

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA TOXICIDAD DEL ZUMO DE *Citrus sinensis* L.

Solís Salas L^a, Silva Belmares S*, Belmares Cerda R^a, Cruz Hernández M^b, Guzmán Ceferino J^a.

a Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Investigación en Alimentos Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas. A.P. 935, C.P. 25280, Saltillo, Coahuila, México. *yesenia_silva@hotmail.com.

b Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Blvd. Antonio Narro s/n, Buenavista. C.P 25315. Saltillo, Coahuila, México.

RESUMEN

Citrus sinensis L., es una planta cultivada en México, como alimento para humano, donde el epicarpio es desechado, durante el proceso de elaboración comercial para la elaboración de su jugo, generándose desechos en grandes toneladas. El epicarpio contiene una gran variedad de compuestos químicos con propiedades tales como la antioxidante, así como efectos antimicrobiano, antineoplásico, inmunomodulador y antiinflamatorio, sin embargo no se cuenta con reportes de su toxicidad. *Artemia salina* es un crustáceo empleado como modelo biológico, para evaluar toxicidad de una gran variedad de estructuras químicas con potencial nutraceutico. Por lo que en este trabajo se propuso como objetivo evaluar la toxicidad preliminar del zumo de epicarpio de *C. sinensis* L., sobre nauplios de *A. salina*, además de una caracterización química preliminar de su composición. Los métodos empleados fueron el de microdilución en placa de 96 pozos, y la caracterización química se realizó por medio de análisis químico cualitativo, empleando pruebas específicas para cada compuesto. Los resultados de la prueba con *A. salina* del extracto de epicarpio de *C. sinensis* obtenido por prensado, presentaron una CL₅₀ de 2.4 ± 0.3 ppm. El análisis cualitativo de la composición química, mostró la presencia de insaturaciones, sesquiterpenlactonas, lactonas, alcaloides y carbohidratos.

ABSTRACT

Citrus sinensis L., is a plant grown in Mexico, as food for humans, of which the epicarp is discarded during commercial processing for juice processing, generating large waste in tons. The epicarp contains a variety of chemical compounds with properties such as antioxidant, and antimicrobial, antineoplastic, immunomodulatory and anti-inflammatory effects, however there is no reports of toxicity. The crustacean *Artemia salina* is used as a biological model for evaluating toxicity of a great variety of chemical structures with nutraceutical potential. As proposed in this paper aims to evaluate the preliminary toxicity juice epicarp *C. sinensis* L. on *A. salina* nauplii, and a preliminary chemical characterization of its composition. The methods used were, the microdilution 96 well plate, and the chemical characterization was done by qualitative chemical analysis, using specific tests for each compound. The results of the test with *A. salina*, by the epicarp extract of *C. sinensis* L. obtained by pressing, CL₅₀ showed a 2.4 0.3 ± ppm. The qualitative analysis of the chemical

composition, showed the presence of unsaturation, sesquiterpenlactones, lactones, alkaloids and carbohydrates.

Palabras clave: Aceite, Naranja, *Artemia salina*.

Área: Microbiología y Biotecnología.

INTRODUCCIÓN

La naranja es un fruto originario de China y uno de los más populares en México, conformada por once gajos los cuales suelen ser de sabor agridulce, cubiertos por una cáscara (epicarpio) anaranjada con el interior blanco, la cual contiene numerosas glándulas llenas de aceites esenciales (Infante and Román, 2008). Existen diversas variedades, de las que podemos mencionar; Washington, Navel, Navelina, Salestiana, Valencia, entre otras. El principal productor de naranja del mundo es Brasil, y le siguen Estados Unidos, China y México, mientras que este último país su producción nacional es de 3,353,929 toneladas por año, siendo Veracruz el estado líder productor (SAGARPA, 2009). El principal consumo de la naranja es en fresco, (FAO, 2006), otras formas de consumo son la preparación de platillos. Otros usos pueden ser la ocupación de sus aceites esenciales en perfumería, como esencia y agente aromatizante (Geilfus, 1994). Dentro de sus propiedades medicinales se puede mencionar su empleo para la fiebre, flatulencias, espasmos gástricos, espasmos cardíacos, diarrea crónica, entre otros (Blanchfield *et al.* S/F).

La naranja tiene presente diferentes compuestos, de los cuales podemos destacar la vitamina C y A, mientras que químicamente se pueden encontrar; flavonoides, limoneno, valenceno, naringenina, aunque también cuenta con antioxidantes como β -caroteno (Romano *et al.*, 2013). Se han encontrado reportes en la literatura donde se ha utilizado la naranja por su efecto biológico, Bhnsawy *et al.*, en el 2012 reportaron el uso de la cáscara de naranja por su contenido antioxidante. Así mismo es una fuente de conservación natural, contando con propiedades antimicrobianas, la cual es otorgada por la presencia de flavonoides (Abe *et al.*, 2007). Existen reportes de estudios de sustancias fitoquímicas, los cuales son benéficos como quimiopreventivos en cultivos celulares *in vivo* (Bhimanagouda *et al.* 2011; Bala *et al.* 2011).

