido

Bomba de co-solvente

Figura 4.3 - De tipo pistón, con capacidades de flujo entre 0.01 - 10.00ml/min y una presión máxima de operación de 35.0 MPa. El equipo cuenta con un orificio para purgar la alimentación y así evitar el ingreso de burbujas de aire al sistema que pudieran desestabilizar la extracción (en este estudio en particular no se utilizó).

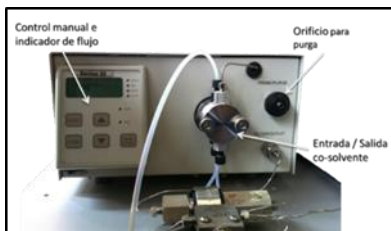


Figura 4-3 Bomba de Co-Solvente

Intercambiador de calor

Figura 4.4 - Aquí se precalienta el solvente antes de entrar al recipiente de extracción mediante resistencias eléctricas, hasta una temperatura máxima de 150°C.



Figura 4-4 Intercambiador de Calor

Recipiente de extracción

Figura 4.5 - Tiene un volumen de 500 ml, pero la capacidad real es menor debido a la incorporación de una canastilla para el manejo de la matriz. Además, tiene una chaqueta de calentamiento para controlar la temperatura con que se realiza la extracción y un manómetro. Soporta un máximo de 60.0 MPa al igual que la bomba de CO₂.

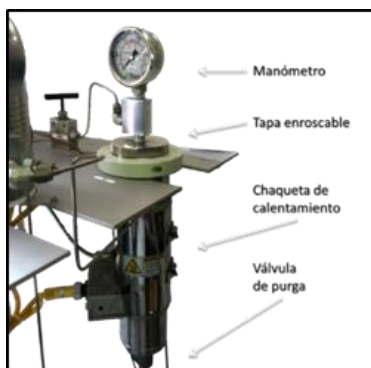


Figura 4-5 Recipiente de Extracción.

Recipiente de separación

Figura 4.6 -Cuenta con un volumen de 500 ml, con asiento cónico y una válvula en el fondo para facilitar la derivación del extracto. Soporta presiones de hasta 2.0 MPa y, al igual que el recipiente de extracción, cuenta con una chaqueta de calentamiento y un manómetro.



Figura 4-6 Recipiente de Separación

Regulador de presión trasera automatizado (ABPR)

Figura 4.7 - Es el encargado de regular la presión en todo el sistema y de propiciar la caída de presión necesaria para la separación del extracto y el fluido supercrítico. Para llevar a cabo su trabajo cuenta con una válvula de aguja que cambia de posición (de 0-6000). Además, posee un sistema de calentamiento interno para evitar el congelamiento de las válvulas debido a la súbita descompresión del fluido supercrítico a la salida de éste.



Figura 4-7 Regulador de Presión Automatizado (ABPR)

Regulador de temperatura por zonas

Figura 4.8 -Es el lugar donde se encuentran conectados los termopares y resistencias eléctricas y donde se centraliza el control de la temperatura a lo largo de las diferentes zonas térmicas en las que se divide el sistema. El equipo cuenta con unos LEDs que indican en cuales zonas se encuentran activas las resistencias.



Figura 4-8 Regulador de temperatura por zonas.

El control del flujo, la temperatura y la presión del sistema se realizan con una computadora mediante el software de control "Thar Instruments Process Suite®".

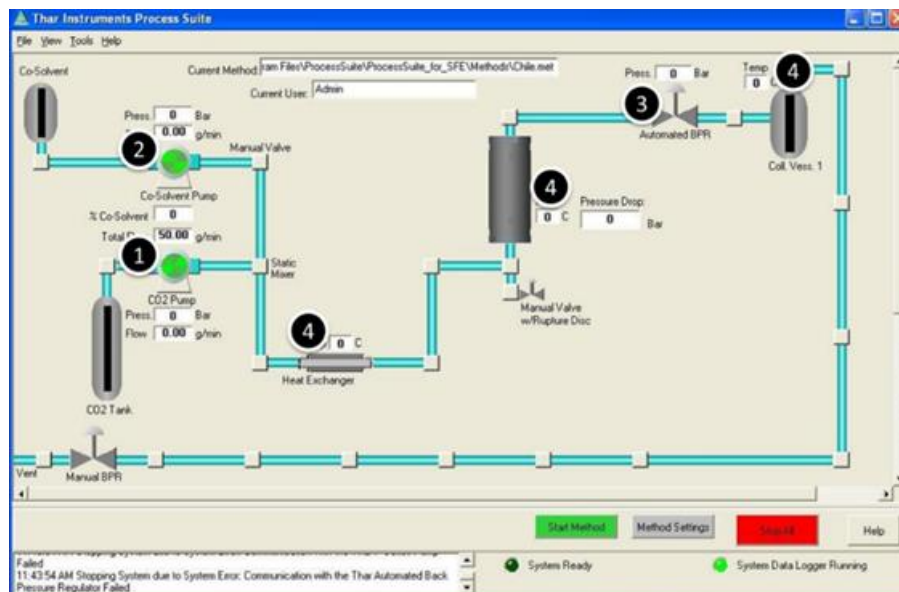


Figura 4-9 Interfaz de control del sistema: 1) Bomba de CO₂, 2) Bomba de Co-Solvente, 3) ABPR 4) Control de Temperaturas por zonas

La figura (Figura 4.9) muestra la pantalla principal del programa de control donde se encuentran los diferentes controles del sistema así como el valor de control de temperatura, presión y flujo, además de los controles generales para iniciar/detener el sistema. Dentro de cada una de las secciones se pueden especificar las condiciones de operación a las que se va a trabajar.

4.2.2.3. Procedimiento de extracción

El equipo cuenta con una canastilla desmontable (Figura 4.10) que facilitó el manejo de la semilla de *C. aurantifolia Swingle* a extraer y la limpieza del recipiente de extracción. Se tomó una muestra de 130 gramos de semillas y se colocaron dentro de la canastilla.

Esta a su vez fue colocada dentro del recipiente de extracción y se procedió a cerrar correctamente para evitar fugas de CO₂ debido a las altas presiones con las que trabaja el equipo. Posteriormente se abrió la válvula del tanque de CO₂ (grado industrial, INFRA™) y se alimentaron las condiciones de operación dentro de la interfaz gráfica del equipo, procediéndose a iniciar la bomba de solvente.



Figura 4-10 Canastilla de extracción utilizada en la extracción supercrítica

Al inicio se estableció el flujo máximo de solvente que la bomba puede manejar (50 g/min) para lograr la presión de extracción de una manera rápida. Una vez alcanzada la presión de operación, se fijó el flujo en 10 g de CO₂/min debido a que es el recomendado por trabajos anteriores (Yu y col., 2007).

