

## **Cuantificación de flavonoides (Catequinas) en cáscara de naranja variedad criolla (*Citrus sinensis*) producida en Norte de Santander**

### ***Quantification of flavonoids (catechins) in native orange peel (*Citrus sinensis*) produced in North of Santander***

**Rangel G. Adriana P.**

*Facultad de Ingenierías y Arquitectura, Departamento de alimentos, Universidad de Pamplona, Pamplona, Norte de Santander, Colombia.*

Recibido 8 de Febrero 2010; aceptado 14 de Abril 2010

#### **RESUMEN**

---

*De gran importancia es la cuantificación de los flavonoides presentes en la cáscara de naranja de variedad Criolla procedente de la región del Norte de Santander, representada por los municipios de Pamplonita, Cucutilla, Toledo y Pamplona y estimar el efecto de la zona de procedencia sobre el desarrollo de estos compuestos fenolicos en la misma variedad, como una alternativa de aprovechamiento. Para lo cual se adquirieron las muestras representativas de cada uno de los lugares de procedencia en la central de abastos de la ciudad de Pamplona, a las cuales se les evaluó la humedad y color inicial, posteriormente se sometieron a un proceso de secado y molienda para la obtención de harinas valorando sus características fisicoquímicas como humedad, color, ceniza y grasa, posterior a ello se realizó la cuantificación de flavonoides totales con el método de espectrofotometría empleando ácido gálico como patrón a una longitud de onda de 320 nm, estableciendo además una comparación con el contenido de flavonoides totales determinados en la naranja de variedad Valenciana. Se identificó que las zonas de procedencia si inciden directamente sobre el desarrollo de los flavonoides totales en las cáscaras de las naranjas de la variedad criolla, siendo significativa la cantidad determinada en la naranja*

\*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. E-mail: adri17@hotmail.com

de variedad Criolla proveniente del municipio de Pamplonita, sin embargo presentó menor contenido en 65 mg equivalente de ácido gálico/100g con respecto a la variedad valenciana.

**Palabras clave:** flavonoides, naranja, color.

## ABSTRACT

---

*Of a great importance is the quantification of the flavonoids present in the native orange peel from the region of North of Santander, represented by the municipalities of Pamplonita, Cucutilla, Toledo and Pamplona and to estimate the effect of the area of origin on the development of these phenolic compounds in the same range, as an alternative use. For which representative samples were obtained from each of the places of origin in the supply center of the city of Pamplona, they were evaluated on the initial moisture and color, later they were subjected to a process of drying and grinding for obtaining flours, assessing their physicochemical characteristics such as moisture, color, ash and fat. After this, total flavonoids quantification was performed with the spectrophotometric method using gallic acid as a standard wavelength of 320 nm, also establishing a comparison with the content of certain total flavonoids in the Valenciana orange variety. The areas of origin were identified as directly affecting the development of the total flavonoids in the native orange peels, being significant the determined amount in the native orange of Pamplonita; however it showed a lower content equivalent to 65 mg of gallic acid/100g regarding to the Valenciana variety.*

**Keywords:** flavonoids, orange color.

## INTRODUCCIÓN

---

Los flavonoides son compuestos fenólicos sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 malonil-CoA que se originan a través de la combinación de la ruta del acetato y del sikimato, vías mediante las cuales se biosintetiza la estructura diaril-propanica (condensación de un triacetato que origina el anillo A y de un ácido cinámico que da lugar al anillo B), los cuales se encuentran como pigmentos vegetales ampliamente distribuidos en

la naturaleza producto del metabolismo de las plantas, encontrándose principalmente en las partes aéreas de estas, ya que necesitan de la luz del sol para sintetizarse, según Martínez (2005) tienen una estructura química muy definida como se muestra en la figura 3. Puede observarse que de manera general son moléculas que tienen dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencéni-

---

co tiene 6 átomos de carbono, denominados como compuestos C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>.