El método de *Artemia salina* es considerado un instrumento útil para la evaluación preliminar de toxicidad así como un bioensayo simple, rápido, económico, confiable y puede ser empleado por químicos que carecen de recursos para realizar bioensayos estándar (Abreu and col. 2001). Por la simplicidad del procedimiento se

utiliza para el monitoreo de toxicidad en extractos de plantas, así como en fraccionamientos biodirigidos (Borroto *et al.* 2011).

Debido a todo lo anterior es que se decidió trabajar con residuos de epicarpio de *Citrus sinensis* L., ya que son pocas las investigaciones con respecto a su caracterización química como de su efecto biológico, teniendo como objetivo en el presente trabajo el de extraer sus compuestos por prensado, evaluar el efecto biológico sobre nauplios de *Artemia salina*, e identificar sus principales compuestos fitoquímicos por análisis químico cualitativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los aceites

El extracto de epicarpio de *Citrus sinensis* L. (zumo), se obtuvo por prensado de forma industrial durante el proceso para la elaboración de jugo de naranja comercial, en la región de Álamo Temapache en el estado de Veracruz.

Análisis químico cualitativo

Se preparó una solución 1:10 del extracto de epicarpio obtenido por prensado con etanol, luego se colocaron 20 μ L de la muestra en placas de porcelana de doce pozos, posteriormente se agregaron 50 μ L, del reactivo correspondiente para determinar la presencia de cada compuesto. Se empleó la prueba de KMnO_4 para la identificación de insaturaciones, la prueba de FeCl_3 para oxidrilos fenólicos, Libermann-Buchard para esteroides y triterpenos, hidróxido de sodio para cumarinas, sesquiterpenos y lactonas, Baljet y Salkowski para saponinas, Shinoda para flavonoides y lactonas, bicarbonato de sodio para el grupo carboxilo, Dragendorf y Wagner para alcaloides, Molisch y antrona para carbohidratos. Estas pruebas se realizaron por triplicado.

Evaluación de la toxicidad sobre *Artemia salina*

El bioensayo de *Artemia salina* se llevó a cabo en condiciones óptimas de temperatura (25°C), aireación e iluminación. Para la eclosión de los nauplios, se empleó agua de mar artificial a 37g/L. El efecto citotóxico del extracto de epicarpio de *Citrus sinensis* L., se evaluó sobre nauplios de 24 horas de *A. salina*, mediante microdilución en microplacas de 96 pozos, se emplearon 10 nauplios por pozo y se probaron sobre ellos disoluciones de 1000, 500, 250, 100 y 50 ppm del extracto de epicarpio de *Citrus sinensis* L., además se probó un control negativo con etanol y un control positivo con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a concentraciones de 25, 20, 15, 10 y 5 ppm. Los ensayos se realizaron por quintuplicado en eventos independientes y los resultados

se leyeron a las 24 horas, para así obtener el porcentaje de mortalidad y determinando la CL_{50} , por medio del análisis de regresión lineal simple, para el análisis estadístico de los resultados de la CL_{50} se empleó el programa Graph pad prism 6[®], mediante la prueba t de student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la prueba de toxicidad con nauplios de *A. salina*, revelaron una CL_{50} de 2.4 ± 0.3 ppm, para el extracto de epicarpio de *C. sinensis*, obtenido por prensado, el control negativo con etanol, no mostro efecto sobre este crustáceo, mientras que el control positivo de $K_2Cr_2O_7$ mostró una CL_{50} a la concentración de 13.9 ± 0.5 ppm.

Los resultados del análisis estadístico entre el control positivo y el negativo revelaron que no hay diferencia significativa para una $p \geq 0.05$, por lo que se considera que el extracto de epicarpio de *C. sinensis* L., es altamente tóxico, esto se apoya en el criterio empleado por Gualdrón *et al.* 1997. En lo que respecta a la CL_{50} del $K_2Cr_2O_7$ es similar a la reportada por González *et al.* 2001, por lo que se considera que los resultados de las CL_{50} obtenidos en este estudio son confiables. Los resultados de las pruebas químicas empleadas para el análisis cualitativo de la composición química, del extracto de epicarpio de *C. sinensis*, revelaron la presencia de insaturaciones, sesquiterpenlactonas, saponinas, lactonas, alcaloides y carbohidratos, los cuales se presentan en la tabla 1, (+) como presencia o ausencia (-). La presencia de carbohidratos en el zumo se confirmó de acuerdo a lo reportado por Rivas *et al.* 2008, la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, se corroboró de acuerdo a lo descrito por Jabri and Marzouk en el 2013, quienes reportaron la presencia de los ácidos p-cumárico y ferúlico. En la literatura no se encuentran reportes de la presencia de sesquiterpenlactonas, lactonas y alcaloides, compuestos que en otras plantas han mostrado efectos benéficos para la salud, por lo que podrían ser empleados para la formulación de algún producto nutracéutico. En cuanto a los flavonoides, se tienen reportes dl enecto anticáncer de compuestos presentes en el aceite de naranja tales como: apigenina, naringenina, y hesperidina, (Chan *et al.*, 2012).