El tiempo de cada extracción fue de 2 h ya que a este tiempo se asegura la extracción casi en su totalidad de los limonoides (Giannuzzo y col., 2003; Yu y col., 2007; Ueno y col., 2008). La temperatura dentro del recipiente de separación se mantuvo en 60 °C para todos los experimentos, además de evitar que el material extraído no solidificara facilitando su recuperación. Una vez terminado cada experimento, se detuvo el funcionamiento de la bomba y se purgó la salida del gas de manera gradual con la ayuda del control manual del ABPR, esta purga provocó un aumento significativo en la presión dentro del recipiente de separación (aprox. 1.0 MPa) que se aprovechó para recuperar el extracto de manera más eficiente mediante la válvula localizada en el inferior del recipiente.

En el proceso de extracción se evaluaron los efectos de dos niveles de presión (38.5 y 48.5 megapascales (MPa)) y dos niveles de temperatura (323 y 333 K) sobre el rendimiento de extracto crudo de limonoides, enseguida se evaluó la citotoxicidad de los extractos contra linfoblastos L5178Y.

Para realizar la extracción con dióxido de carbono en estado supercrítico se utilizó un flujo constante de 10 g de CO₂ / min y se estableció una alimentación del CO₂ por debajo del recipiente de extracción. El tiempo total de extracción fue de 2 horas (Ueno y col., 2008; Giannuzzo y col., 2003; Yu y col., 2007).

Se utilizó un diseño central compuesto 2² con 43.5 MPa y 328 K como el punto central, lo que permitió evaluar los efectos lineales e interacciones entre los procesos de presión y temperatura del proceso,

además de analizar los efectos y factores cuadráticos de curvatura. El análisis se realizó también por el software Statgraphics Centurion XVI software (StatPoint Technologies, Inc., USA).

4.2.3. Análisis HPLC (High-performance liquid chromatography)

El análisis de los extractos se realizó en un HPLC modelo 996 Waters® equipado con un detector de arreglo de diodos. La separación se realizó en una columna de fase reversa C18 Phenomenex Luna® 5 micrones 100 Å 250 × 4,6 mm. Se utilizó una elución isocrática de agua / acetonitrilo, 54/46%, con un flujo de 1 mL / min. El volumen de inyección fue de 30 µL; previo a la inyección, los extractos experimentales se filtraron a través de un filtro Millipore de 0.45 µm.

Se utilizó un estándar de limonina (Sigma-Aldrich) para la identificación y se realizó una curva de calibración con el mismo estándar para la cuantificación (Anexo ##) de limonina en los extractos. Los picos y áreas cromatográficas fueron analizados utilizando el software Empower Pro.

4.2.4. Actividad Citotóxica

La actividad citotóxica se llevó a cabo en cultivos celulares en una microplaca de 96 pozos (Costar® Corning® 3595), en donde se evaluaron extractos de acetona y de metanol obtenidos a las 8 h, y el extracto con CO₂ supercrítico obtenido a 48,5 MPa y 333 K. Se evaluaron diferentes concentraciones de extractos (40, 20, 10, 8, 5, 1, y 0,5 µg / ml) sobre células de linfoma L5178Y (5 × 10⁴), concentraciones menores a las evaluadas en el capítulo 3 para *C. aurantifolia* swingle. El volumen final de cada pozo fue de 200 µl, y estaba compuesto de medio 1640 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco®, pH 7), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) inactivado previamente (Gibco®); 5000 IU / ml de penicilina y estreptomycin (Gibco®), se usaron 5 mg / ml como antibiótico, 10 ml por 500 ml de RPMI.

Ciento sesenta µg/mL de ciclofosfamida (CY-Sigma-Aldrich) se utilizaron como control positivo para la citotoxicidad. Las células se incubaron durante 24 horas a 310 K a presión atmosférica con 5% de CO₂ y humedad relativa del 95%. Al final del periodo de incubación se evaluó la viabilidad celular mediante la prueba MTT, descrita en los capítulos 2 y 3, a una absorbancia de 570 nm en un lector de microplacas BioRad modelo 680. Estos experimentos se llevaron a cabo por triplicado (Jaiprakash y col., 2009, Jaiprakash y col., 2010).

4.3.RESULTADOS

4.3.1. Extracción con solventes

Al analizar los resultados de la extracción con solventes, se encontró que no existe diferencia significativa respecto al rendimiento del extracto crudo (%) en base seca (BS) entre los tipos de solventes (P value > 0.05). Y en donde se obtuvieron rendimientos de extractos promedio en el orden de 11.39% BS \pm 1.3 para los extractos con metanol y 10.37% BS \pm 2.21 para los extractos con acetona, figura 4.11, contrario a los reportados por Jaiprakash y col., 2010, donde se obtuvieron rendimientos menores, y se observaron diferencias por el tipo de solvente, 2.48% el rendimiento de extracto crudo por metanol y 0.64% el rendimiento con acetona.

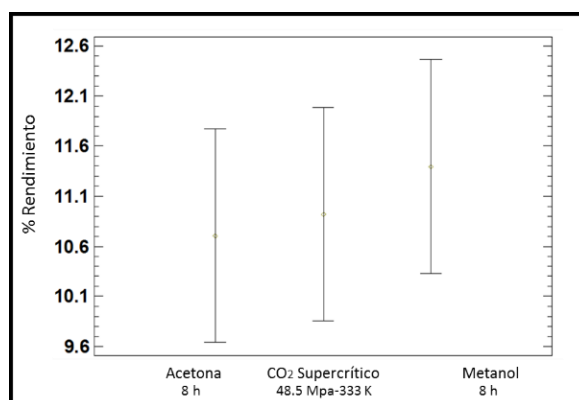


Figura 4-11 Efecto del Método de Extracción sobre el Rendimiento de Extracto

Estas diferencias en rendimiento pudieron deberse a la distinta manera de preparar las semillas, a las diferentes relaciones semilla: solvente utilizadas, e incluso al diferente tamaño de partícula utilizado en el proceso de extracción. Respecto al tiempo de extracción, se pudo observar que no existe diferencia estadística significativa (P value > 0.05) entre los tiempos de extracción de 5 y 8 horas, eligiendo el extracto de 8 horas para la evaluación citotóxica y para el análisis por HPLC, como se observa en la figura 4.12, esto debido a que aunque para *C. aurantifolia swingle* el tiempo no fue significativo, en el capítulo 3 se encontró que el tiempo puede afectar a los otros cítricos.