Estos compuestos tienen como características generales su solubilidad en agua y en etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados. Por regla general son insolubles en éter de petróleo, lo que permite desengrasar un material antes de extraerlos. Para realizar una clasificación preliminar se puede hacer un estudio de sus propiedades de solubilidad y de comportamiento ante reacciones de color, seguidamente se hace un examen cromatográfico del extracto, y la identificación de los componentes individuales por comparaciones cromatográficas y espectroscópicas con compuestos estándar o con la literatura.

Los solventes empleados en la extracción de flavonoides son muy variados y pueden ser desde muy polares como el agua y etanol para glicosidos o agliconas muy hidroxiladas, hasta menos polares como éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas. Es recomendable emplear una sucesión de dos o más solventes, usualmente en el orden lipofílico; por ejemplo: éter de petróleo, benceno, éter etílico, acetato de etilo, alcoholes y finalmente agua, aunque con el agua se presenta la desventaja de su alto punto de ebullición y presión de vapor que dificultan luego el ser removida rápida y completamente del extracto; por otro lado,

podrían ser extraídos otros compuesto de alto peso molecular que usualmente interfieren en las subsiguientes etapas de purificación del flavonoide Cano *et al* (2007).

Los flavonoides en general se extraen de muestras secas y molidas. La muestra se desengrasa inicialmente con éter de petróleo ó n-hexano, y el marco se extrae con etanol puro o del 70%. Este último es recomendado para garantizar la extracción de los más polares. El extracto obtenido se evapora con calentamiento no superior a los 50°C y se hacen particiones sucesivas con éter etílico, acetato de etilo y n-butanol. Los flavonoides apolares quedan en la fase etérea, los medianamente polares en la fase acetato de etilo y los más polares en el n-butanol. Cada una de estas tres fracciones se puede analizar por cromatografía en capa fina (CCF) y HPLC en fase reversa. Para el análisis por CCF de las agliconas se pueden utilizar mezclas n-hexano/acetato de etilo y cloroformo/acetato de etilo en diferentes proporciones, por ejemplo la mezcla cloroformo/acetato de etilo 60:40 utilizada por Wagner y col. para el análisis de drogas vegetales.

El objetivo de esta investigación fue cuantificar los flavonoides (Catequinas) en la cáscara de naranja criolla (*Citrus sinensis*) en Norte de Santander, determinándose si el lugar de procedencia influye en su contenido y si éste es representativo para futuras extracciones a nivel industrial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Inicialmente se seleccionó la naranja de acuerdo a su estado de madurez partiendo de la escala de color estándar representada por el grado de color 4. Seguidamente, fueron sometidas las naranjas a un flujo de agua corriente y se froto con el fin de eliminar todo material ajeno al producto.

### *Determinación de la humedad inicial de la cáscara de naranja variedad Criolla*

Para este análisis se emplearon tres gramos de la cáscara de naranja, los cuales se dispusieron en una balanza OHAUS a una temperatura de 105°C por un tiempo de una hora, registrándose el porcentaje de humedad presente en la muestra. Este procedimiento fue realizado en cada una de las muestras frescas de los cuatro lugares de procedencia por triplicado.

Se evaluó el color de las cáscaras de naranja variedad Criolla de los diferentes lugares de procedencia, con el objeto de evaluar la intensidad en los pigmentos en dichas muestras.

Para ello, se valoró el color de la superficie (cáscara) de las naranjas aun enteras, por duplicado, empleándose un espectrocolorímetro de esfera X-RITE SP 60, el cual cuantifica numéricamente el color de un alimento. Se trabajó con un espacio de color CIEL\*a\*b\*, iluminante D65, observador 10° y componente especular excluido (CIE, 1976).

### *Cuantificación de los flavonoides totales presentes en las cáscaras de naranja de la variedad criolla*

Por lo general, los flavonoides se extraen de muestras previamente secas y mo-

lidas (Martínez, 2005), por lo cual se hace necesario inicialmente realizar un proceso de adecuación que permita el análisis de los metabolitos a estudiar, similar a lo realizado por Moreno en el 2004 y 2007.

