

Extracción de licopeno a partir de residuos de jitomate por método con solventes

N.F. Irala-Rivera¹, F.C. Cruz-Casillas¹, G. Villanueva-Maciel^{1,4}, S. Ochoa-Zermeño¹ y M.J. Rivas-Arreola^{2,3}

1 Estudiante de la carrera Ingeniería en Biotecnología (IBT11) del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Campus Guadalajara. **2** Profesor Investigador del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Campus Guadalajara. **3** Responsable de Laboratorio. **4** gvillam27@gmail.com

RESUMEN: El licopeno es un carotenoide liposoluble responsable del color de algunas frutas y verduras. Se caracteriza por absorber la luz durante la fotosíntesis para proteger a la planta contra la fotosensibilización y además se le atribuyen cualidades como antioxidante, hipocolesterolémico y quimiopreventivo. Su aplicación como aditivo es de gran interés dentro de la industria. Sin embargo, debido al actual desarrollo de tecnologías sustentables, se ha buscado su obtención a partir del aprovechamiento de residuos alimentarios. El presente diseño experimental se llevó a cabo con la finalidad de identificar el efecto del solvente y tiempo de extracción en la obtención de licopeno a partir de residuos de jitomate, por el método de solventes. De esta forma, las variables modificadas fueron: solvente (etanol, hexano) y tiempo de extracción (5, 10 y 15 recirculaciones en Soxhlet); mientras que la variable de respuesta medida fue la concentración final del carotenoide. Los resultados reflejaron que fue posible obtener una mayor cantidad del licopeno a partir del uso de hexano después de 5 recirculaciones en el Soxhlet. De igual forma se comprobó la propiedad de los extractos como antioxidantes por medio de una prueba 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH), siendo el tratamiento con 15 reflujos del que se obtuvo un extracto con mayor actividad antioxidante.

Palabras clave: Antioxidante, extracción, licopeno.

ABSTRACT: Lycopene is a fat-soluble carotenoid responsible for the color of some fruits and vegetables. It is characterized by absorbing light during photosynthesis to protect the plant against photosensitization and is also attributed with qualities such as antioxidant, hypocholesterolemic and chemopreventive. Its application within the industry as an additive is of great interest. However, due to current development of sustainable technologies, it has been sought to obtain it from food waste. The present experimental design was carried out with the purpose of identifying the effect of the solvent and extraction time in the obtention of lycopene from tomato residues, by the solvent method. The modified variables were: solvent (ethanol, hexane) and extraction time (5, 10 and 15 recirculations in Soxhlet); while the response variable measured was the final concentration of the carotenoid. The results referred that it was possible to obtain a greater amount of lycopene from the use of hexane after 5 recirculations in the Soxhlet. In the same way, the extracts' property as antioxidants was confirmed by means of a 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) test, from which the treatment with 15 recirculations referred the extract with the highest antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant, extraction, lycopene.

Área: Aprovechamiento y valorización de subproductos

INTRODUCCIÓN

El jitomate es uno de los cultivos protagonistas de la agricultura alrededor del mundo, debido a que es posible cultivarlo bajo condiciones controladas en muchos países y a que forma parte de la gastronomía de diferentes culturas. México es el principal proveedor de jitomate a nivel mundial, con una aportación del 25.1% de la demanda, gracias a esto, la exportación de esta hortaliza ha llegado a representar el 3.46% del PIB agrícola nacional (SAGARPA, 2017). En el caso específico de México, anualmente se desperdician cerca de 925,000 toneladas de jitomate, que constituyen un 39.3% de la producción total (López, 2018). Por lo anterior, seguramente existirán cada vez más residuos a partir de este alimento y por tanto será necesario el desarrollo de tecnologías para su aprovechamiento.

Entre sus compuestos de interés, el jitomate contiene licopeno. Este compuesto está despertando interés en la industria por sus potenciales beneficios en la salud humana (Periago *et al.*, 2001). El

licopeno es un isómero del β -caroteno que carece de actividad provitamina A por no contar con el anillo de β -ionona en su estructura acíclica. Se encuentra en la naturaleza como un pigmento natural liposoluble responsable de la coloración de algunas frutas y verduras; así como de la protección de plantas ante la fotosensibilización (Cruz, González & Sánchez, 2013). Se ha comprobado su actividad como antioxidante y por tanto su utilidad en la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e hipertensión; para las cuales el estrés oxidativo es un importante factor etiológico (Waliszewski & Blasco, 2010).