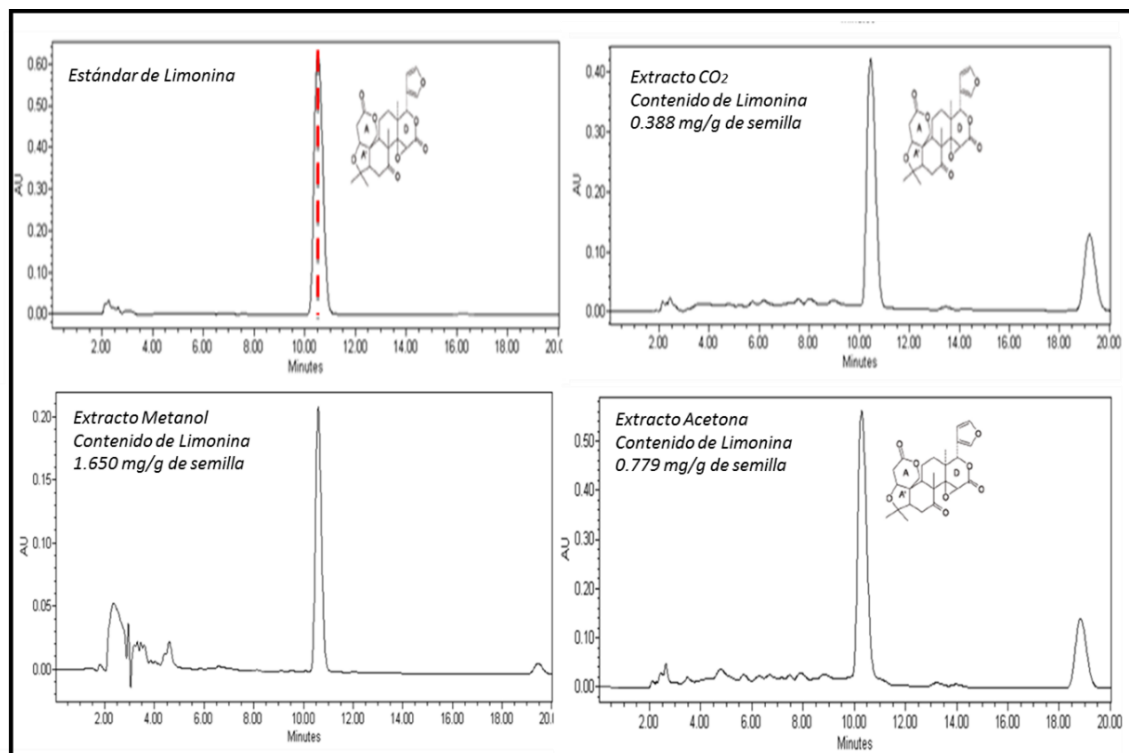


Figura 4-12 Rendimiento de Limonina en diferentes extractos de *C. aurantifolia swingle*.

Los limonoides aglicona son los componentes mayoritarios dentro de las semillas de *Citrus aurantifolia swingle* (Manners, 2007; Jaiprakash y col., 2009; Breksa y col., 2007; Jayaprakasha y col., 2011); por eso los resultados por HPLC revelan la presencia de limonina en todos los extractos, pero en concentraciones diferentes: 1.65 mg/g de semilla seca en el extracto con metanol y 0.779 mg/g de semilla seca en el extracto con acetona; composiciones similares fueron reportadas por Jaiprakash y col., 2010 para *C. aurantifolia swingle* con 1.6 mg/g de semilla seca para el extracto con metanol y 0.48 mg/g de semilla seca al extracto con acetona, los resultados obtenidos en este trabajo fueron mayores a los reportados por Russo y col., 2014, quienes reportan 0.018 mg/g, pero fueron menores a los reportados por Jaiprakash y col., 2010, obtenidos con acetato de etilo.

Estudios para otro tipo de cítricos reportan mayores contenidos de limonina, como 1.1 mg/g de semilla seca para *C. aurantium L*, 2.1 mg/g de semilla seca para *Citrus reshni*, 2.8 mg/g de semilla seca para *C. reticulata blanco*, y 6.2 mg/g de semilla seca para *C. paradisi-Rio Red* (Jaiprakash y col., 2009; Jaiprakash y col., 2010; Vikram y col., 2007), aunque todos ellos obtenidos con acetato de etilo. Además, para *C. reticulata blanco*, diferentes contenidos de limonina se reportaron usando etanol (5.3 mg/g de semilla seca). Los resultados obtenidos y los estudios reportados demuestran que la

composición de limonoides, y en particular de limonina son dependientes del tipo de solvente utilizado en la extracción (Liu y col., 2012).

4.3.2. Extracción con Fluidos supercríticos

En la extracción supercrítica, y basándose en el análisis estadístico, se determinó que tanto la presión como la temperatura juegan un papel importante sobre la cantidad de extracto crudo y la cantidad de limonina respectivamente. Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Yu y col., 2007, para *C. paradisi*, en donde la presión fue el factor determinante para la obtención de extracto de limonoides más que la temperatura, similar a los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla 4.1) y que se describen con el siguiente modelo:

Tabla 4-1 Extracción supercrítica de semillas de *C. aurantifolia* swingle

| Code | Presión (MPa) | Temperatura (K) | (%) Rendimiento Base seca | Contenido Limonina (mg/ g semilla) |
|-------|---------------|-----------------|---------------------------|------------------------------------|
| E2-1 | 48.5 | 333 | 11.53 | 0.388 |
| E2-2 | 43.5 | 328 | 11.72 | 0.381 |
| E2-3 | 43.5 | 323 | 11.46 | 0.216 |
| E2-4 | 43.5 | 333 | 11.64 | 0.375 |
| E2-5 | 38.5 | 333 | 10.91 | 0.221 |
| E2-6 | 43.5 | 328 | 11.4 | 0.176 |
| E2-7 | 38.5 | 323 | 10.02 | 0.225 |
| E2-8 | 48.5 | 328 | 10.78 | 0.231 |
| E2-9 | 48.5 | 323 | 11.38 | 0.141 |
| E2-10 | 38.5 | 328 | 11.45 | 0.098 |

$$\% \text{ Rendimiento} = (1254.45 + 5.155 \cdot P - 8.32 \cdot T - 0.03034 \cdot P^2 - 0.0074 \cdot P \cdot T + 0.01324 \cdot T^2) / 100$$

*P: Presión en MPa y T: Temperatura en °C

Este modelo demuestra el efecto de la curvatura del diseño debido al punto central, con un ajuste de $R^2 = 84.86\%$ (Figura 4.13).