### *Adecuación de la cáscara de naranja variedad criolla*

A las naranjas previamente seleccionadas y adecuadas, se le realizaron dos cortes de forma manual; uno de forma transversal y el otro longitudinal, obteniendo de ello cuatro partes de la cáscara, las cuales se separaron cuidadosamente de la pulpa de la fruta, pesando cada uno de estos materiales, conservando aun parte del albedo en las cáscaras retiradas. Posteriormente, se adecuaron las cáscaras obteniéndose tajos de un (1) centímetro transversal aproximadamente, con el fin de facilitar la etapa de secado, previamente se tomaron 3 gramos de la cáscara de naranja en fresco para determinar la humedad inicial del material, previo al proceso de secado que se llevo a cabo en un túnel automatizado, empleando seis condiciones diferentes en las que se varió la temperatura de exposición en las muestras, no mayor a 60°C (Martínez, 2005) y la velocidad del aire, las cuales se describen en la tabla 1.

Tabla 1  
Condiciones de temperatura y velocidad del aire en el túnel de secado

Condiciones	Temperatura (°C)	Velocidad del aire (m/s)
1	50	4
2	50	5
3	50	6,5
4	60	4
5	60	5
6	60	6,5

Las cáscaras de naranja se mantuvieron al interior del túnel hasta obtener la humedad

final (6% aproximadamente) requerida en el producto deshidratado, según Moreno (2004), por ende durante el tiempo de secado de las cáscaras de naranja se evaluó el porcentaje de humedad en un intervalo de media hora, con el objetivo de establecer el tiempo en el cual se debían exponer en el túnel de secado hasta obtener la humedad anteriormente mencionada.

Las cáscaras secas fueron sometidas a la molienda manual a partir de un molino de tornillo sin fin. La harina obtenida fue almacenada a temperatura ambiente en frascos ámbar, tapados herméticamente y protegidos de cualquier incidencia de luz, hasta el momento de su utilización para los diferentes análisis considerados.

Con las muestras obtenidas de cada uno de los ensayos se procedió a realizar la cuantificación e identificación de los flavonoides totales, con el fin de establecer la condición que permitiera la mayor extracción para la posterior cuantificación en las harinas obtenidas de las cáscaras de las naranjas. Determinando que la condición en la que se obtuvo una mejor conservación de los flavonoides y cuantificación fue la condición 2 empleando una temperatura de 50°C y velocidad de 5 m/s con un tiempo de exposición de 3,5 horas, al interior del túnel de secado.

Se evaluó el color en las harinas obtenidas de las cáscaras de naranja variedad criolla de los diferentes lugares de procedencia con el objeto de observar si existe alguna relación de éste con respecto al contenido de flavonoides totales, ya que se trata de un pigmento colorante observable y representado en las cáscaras de la naranja.

En este caso, se valoraron las muestras aproximadamente 10 gr por duplicado, em-

pleándose un espectrocolimetro de esfera X-RITE SP 60, el cual cuantifica numéricamente el color de un alimento. Se trabajó con un espacio de color CIEL\*a\*b\*, iluminante D65, observador 10° y componente especular excluido (CIE, 1976).

Para la determinación de cenizas en la harina se siguió el método que se especifica en la normativa AOAC (1994), con modificaciones, realizando esta valoración por triplicado. La determinación de la grasa se llevó a cabo empleando éter de petróleo como disolvente, esta valoración se realizó por triplicado siguiendo el protocolo de la AOAC (1994).

Para esta evaluación se empleó además de la naranja variedad criolla, naranja variedad Valenciana, con el fin de tener un referente que ha sido objeto de estudios en cuantificación de flavonoides. (Escobar, 2010).