El presente diseño experimental fue realizado con el objetivo de identificar el efecto del solvente y tiempo de extracción en Soxhlet en la obtención de licopeno, por su actividad como antioxidante, a partir de residuos de jitomate. Para lo anterior se tuvieron los objetivos específicos de determinar el tipo de solvente que optimiza la cantidad de licopeno extraído, como variable de respuesta; así como determinar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos, en comparación con una muestra de licopeno comercial.

Se concluyó que, en el caso de compuestos como el licopeno, es necesario tomar en consideración las condiciones que dentro del proceso de extracción comprometen la integridad de este, como lo son la temperatura y exposición a luz. El diseño experimental mostró que entre los solventes estudiados el hexano obtuvo una mayor concentración de licopeno después de cinco recirculaciones dentro del Soxhlet. Por otra parte, se validaron las propiedades antioxidantes del licopeno extraído por este proceso. El ensayo con el reactivo DPPH, permitió identificar el tratamiento con 15 recirculaciones como el que preservó en mayor medida la cualidad antioxidante del extracto de licopeno. Finalmente, el desarrollo y análisis del experimento planteado logró identificar las condiciones del proceso capaces de promover la obtención de mayores cantidades de un compuesto de interés conservando sus propiedades de relevancia para la industria.

MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso se inició con la obtención y preparación de la muestra. Se obtuvieron 500 g de jitomate fresco, a partir de residuos de jitomate generados en la cafetería del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Campus de Guadalajara. El pretratamiento de la muestra consistió en cortar los desechos de jitomate en rodajas de aproximadamente 0.5 cm de grosor y secar los trozos en horno (Heratherm ONS 60 Thermo Scientific ®) a 55 °C durante 24 horas. Posteriormente estos se trituraron con ayuda de un mortero (Cardona, Ríos & Restrepo, 2006).

La muestra previamente secada y triturada, se sometió a una extracción mediante un equipo soxhlet. Inicialmente, se utilizó un solvente fijo (hexano) y se variaron las recirculaciones: 5, 10 y 15, por lo que se realizaron tres extracciones diferentes para poder comparar el efecto de las mismas en el tratamiento. La extracción de 5 recirculaciones en hexano se realizó tres veces. Posteriormente, se fijaron las recirculaciones a 10 y se variaron los solventes (hexano y etanol) con la finalidad de comparar su efectividad y/o efecto en el rendimiento. Para lo anterior se utilizó una relación material vegetal/solvente de 10.0 g/ 200 ml, se cubrieron los equipos con papel aluminio para preservar las muestras de la luz y se manejó una temperatura menor a 60 °C, debido a que arriba de 60 °C el licopeno tiende a degradarse, por lo que se emplearon perlas de ebullición para lograr la ebullición de los solventes a una temperatura de 55 °C en el caso del hexano y 60 °C en el caso del etanol (Cardona, Ríos & Restrepo, 2006).

Se recurrió a la técnica de destilación para la obtención de oleoresina. El volumen obtenido de la extracción se llevó a ebullición con el mismo proceso descrito anteriormente (empleando perlas de ebullición y sin que la temperatura sobrepase los 60 °C), hasta que este disminuyó y llegó a ser de 15 ml aproximadamente, o en su defecto, hasta que dejó de gotear el solvente que se recupera mediante el condensador empleado. Posteriormente, se realizó la medición de licopeno. Se aseguró que las

muestras de oleoresina resultantes estuvieran a temperatura ambiente. Posteriormente, estas se diluyeron en proporción 1:600 para la de cinco recirculaciones y 1:100 para las de 10 y 15 recirculaciones, se blanqueó el espectrofotómetro (SmartSpec Plus de BioRad ®) según el solvente de la muestra (etanol o hexano) y se midieron todas las muestras por triplicado a una longitud de onda de 476 nm. La lectura de absorbancia fue usada para calcular rendimiento de cada muestra con la **Ecuación 1**. El valor de E para licopeno a 476 nm longitud de onda es 3310 (Cardona, Ríos & Restrepo, 2006).