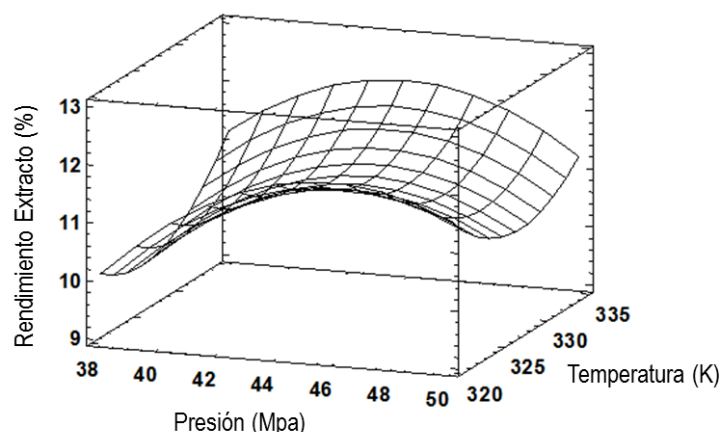


Figura 4-13 Efecto de la presión y temperatura sobre el rendimiento de extracto

Mientras tanto, el análisis estadístico reveló que la presión no fue significativa (P value > 0.05) para el rendimiento de limonina, esto no significa que la presión no sea importante, sino que los cambios en la presión no se detectan por la respuesta dentro de este rango de estudio, por lo que la limonina no se vio afectada por la presión de extracción evaluada en este trabajo, pero sí fue afectada (P value < 0.05) por la temperatura de proceso dentro del rango utilizado. Más aún, el máximo contenido de limonina fue de 0.388 mg limonina/ g de semilla seca obtenido a una presión de 48.5 MPa y 333 K. Basándose en el análisis y su optimización, se recomienda una presión de 44.2 MPa y 333 K para obtener limonina a partir de *C. aurantifolia swingle*, según el modelo:

$$\text{Limonina (mg/g semilla)} = 499.720 - 0.595 * P - 2.978 * T - 0.0025 * P^2 + 0.0025 * P * T + 0.00439 * T^2 / 1000$$

*P: Presión en MPa y T: Temperatura en °C

En este modelo también se puede observar en la Figura 4.14, donde el efecto de la curvatura es debido al punto central, mostrando un R^2 ajustado = 78.28%.

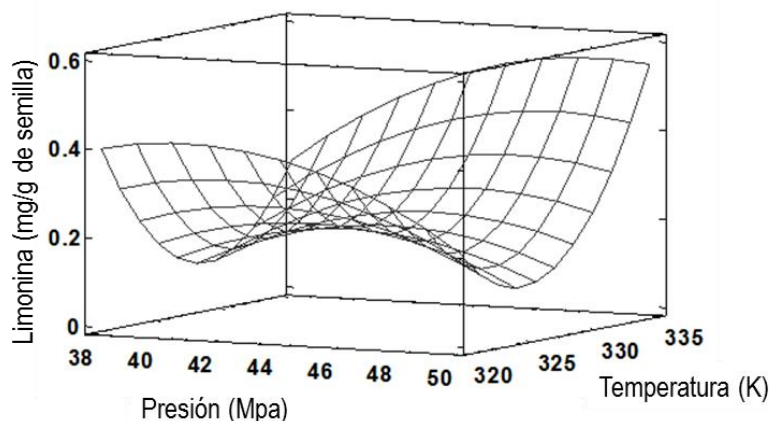


Figura 4-14 Efecto de la presión y temperatura sobre el contenido de limonina

El rendimiento de extracto crudo de limonoides fue similar al obtenido mediante extracción soxhlet con solventes. Pero existe una diferencia significativa entre contenido de limonina obtenido por fluidos supercríticos y el obtenido mediante solventes, donde se observa que el extracto con metanol se obtienen 1.650 mg limonina/g de semilla, 0.779 mg de limonina/ g de semilla se obtiene con acetona, en comparación con los 0.388 mg de limonina/ g de semilla obtenidos mediante dióxido de carbono en estado supercrítico. También, este contenido de limonina fue mucho menor al reportado por Jaiprakash y col., 2010; y Jaiprakash y col., 2009 cuando utilizó acetato de etilo obtuvo 3.9 mg limonina/ g de semilla, y con metanol obtuvo 1.6 mg limonina/ g semilla, con acetona obtuvo 0.48 mg de limonina/ g de semilla. La diferencia respecto al contenido de limonina en el extracto supercrítico se puede atribuir al limitado rango de presión utilizado. Ya que diferentes presiones conllevan a diferentes comportamientos en la polaridad del CO_2 , lo que se refleja en las cantidades de limonina obtenida, esto también se observa en la extracción con solventes donde al utilizar diferentes solventes se obtienen diferentes cantidades de limonina.

Comparando la extracción mediante fluidos supercríticos con la extracción con solventes hidrotropicos, otra técnica que no utiliza solventes orgánicos, el contenido de limonina en solventes hidrotropicos fue ligeramente mayor que la obtenida con fluidos supercríticos en este trabajo, con un contenido de 0.46 y 0.68 mg limonina/ g de semilla (Dandekar y col., 2008) pero esta fue menor que la extracción con solventes, sin embargo, la semilla utilizada en esta extracción hidrotropica fue distinta a *C. aurantifolia swingle*, y con base en los antecedentes, sería erróneo compararlas. Además de que casi en todos los estudios de limonoides, las semillas que utilizan no provienen de un desperdicio industrial, sino

que manipulan los frutos de manera adecuada, extraen las semillas cuidadosamente, incluso las deshidratan a temperaturas bajas, lo que se ve reflejado en un contenido mayor de limonoides.

Aunque es sabido que la limonina es térmicamente estable, también es susceptible a factores como humedad y oxígeno (Jinhee y col., 2012). Y estos factores sí podrían dañar o afectar el contenido de limonina durante el manejo y acondicionamiento de las semillas durante su tratamiento como subproducto, esto se suma a que la semilla utilizada en este trabajo fue deshidratada al sol y molida en la empresa sin ningún cuidado adicional. Este deterioro se confirma cuando se compara el contenido de limonina obtenido con el reportado por Russo y col., 2014, quienes reportaron un contenido de 0.018 mg de limonina/ g para un extracto de semilla de un desperdicio industrial real y obtenido con metanol, este rendimiento es menor a todos los obtenidos en este estudio.

4.3.3. Actividad Citotóxica contra L5178Y

Los extractos de semillas de *C. aurantifolia swingle* obtenidos mediante solventes y con dióxido de carbono en estado supercrítico, mostraron una actividad citotóxica importante como se aprecia en la figura 4.15. Además, todos los extractos mostraron un efecto dosis-respuesta, figura 4.16, con un comportamiento similar al reportado por Zaki y col., 2010, quienes evaluaron limonina pura contra cultivos *in vitro* de leucemia humana CCRF-CEM y CEM/ADR5000, encontrando una concentración mínima inhibitoria de 133.8 µg/mL (284.77 µM) y 74.9 µg/mL (159.44 µM) respectivamente.

Los extractos de semillas de *C. aurantifolia swingle* mostraron un efecto citotóxico importante a concentraciones mayores a 10 µg/mL, disminuyendo significativamente en concentraciones menores a 8 µg/mL. Este experimento permitió encontrar la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *C. aurantifolia swingle*, la cual no había sido determinada en el capítulo 3. Siendo entonces, para el extracto mediante dióxido de carbono en estado supercrítico de 8.5 µg/mL y para los extractos de solventes 9.0 µg/mL, como se observa en la tabla 4.2.