Para la extracción de los flavonoides presentes en las cáscaras de naranja se empleó el metanol como solvente ya que según Mercado *et al*, y Merida (2008), permite la obtención de un extracto con mayor concentración de los metabolitos.

Se empleó la metodología aplicada por Moreno *et al*, (2004), con algunas modificaciones en cuanto a las relaciones a emplear de harina: volumen de solvente, empleándose 1,0; 5,0 y 10 gramos de harina y dos volúmenes 10 y 25 ml de metanol al 85%. De estas relaciones se determinó emplear 10 gramos de harina en 25 ml de metanol al 85%, por ser esta bajo la cual se obtuvo la mayor proporción de metabolitos en ensayos previos.

Todas las extracciones se realizaron por triplicado, para cada una de las harinas obtenidas, las cuales se mantuvieron almacenadas durante 48 horas en ausencia de luz.

Seguidamente, los extractos fueron filtrados al vacío y lavados con metanol al 85% utilizando un volumen de 30 ml. Posteriormente, se adicionó éter de petróleo concentrado en una proporción v/v de 1:1 para agitar en un embudo de decantación hasta la aparición de dos fases igualmente definidas; una acuosa y otra orgánica. De cada una de estas fases se tomaron pequeñas cantidades para reconocer la presencia de flavonoides.

### ***Identificación cualitativa de flavonoides en la harina obtenida de cáscara de naranja de las variedades Criolla y Valenciana.***

De la obtención de las fases acuosa y orgánica, obtenidas previas a la rotaevaporación, se tomaron las pequeñas cantidades de cada una de las fases para reconocer la presencia de flavonoides mediante el test de Shinoda y álcali.

Se tomó una alícuota de 1 ml del extracto orgánico y 1 ml de extracto alcohólico y se dispusieron cada fase en un beaker añadiéndole a cada uno 1 ml de HCl (concentrado) y unas virutas de Mg, se dejó reaccionar hasta observar el viraje, identificando el grupo de flavonoides totales presentes teniendo en cuenta los cambios de color; (amarillo a rojo), flavanoles (rojo a magenta) flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo), isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

La fase que presentó el viraje, se concentró mediante un rotaevaporador a presión reducida de a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  y una velocidad de 90 rpm hasta un secado total de los extractos, el cual tardó 30 minutos para todas las muestras. Con el peso previo del balón de vidrio

empleado en el evaporador se determinó el peso final del extracto, el cual fue empleado para la cuantificación de flavonoides totales.

### ***Determinación de la longitud de onda para la valoración espectrofotométrica del contenido de flavonoides totales***

Para determinar la longitud de onda a la cual se realizó la lectura en el espectrofotómetro, se partió de una concentración de 150 ppm de ácido gálico, realizándose un barrido óptico entre 280nm a 510nm, identificándose la longitud de onda a la cual se representó el máximo pico dentro del espectro obtenido.

### ***Preparación de la curva patrón***

Se prepara según Yuarn Lin (2007) con modificaciones, empleándose una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/ml), para lo cual se tomaron 50mg de ácido gálico en un erlenmeyer de 100ml, llevándolo hasta el aforo con alcohol al 95%, del cual se partió para obtener las diferentes concentraciones mediante diluciones, aplicando fórmula de  $C_1V_1=C_2V_2$ , obteniendo de ello 400ppm, 300ppm, 200ppm, 100ppm y 50 ppm, para obtener la curva patrón.

### ***Cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría***

El contenido de flavonoides totales se determinó de acuerdo al método colorimétrico descrito por Lock (2006) con modificaciones, tomando alícuotas de 0,1 g de cada una de las muestras por triplicado en tubos de ensayo, disolviéndolas en 1 ml de agua destilada. Estas soluciones (0,5 ml) se mezclaron con 1,5 ml de alcohol al 95%, 0,1 ml de aluminio 10% hexahidratado ( $\text{AlCl}_3$ ), 0,1ml de acetato

de potasio al 1M y 2,8 ml de agua destilada. Posterior a ello, se incubaron en un cuarto a temperatura ambiente durante 40 minutos, seguidamente se tomó la medida a la longitud de onda previamente identificada.

Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por 100 g de muestra (mg ácido gálico/100g de muestra), obteniendo así la ecuación de la recta:

$$y = 73,75 X - 19,219 32$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1, se representan los porcentajes de humedad de cada una de las cáscaras frescas de las naranjas variedad criolla evaluadas, de la cual, se puede observar, que en el municipio de Pamplonita se produce naranja criolla cuya cáscara presenta un mayor porcentaje de humedad en relación a los demás municipios estudiados.

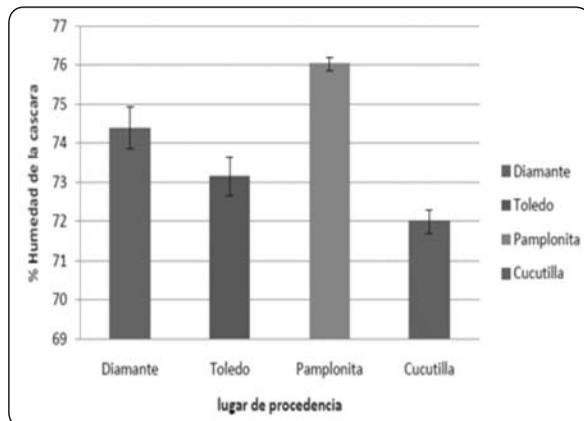


Figura 1. Contenido de humedad presente en las cáscaras de naranja fresca variedad Criolla

En la figura 2, se representan los resultados promedios de la luminosidad del color característico en las cáscaras de naranja variedad Criolla. Se puede identificar que las naranjas producidas en los diferentes municipios del departamento de Norte de Santander presentan una alta luminosidad, lo cual se puede relacionar con el tono del color amarillo-verdoso que caracteriza este producto frutícola.

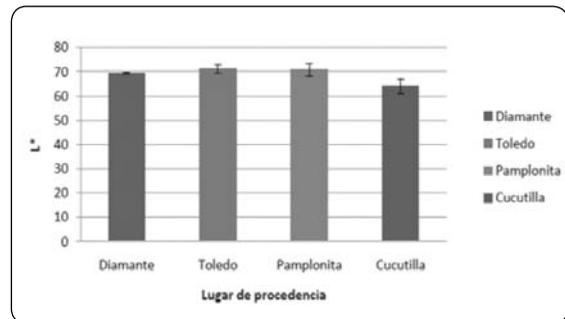


Figura 2. Resultados promedios de la luminosidad L\* del color evaluado en las cáscaras de naranja de variedad criolla.

Las cáscaras de las naranjas de variedad Criolla evaluadas, de la cual se aprecia que el tono amarillo varío en la superficie de las cáscaras de naranja procedentes de Toledo y Cucutilla (figura 3).

Los resultados de luminosidad presentados para las diferentes muestras de harina indican que en el municipio de Pamplona se obtienen naranjas que presentan colores más luminosos en relación a las otras poblaciones evaluadas. Esta luminosidad está relacionada con el croma que describe lo llamativo o lo apagado-sucio de un color, en otras palabras, que tan cerca está el color ya sea al gris o al matiz puro. Articulando este concepto colorimétrico con los resultados logrados, se tiene que la harina obtenida de las cáscaras de naranja provenientes de Pamplona es luminosa y por tanto tendrá una mayor representación en los tonos amarillo-verdoso (figura 12)

describiendo su color total como un color puro-.CIE(1976).