Tabla1. Composición química y grupos funcionales identificados en el extracto de epicarpio obtenido por prensado.

Prueba química	Compuesto identificado	Resultado del extracto de <i>Citrus cinensis</i> L.
KMnO ₄	Insaturaciones	+
FeCl ₃	Oxidrilo fenólicos	-
Liebermann-Buchard	Esteroides y triterpenos	-
NaOH 10%	Cumarinas	-
Baljet	Sesquiterpenlactonas	+

Shinoda	Lactonas	+
Shinoda	Flavonoides	-
FeCl ₃ y Piridina	Grupo carboxilo	-
Dragendorf y Wagner	Alcaloides	+
Molsich y Antrona	Carbohidratos	+

Rivas *et al.* 2008 reportaron que los residuos de naranja tienen entre su composición química un contenido de 16.9 g de azúcares solubles, así como Jabri and Marzouk en el 2013, reportaron que en extractos metanólicos se encontraron compuestos fenólicos (p-cumárico y ferúlico) que representaron de un 71.25 a 73.80 %, seguido de flavonoides de un 23.02 al 23.13 %, de los cuales se ha reportado la evaluación quimiopreventiva de tres flavonoides presentes en los compuestos químicos del aceite de naranja apigenina, naringenina, y hesperidina, sobre el desarrollo del cáncer de mama (Chan *et al.*, 2012). El aceite y los extractos provenientes del epicarpio de naranja pueden utilizarse como materia prima para la extracción de compuestos de importancia en la salud humana, que puedan ser empleados en un mediano plazo a través de su consumo como alimento y/o suplemento alimenticio.

BIBLIOGRAFÍA

Abe S, Kun F, Chi- Tang H, Yang K. 2007. Chemopreventive effects of orange peel extract (OPE) II. OPE inhibits atypical hyperplastic lesions in rodent mammary gland. *Journal of Medicinal Food*. 10:18-24.

Abreu P, Martínez M, Toledo C, Castillo García, O. 2001. Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón). *Rev Cubana Farm*. 35:1.

Bala A, Gupta M, Haldar P, Kundusen S, Mazumder U, Saha P. 2011. Antitumor Activity of Citrus maxima (Burm.) Merr. Leaves in Ehrlich's Ascites Carcinoma Cell-Treated Mice. *Journal ISRN Pharmacology*. 20.

Bhnsawy E, El-Deeb, Fadl E. 2012. A Special Biological Evaluation for Some Food Industrial Wastes. *Life Science Journal*. 9:2241-2249.

Blanchfield D, Krapp K, Joryan C, Longe J. 2006. Enciclopedia de las medicinas alternativas. Editorial. OCEANO. Barcelona, España. pp. 1501.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2013 (. *FICHAS TÉCNICAS. Productos Frescos y Procesados*. <http://www.fao.org>

Geilfus F. 1994. El árbol al servicio del agricultor: Guía de especias. Costa Rica. Ed. Enda-Cáribes. Pp.287.

González P, Aportela P. 2001. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. Anuario Toxicología. 1:104-8.

Gualdrón R, López S, Sanabria A. 1997. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. Rev. Col. Quím. Farm. 26. 15:19.

Infante L, Román Y. 2008. Estudio Comparativo por Contenido de Calcio, Hierro, Fósforo, Potasio y Vitamina a en Diferentes Frutos Cítricos (Naranja, Limón, Mandarina y Toronja) Cultivadas en el Municipio Nirgua Estado Yaracuy. Tesis del Instituto Universitario de Tecnología de Valencia. Valencia, Venezuela. <http://es.scribd.com/doc/46865306/Tesis-de-Citricos>.

Jabri I, Marzouk B. 2013. Characterization of Bioactive Compounds in Tunisian Bitter Orange (*Citrus aurantium* L.) Peel and Juice and Determination of Their Antioxidant Activities. *Journal BioMed Research International*. 20:12

Rivas B, Torrado A, Torre P, Converti A, Domínguez J. 2008. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 56:2380–2387.

Romano B, Sieh N, Stefan T. 2013. Pulsed Electric Field Processing of Orange Juice: A Review on Microbial, Enzymatic, Nutritional, and Sensory Quality and Stability. *Reviews in food Science and Food Safety*. 12:455-467.

Sagarpa. (2009). Boletín ASERCA Regional Peninsular: "La Industria de la Naranja.com. <http://www.aserca.gob>.