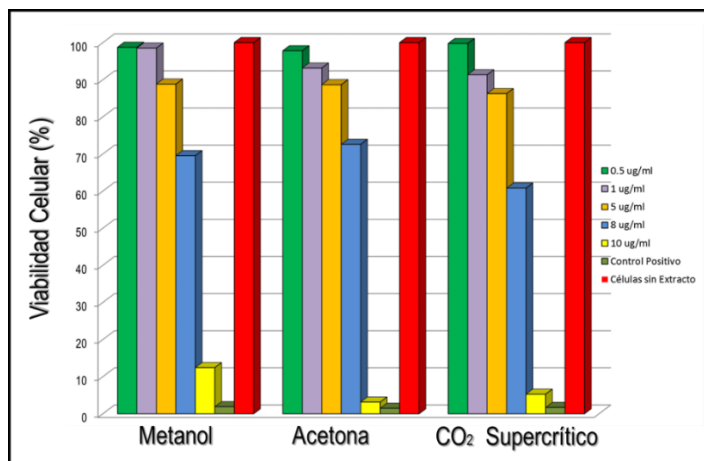


Figura 4-15 Actividad Citotóxica de Extractos de *C. aurantifolia* Obtenidos por Diferentes Solventes

Jaiprakash y col., 2009 estudiaron la inducción de apoptosis en células de cáncer de páncreas con extractos metanólicos de jugo de *C. aurantifolia* *swingle*, encontrando una IC_{50} de 100 μ M (47 μ g/mL). Esta diferencia en IC_{50} se debe a que los limonoides presentes en las semillas y en los jugos son diferentes, tanto en concentración como en composición, donde los limonoides glucosilados están en una concentración mayor que los aglicona en los jugos (Breksa y col., 2007).

Aunado a esto, Kotamballi y col., 2011, evaluaron el efecto de la limonina purificada de *C. reticulata* *blanco* sobre la inhibición de células de cáncer de colon, seguido de su capacidad de proliferación, encontrando que su IC_{50} fue de 25.4 μ g/mL (54.74 μ M) y 62.27 μ g/mL (137.23 μ M), y que para la proliferación dependía del tiempo de exposición de las células con la limonina.

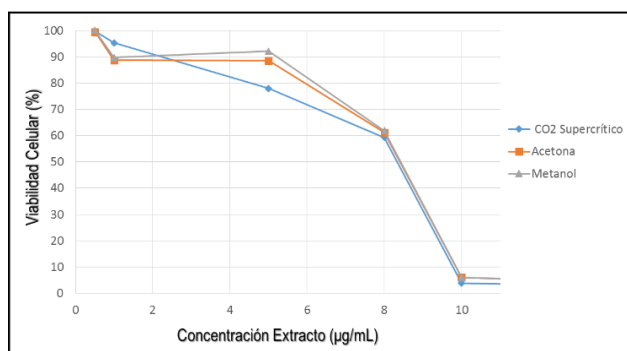


Figura 4-16 Comportamiento "Dosis Respuesta" de Extractos de *C. aurantifolia*

Numerosos estudios han encontrado diferentes IC_{50} de extractos de limonoides, de limonoides puros, encontrando que la citotoxicidad es particular para cada extracto y es dependiente de la línea celular donde se evalúa, lo que confirma que el cáncer es una enfermedad compleja y resulta entonces difícil

el comparar bioactivos o moléculas con algún efecto citotóxico contra células cancerosas simplemente con la concentración mínima inhibitoria.

Tabla 4-2 Efecto de extractos de *C. aurantifolia* swingle sobre la viabilidad celular de L5178Y

| Tratamiento | Concentración (µg/ml) | Viabilidad Celular (%) | | | Media | STD (±) | IC ₅₀ (µg/ml) |
|---|-----------------------|------------------------|---------|---------|--------|---------|--------------------------|
| Extracto CO ₂ Supercrítico (48.5 Mpa-333K) | 0.5 | 99.8 | 99.5 | 100 | 99.77 | 0.252 | |
| | 1 | 95.4 | 88.8 | 89.8 | 91.33 | 3.557 | |
| | 5 | 78 | 88.6 | 92.2 | 86.27 | 7.382 | |
| | 8 | 59.3 | 61.2 | 61.9 | 60.80 | 1.345 | 8.500 |
| | 10 | 3.8 | 6 | 6 | 5.27 | 1.270 | |
| | 20 | 1.5 | 1.8 | 1.7 | 1.67 | 0.153 | |
| | 40 | 3 | 1.6 | 1.6 | 2.07 | 0.808 | |
| Extracto Metanol (8 h extracción) | 0.5 | 97.4619 | 100 | 99.8 | 99.09 | 1.411 | |
| | 1 | 98.58 | 98.2 | 100 | 98.93 | 0.949 | |
| | 5 | 85.7868 | 86.802 | 93.9086 | 88.83 | 4.425 | |
| | 8 | 69.5431 | 70.0508 | 69.0355 | 69.54 | 0.508 | 9.000 |
| | 10 | 16.7908 | 14.1793 | 6.28035 | 12.42 | 5.472 | |
| | 20 | 4.17611 | 3.85238 | 2.94594 | 3.66 | 0.638 | |
| | 40 | 2.23429 | 1.02405 | 1.62917 | 1.63 | 0.605 | |
| Extracto Acetona (8 h extracción) | 0.5 | 96.51 | 97.9695 | 100 | 98.16 | 1.753 | |
| | 1 | 93.1472 | 96.9543 | 91.52 | 93.87 | 2.789 | |
| | 5 | 91.8782 | 87.8173 | 86.2944 | 88.66 | 2.886 | |
| | 8 | 72.0812 | 73.6041 | 72.0812 | 72.59 | 0.879 | 9.050 |
| | 10 | 2.00712 | 6.08611 | 1.32729 | 3.14 | 2.574 | |
| | 20 | 1.48916 | 2.68695 | 5.56815 | 3.25 | 2.097 | |
| | 40 | 1.11715 | 1.21024 | 1.11715 | 1.15 | 0.054 | |
| Control Positivo (Ciclofosfamida) | 160 | 1.9 | 1.48 | 1.7 | 1.69 | 0.210 | |
| Control Negativo (Células sin extracto) | 0 | 100 | 100 | 100 | 100.00 | 0.000 | |

En este trabajo de investigación se encontró que tanto la extracción con solventes como la extracción mediante fluidos supercríticos con CO₂, resultan ser técnicas efectivas para obtener extractos a partir de semillas de *C. aurantifolia swingle*; donde destacan las ventajas de la extracción supercrítica, ya que se requieren solamente 2 horas de extracción para obtener extractos con una actividad citotóxica efectiva contra células de linfoma L5178Y, comparándolos con los extractos mediante solventes, donde para obtener la misma cantidad de extracto y con la misma actividad citotóxica, se requerirá de 12 horas más de extracción (6 horas para el desgrasado más las 8 horas de extracción), esto sin considerar el tiempo necesario de evaporación del solvente utilizado en la extracción, hasta sequedad.