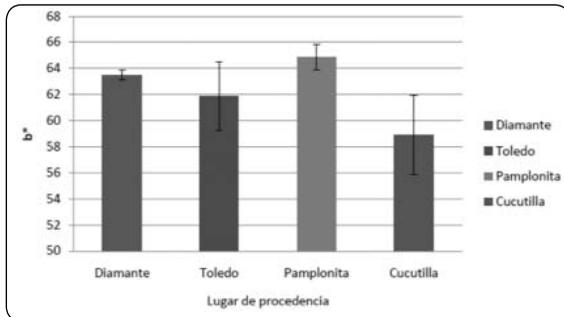


Figura 3. Resultados promedio del tono representado en el espacio cromatical b\* para las cáscaras de naranja variedad Criolla

El espacio cromatical rojo-verde (a\*) es representado en la figura 4, se tiene que el municipio de Pamplonita se producen naranjas con una mayor intensidad en el tono rojo con respecto a los demás lugares de procedencia estudiados.

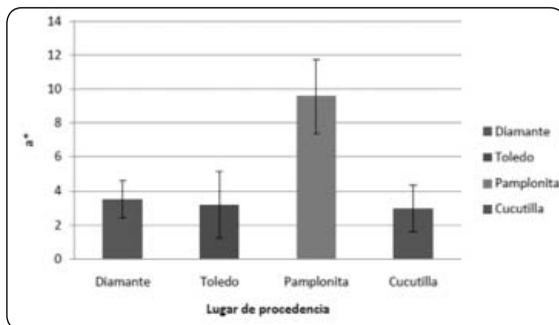


Figura 4. Resultados promedio del tono representado en el espacio cromatical a\* para las cáscaras de naranja variedad Criolla

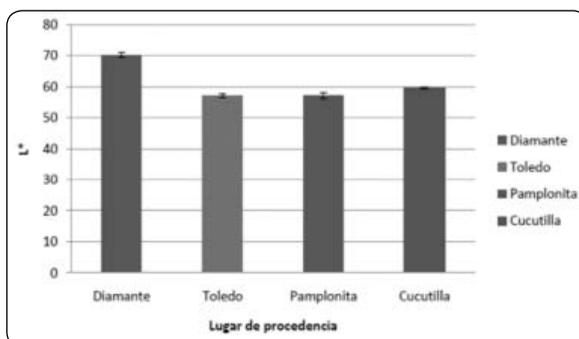


Figura 5. Resultados promedios de la luminosidad L\* del color evaluado en las harinas obtenidas de las cáscaras de naranja de variedad criolla

De acuerdo con los resultados del color, se tiene que la naranja procedente del municipio de Pamplonita es la que presenta una mayor pigmentación en el subproducto estudiado.

En la figura 6, se representa la cantidad de flavonoides totales (mg de ácido gálico/100g de muestra) presentes en cada una de las muestras evaluadas de harina obtenida de la naranja variedad Criolla, de los diferentes lugares de procedencia con respecto, a la muestra de variedad Valenciana tomada como Patrón.

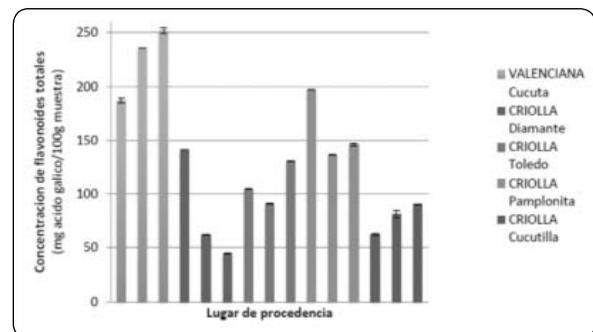


Figura 6. Contenido de flavonoides totales en las muestras evaluadas para cada lugar de procedencia de la cáscara de naranja variedad Criolla y de la variedad Valenciana.

Es conocido que los flavonoides se expresan en función de compuestos como catequina, quercetina, rutina y sus ácidos representativos, tal como es el caso del ácido gálico, ya que proviene de la hidrólisis de ésteres de flavonoides, como en el caso de la uva, éste ácido se presenta en forma de éster de flavonoles (Flanzy,2003), por ello es empleado por algunos autores como Almajano en el 2009 para la cuantificación de flavonoides totales.