4.4.CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó la factibilidad de llevar a cabo la extracción mediante CO₂ en estado supercrítico a partir de las semillas de *C. aurantifolia* para obtener un extracto con actividad citotóxica contra linfoblastos L5178Y. Además se encontró que la presión y la temperatura juegan un papel importante sobre la cantidad de extracto de semilla y de limonina, limonoide mayoritario, donde en términos de cantidad de extracto, el efecto de la presión es significativo, mientras que para la cantidad de limonina, la temperatura es el factor que afecta su contenido en el extracto. Esto es importante porque permite entonces diseñar un proceso que aumente el contenido de limonina, porque este limonoide además de ser el mayoritario en los cítricos, es principal responsable de las actividades biológicas que este tipo de compuestos presentan.

Con la finalidad de comparar la extracción con fluidos supercríticos, con la extracción mediante solventes, fue necesario optimizar esta última evaluando los factores importantes, tipo de solvente y tiempo de extracción, encontrándose que tiempos cortos de extracción, y metanol o acetona como solventes se recomiendan para la obtención de limonoides a partir de semillas de *C. aurantifolia swingle* con una actividad citotóxica significativa, pero la extracción mediante CO₂ supercrítico resultó más eficiente en tiempo de proceso para la obtención de extractos, mismos que presentaron la misma citotoxicidad contra células de linfoma L5178Y, requiriendo únicamente 2 horas para su extracción.

Para la obtención de extractos mediante CO₂ supercrítico, se recomienda utilizar una presión de proceso de 44.2 MPa y una temperatura de proceso de 333 K, con el fin de maximizar el rendimiento de extracto crudo con la mayor cantidad de limonina a partir de semillas de *C. aurantifolia swingle*, y

para que estos extractos presenten una actividad citotóxica importante ($IC_{50} = 8.5 \mu\text{g/mL}$) contra células de linfoma L5178Y.

BIBLIOGRAFÍA

- Balestrieri E., F. Pizzimenti, A. Ferlazzo, S. Giofrè, D. Iannazzo, A. Piperno, R. Romeo, M. Chiacchio, A. Mastino, B. Macchi, (2011), "Antiviral activity of seed extract from *Citrus bergamia* towards human retroviruses", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, Vol. 19, 2084–2089.
- Benelli P., C. Riehl, A. Smania, E. Smania, S. Ferreira, (2010), "Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition", *J. of Supercritical Fluids*, Vol. 55, 132–141.
- Bhimanagouda P., G. Jayaprakasha, M. Chidambara, A. Vikram, (2009), "Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities and challenges", *J. of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 57, 8142–8160.
- Breksa A., P. Ibarra, (2007), "Colorimetric method for the estimation of total limonoid aglycones and glucoside contents in citrus juices", *J. of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 55, 5013–5017.
- Chen Y., X. Xie, X. Gong, (2007), "Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*". *J. of Food Engineering*, Vol. 81, 162–170.
- Dandekar D., G. Jayaprakasha, P. Bhimanagouda, (2008), "Hydrotronic extraction of bioactive limonin from sour orange (*Citrus aurantium* L.) seeds", *Food Chemistry*, Vol. 109 (3), pp. 515–520.
- De Melo Marcelo M., H. Barbosa, C. Passos, C. Silva, (2014), "Supercritical fluid extraction of spent coffee grounds: measurement of extraction curves, oil characterization and economic analysis", *Journal of Supercritical Fluids*, Vol. 86, 150–159.
- Gerolino, E. (2015), "Evaluation of limonoid production in suspension cell culture of *Citrus sinensis*" *Revista Brasileira de Farmacognosia*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.008>
- Giannuzzo A., H. Boggetti, M. Nazareno, H. Mishima, (2003), "Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of *Citrus paradisi*", *Phytochemical Analysis*, Vol. 14-4, 221–223.
- Hamdan D., M. Zaki-El-Readi, A. Tahrani, F. Herrmann, D. Kaufmann, N. Farrag, A. El-Shazly, W. Michael, (2011), "Chemical composition and biological activity of *Citrus jambhiri* Lush", *Food Chemistry* Vol. 127, 394–403.
- Herrero M., J. Mendiola, A. Cifuentes, E. Ibáñez, (2010) "Supercritical fluid extraction: recent advances and applications," *J. of Chromatography A*, Vol. 1217-16, 2495–2511.

- Hsu R., B. Lin, C. Chen, (2001) "The Study of Supercritical Carbon Dioxide Extraction for *Ganoderma lucidum*", Industrial and Engineering Chemistry Research Vol. 40-20, 4478-4481.
- Jaiprakash P., G. Jayaprakasha, M. Chidambara, B. Mahadev and P. Bhimanagouda, (2010) "Characterization of *Citrus aurantifolia* bioactive compounds and their inhibition of human pancreatic cancer cells through apoptosis", J. Microchemical Vol. 94, 108–117.
- Jaiprakash P., M. Chidambara, G. Jayaprakasha, C. Mahadev and P. Bhimanagouda, (2009) "Bioactive compounds from Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) juice induce apoptosis in human pancreatic cells", J. of Agriculture and Food Chemistry, Vol. 57, 10933–10942.
- Jayaprakasha G., D. Dandekar, S. Tichy, P. Bhimanagouda, (2011) "Simultaneous separation and identification of limonoids from citrus using liquid chromatography-collision-induced dissociation mass spectra", J. of Separation Science, Vol. 34, 2–10.
- Jinhee Kim, G. Jayaprakasha, M. Muthuchamy, P. Bhimanagouda, (2011) "Structure–function relationships of citrus limonoids on p38 MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells", European J. of Pharmacology, Vol. 670, 44–49.
- Jinhee Kim, G. Jayaprakasha, R. Uckoo, P. Bhimanagouda, (2012), "Evaluation of chemopreventive and cytotoxic effect of lemon seed extracts on human breast cancer (MCF-7) cells", Food and Chemical Toxicology, Vol. 50, 423–430.
- Khan M., Zill-E-Huma, O. Dangles, (2014) "A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols", J. of Food Composition and Analysis, Vol. 33, 85–104.
- Kotamballi N., M. Chidambara, G. Jayaprakasha, K. Vinod, R. Keerti, P. Bhimanagouda, (2011), "Citrus limonin and its glucoside inhibit colon adenocarcinoma cell proliferation through apoptosis", J. of Agriculture and Food Chemistry, Vol. 59, 2314–2323.
- Langeswaran K., S. Gowthamkumar, S. Vijayaprakash, R. Revathy, M. Balasubramanian, (2013) "Influence of limonin on Wnt signalling molecule in HepG2 cell lines". J. of Natural Science, Biology and Medicine, Vol. 4, 126–133.
- Langeswarana K., A. Jagadeesan, R. Revathy, M. Balasubramanian, (2012) "Chemotherapeutic efficacy of limonin against Aflatoxin B1 induced primary hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats", Biomedicine and Aging Pathology, Vol. 2, 206–211.
- Liu J., C. Liu, Y. Rong, L. Rong, (2012), "Extraction of mogrosin and limonin with different extraction methods and its modeling", International J. of Food Engineering 8,2, Online article doi:10.1515/1556-3758.2361.

- Manners G., (2007) "Review of citrus limonoids: analysis, bioactivity and biomedical prospects", J. of Agriculture and Food Chemistry, Vol. 55, 8285–8294.
- Miller E., R. Gibbins, S. Taylor, J. McIntosh and P. Bhimanagouda, (2000), "Long-Term Screening Study on the Potential Toxicity of Limonoids", Chapter 6, In: M. Berhow, S. Hasegawa and Manners G. (Editors), Citrus Limonoids, In: American Chemical Society Series Volume 936 82–94, ISBN13: 9780841239579
- Navarro M. Tomás, F. Vallejo, F. Tomás-Barberán, (2014), "Bioavailability and Metabolism of Citrus Fruit Beverage Flavanones in Humans", In: R. Watson, V. Preedy, S. Zibadi (Editors). Polyphenols in Human Health and Disease, Elsevier, Inc., 537–551 online article DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00040-2>
- Poulouse S., G. Jayaprakasha, M. Richard, G. Basavaraj, P. Bhimanagouda, (2007) "Purification of citrus limonoids and their differential inhibitory effects on human cytochrome P450 enzymes", J. of the Science of Food and Agriculture, Vol. 87, 1699–1709.
- Rai A., K. Punase, B. Mohanty, R. Bhargava, (2014) "Evaluation of models for supercritical fluid extraction", International J. of Heat and Mass Transfer, Vol. 72, 274–287.
- Russo M., I. Bonaccorsi, G. Torre, M. Sarò, P. Dugo, L. Mondello, (2014) "Underestimated sources of flavonoids, limonoids and dietary fibre: availability in lemon's by-products", J. of Functional Foods, Vol. 9, 18–26.
- Shortle E., J. Kerry, A. Furey, D. Gilroy, (2013), "Optimisation of process variables for antioxidant components from *Crataegus monogyna* by supercritical fluid extraction (CO₂) using Box–Behnken experimental design", J. of Supercritical Fluids, Vol. 81, 112–118.
- Sovova H., (2012), "Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times", J. of Supercritical Fluids, Vol. 66, 73–79.
- Ueno H., M. Tanaka, S. Machmudah, M. Sasaki, M. Goto. (2008) "Supercritical carbon dioxide extraction of caluable compounds from *Citrus junos* seed", Food and Bioprocess Technology, Vol. 4, 357–363.
- Vadehtin B.y K. Vahit, (2010) "Biochemical and physiological evaluations of limonoids as potencial cancer destroyers", J. of Animal and Veterinary Advances, Vol. 7, 1099–1107.
- Vikram A., G. Jayaprakasha, P. Bhimanagouda, (2007) "Simultaneous determination of citrus limonoid aglycones and glucosides by high performance liquid chromatography", Analytica Chimica Acta, Vol. 590, 180–186.

- Yu J., (2004) "Citrus Limonoids And Flavonoids: Extraction, Antioxidant Activity And Effects On Hamster Plasma Cholesterol". Ph.D. Thesis, Texas A&M University. Available at: <http://hdl.handle.net/1969.1/2772>.
- Yu J., D. Dandekar, R. Toledo, R. Singh, P. Bhimanagouda. (2007) "Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds," Food Chemistry, Vol.105-3, 1026-1031.
- Zaki M., D. Hamdan, N. Farrag, A. El-Shazly, M. Wink, (2010) "Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from citrus species in human colon and leukaemia cell lines," European Journal of Pharmacology, Vol. 626, 139–145.

CAPÍTULO CINCO

CONCLUSIONES

5.1.CONCLUSIONES

En esta tesis se presentaron dos procesos que permiten el aprovechamiento de semillas de cítricos para la obtención de bioactivos que pueden ser utilizados en el desarrollo de alimentos nutraceuticos. Especificamente, el desarrollo de dos procesos de obtención de extractos de limonoides, el análisis de su composición y los ensayos biológicos para validar su actividad citotóxica.

El desarrollo de esta tesis se centró en la evaluación de los procesos de extracción, tanto por metodologías tradicionales, como innovadoras pudiendo determinarse los niveles de los factores que benefician la actividad citotóxica, por lo que las siguientes conclusiones específicas se derivan de los resultados presentados en esta tesis.

5.1.1. Extracción mediante solventes

Durante la extracción con solventes se encontró que los limonoides contenidos en los extractos son sensibles al tipo de solvente utilizado para su extracción, y además dependen del tipo de semilla de cítrico que se utilice. En esta tesis se compararon tres tipos de semilla de *C. sinensis*, *C. reticulata* y *C. aurantifolia swingle*, siendo las semillas de este último las que mayor rendimiento de limonoides tuvieron, y las que mayor actividad citotóxica mostraron.

Una de las contribuciones que se lograron con la realización de esta tesis, fue la optimización del proceso en función a la actividad citotóxica, contando con alternativas que coadyuven en el aprovechamiento de subproductos del procesamiento de cítricos, es decir, se cuenta con el conocimiento y los parámetros de operación relevantes para procesar semillas de cualquiera de estos tres cítricos (*C. sinensis*, *C. reticulata* y *C. aurantifolia swingle*) en función de maximizar tanto su rendimiento como su actividad biológica.

Por ejemplo, si tuviéramos como subproductos semillas de *C. reticulata*, se recomienda una extracción con metanol durante 5 horas de extracción para tener una actividad citotóxica importante contra linfoblastos de L5178Y; pero, si por otra parte tuviéramos semillas de *C. sinensis*, entonces recomendaríamos realizar la extracción durante 8 horas pero utilizando ahora acetona como solvente. El caso particular fue *C. aurantifolia swingle*, ya que los factores de tiempo de extracción y tipo de solvente no afectaron su actividad citotóxica, por lo que se recomendarían tiempos cortos de extracción y cualquiera de los dos solventes para obtener un extracto a partir de sus semillas con una actividad citotóxica importante, incluso más importante que los obtenidos a partir de *C. sinensis* y *C. reticulata*.

5.1.2. Extracción mediante fluidos supercríticos

Con base en los resultados obtenidos de la extracción con solventes, se decidió evaluar la semilla que mostró el mayor potencial citotóxico, con el objetivo de potenciar aún más los beneficios de estos bioactivos mediante la extracción con dióxido de carbono en estado supercrítico, por lo que entonces se utilizaron sólo las semillas de *C. aurantifolia swingle*.

Durante la extracción con fluidos supercríticos, se logró entender el efecto que ejercen la presión de proceso y la temperatura de extracción sobre el contenido de limonoides, y con base en los resultados

obtenidos, podríamos vislumbrar que las características de solubilidad a las condiciones utilizadas en esta investigación, se aproximan en cierta medida a las obtenidas con la acetona, debido a los contenidos similares de limonina que se encontraron, y además la actividad citotóxica que se logró tanto en los extractos con solventes como en los supercríticos, fue muy similar, sólo que los extractos con dióxido de carbono en estado supercrítico presume las ventajas de esta tecnología.