A pesar de realizar la cuantificación de flavonoides totales por triplicado se presenta gran desviación entre las mismas muestras, esto es debido a que los flavonoides son un

---

grupo de compuestos fenólicos que presentan gran variación estructural, según sea la clase de flavonoide al que pertenezcan, lo cual hace que la cuantificación de los metabolitos se dificulte. Por lo anterior, se podría corroborar de la identificación cualitativa la presencia de distintos subgrupos de flavonoides tal como las flavonas, flavanonas y flavanoles.

De acuerdo con lo obtenido, se comprueba que la naranja variedad valenciana es el material en el cual hay mayor concentración de flavonoides totales, tal y como lo expresa Moreno en el 2004, resultados que difieren

significativamente, de acuerdo con el análisis ANOVA y post hoc (DMS), con respecto a los encontrados en las harinas obtenidas de naranja variedad criolla. Sin embargo, al analizar los resultados de acuerdo con el lugar de procedencia, entre la misma variedad, se identifica que la mayor proporción de flavonoides totales se presenta en la naranja producida en el Municipio de Pamplonita, siendo esta estadísticamente diferente a la cantidad hallada en los municipios de Pamplona y de Cucutilla, en este último, es donde se obtienen naranjas con un menor contenido de estos metabolitos.

## CONCLUSIONES

---

La cáscara de naranja variedad Criolla que presenta mayor contenido de flavonoides totales es la producida en el municipio de Pamplonita, siendo menor su contenido en 65mg eq de ácido gálico/100g con respecto a la variedad Valenciana.

El lugar de procedencia incide sobre el

desarrollo de los flavonoides en las cáscaras de naranja de variedad Criolla, favoreciendo en mayor medida la cantidad de metabolitos desarrollados en la muestra procedente de Pamplonita, sin embargo la proporción obtenida no es significativa para extracción a nivel industrial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AOAC., Official Methods of Analysis of the AOAC. Ed. W. Horowitz, 17th ed Association of Analytical Chemists, Maryland USA.

Abril Diaz, Nieves. et al. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Campus universitario de Rabanales. Facultad de Medicina. Disponible en: [http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf](http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf). [Citado:08/11/09].

Cano Morales, Telma. et al. Estudio tecnológico sobre los tintes naturales extraídos de la corteza de tres especies forestales cultivadas en Guatemala, Para teñir fibras naturales que cumplan con especificaciones de calidad exigidas por el Mercado. Guatemala, 2007, Trabajo de grado de Investigación. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Delgado Londoño Diana. Presencia de flavonoides y metales pesados en el suelo, aplicando residuos agroindustriales biotransformados de la caña de azúcar "*Saccharum officinarum*" y el plátano "*Musa spp.*" Palmira, 2008, Trabajo de grado (Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en suelos). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias.

Martinez, Alejandro. Flavonoides. Medellín, 2005,. Universidad de Antioquia, Facultad de química farmacéutica.

Moreno Alvarez, Mario. et al. Efecto de los extractos de flavonoides de harinas de s y semillas de pomelos sobre la estabilidad de aceite de soja. Carabobo. En: Grasas y aceites. Vol 58, No.4 ( 2007).

Moreno Alvarez, Mario.et al. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flavonoides de de naranja en el aceite de soja desodorizado. En: *INCI* [en línea], vol.29. No.9 (2004), 532-538p.Disponible en:

<[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442004000900011&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004000900011&lng=es&nrm=iso)>. [Citado:08/10/09].

Tardon Laura..¿Protege el chocolate de los rayos solares?. 2009 Disponible en: <<http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=62008>> [Citado:22/10/09].

Yuarn, Lin. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation". En: *Food Chemistry* [en línea]. Vol.101, No1 (2007); Disponible en: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&). [citado:12/10/10].