Finalmente, podemos decir que con el trabajo realizado en esta investigación, y gracias al entendimiento de la solvatación de los limonoides en los diferentes procesos de extracción desarrollados, se logró desarrollar una alternativa de aprovechamiento para las semillas que se desperdician actualmente. Así, los extractos de limonoides pueden ser considerados como ingredientes nutraceuticos y contribuir en el desarrollo de diferentes productos en beneficio de las industrias alimentaria y farmacéutica principalmente.

5.2.PERPECTIVAS

Como perspectivas de esta investigación, éstas se presentan en varias vertientes destacando por razones obvias las involucradas con la actividad citotóxica, y en el sentido de que como se mencionó en el capítulo 1, el cáncer es una enfermedad compleja, por lo que habría que continuar con las evaluaciones biológicas. En un inicio, evaluando el efecto de estos extractos en células “normales”, y enseguida ya en un modelo animal inducido con este tipo de padecimiento, con la finalidad de estudiar el comportamiento de estos extractos en modelos *in vivo*, para así validar su efecto. También, en este sentido sería conveniente evaluar el efecto citotóxico de estos extractos en diferentes líneas celulares cancerígenas, representativas de las neoplasias malignas más comunes en México.

Al contar ya con parámetros de proceso para la obtención de extractos bioactivos de semillas de cítricos, sería relevante explorar las actividades que los limonoides presumen en el desarrollo de productos que coadyuven en la solución de problemas actuales del país, como la necesidad de microbicidas naturales y bioplaguicidas eficientes.

También sería importante entender cómo sería la incorporación de estos extractos en un alimento, y verificar la estabilidad de los limonoides durante el procesamiento del mismo, para validar el contenido nutraceutico y presumir su beneficio en la salud.

ANEXO I. CURVA DE CALIBRACIÓN

Preparación de la curva de calibración

Se preparó a partir de una solución madre de 2 ml de acetonitrilo con una concentración de 0.5 mg de limonina/ml, de la cual se tomó 1ml y se hicieron 5 diluciones consecutivas 1:2 para obtener 6 estándares con las siguientes concentraciones 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625 mg limonina/ml.

En la **Tabla A.1** se muestran las áreas correspondientes integradas por el **software** del HPLC.

Tabla A.1 Concentración de los estándares y su respectiva área.

| Mg de limonina / ml | Área (μ V/seg) |
|---------------------|------------------------|
| 0.5 | 14806995 |
| 0.25 | 10216389 |
| 0.125 | 3537600 |
| 0.0625 | 1553903 |
| 0.03125 | 506639 |
| 0.015625 | 134523 |

A continuación se graficó la concentración del estándar contra el área integrada y se obtuvo la siguiente gráfica:

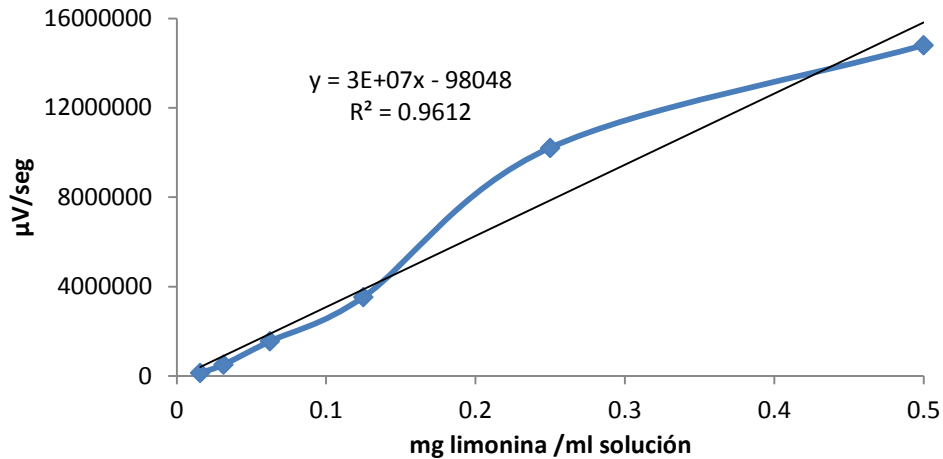


Figura A.1 Curva de calibración.

Como se muestra en la **Figura A.1**, la segunda dilución (0.25 mg lim/ml) se sale significativamente de la línea de tendencia, además de que ese estándar antes de ser introducido al HPLC presentó diferencias evidentes en volumen en comparación con las demás diluciones. Por lo que decidió quitarlo del ajuste y se obtuvo la gráfica siguiente:

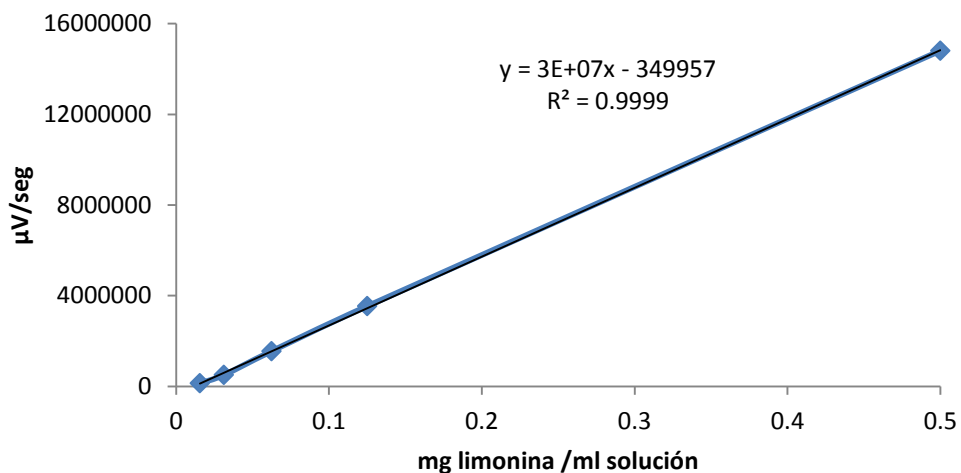


Figura A.2 Curva de calibración corregida.

La **Figura A.2** demuestra que se obtiene un ajuste mucho mejor que el anterior. De aquí que para la estimación de concentraciones a partir de las áreas de las curvas se utilizó la siguiente correlación:

$$x = \frac{y + 349957}{3 \times 10^7}$$

Con:

x= concentración de limonina en mg/ml de solución

y= área del pico

ANEXO II. CROMATOGRAMAS: ESTÁNDARES Y MUESTRAS

A continuación se anexan los cromatogramas de cada una de las corridas que pudieron ser analizadas mediante la técnica de HPLC junto con los datos arrojados por el software de análisis.