$$\mu\text{g licopeno}/100 \text{ g de pulpa} = AV(\text{ml})10^4/Em(\text{g}) * 100 \text{ g (Ecuación 1)}$$

Para validar los resultados, se realizó un ensayo de colorimetría con una solución de 3.9 mg del reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), radical sintético, en 100 ml de metanol, para medir cualitativa y cuantitativamente el potencial antioxidante de la oleoresina mediante su cambio de color y densidad óptica, respectivamente. La prueba se realizó dos veces por triplicado para cada muestra obtenida. Las muestras se leyeron en el tiempo 0 y 30 minutos después, a una longitud de onda de 490 nm en un lector de microplacas para absorbancia / ELISA iMark BioRad ®. Se utilizó como referencia cápsulas de licopeno de 30 mg GNC ®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las oleoresinas resultantes de cada extracción presentaron una concentración de licopeno diferente debido a que se realizaron variando el número de recirculaciones para cada una. La primera réplica de la extracción de 5 recirculaciones con hexano obtuvo la mayor concentración a 9.206 mg de licopeno por 100 g de tomate pulpa.

El rendimiento máximo observado en este método, así como el tiempo que este requiere podría verse mejorado por medio de la implementación de otras técnicas de extracción y purificación. En primer lugar, el método de extracción de licopeno con solventes ha sido comparado en la literatura principalmente con el de asistencia ultrasónica. Si bien se han reportado mayores eficiencias con la segunda técnica, cuando ambas son llevadas a cabo con el mismo solvente, volumen de este y duración (Kumcuoglu, *et al.*, 2013), se conoce que la asistencia ultrasónica presenta inconvenientes relacionados con el volumen de solvente requerido y posibles daños a los componentes activos de la muestra empleada. A su vez, la separación por sonicación suele arrojar compuestos útiles en temas de fermentación, fabricación de antiespumantes e inactivación microbiana. En contraste, la extracción con solventes presenta una mayor adaptabilidad al enfoque del presente diseño experimental dado que se pretende que el licopeno aislado sea aprovechado por sus propiedades como antioxidante; facultad que se ve facilitada mediante este tipo de extracción, a pesar de la utilización de solventes que pueden resultar volátiles o con efectos tóxicos para quien realiza el estudio (Arsad, *et al.*, 2014).

Por otra parte, es posible que la eficiencia del método pudiera ser afectada por el primer método de purificación, realizado con destilación. En la literatura consultada se sugiere el uso de un rotavapor para esta etapa de la extracción. Sin embargo, debido a la disponibilidad del material se optó por realizar una destilación simple. La diferencia entre estas dos técnicas radica en que la destilación simple separa líquidos en una mezcla con base en la diferencia de sus puntos de ebullición. De esta forma, la temperatura se lleva hasta el punto de ebullición de uno de los líquidos, que después es condensado y recuperado. Por otra parte, la destilación al vacío con rotavapor iguala la presión atmosférica y la interna del sistema utilizado, volviendo posible la ebullición de un líquido a una temperatura menor. Este método es útil en el manejo de solventes volátiles y en la preservación de la integridad de un compuesto en la mezcla que puede degradarse con facilidad al estar expuesto a altas temperaturas (Universidad de Barcelona, s.f.), como es el caso del licopeno. Dado que se realizó una destilación simple, se utilizó una temperatura de alrededor de 60°C para favorecer la ebullición, lo que

dio como resultado una extracción lenta debido a que el hexano se encontraba por debajo de su temperatura de ebullición y un posible daño al licopeno, ya que este se degrada por arriba de los 60 °C.

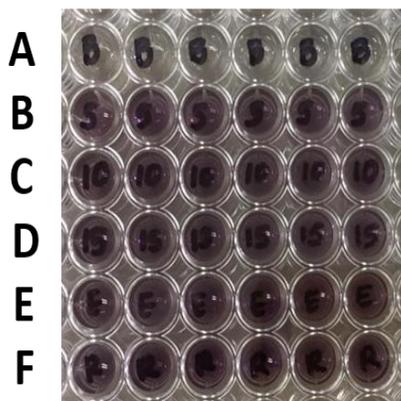


Figura 1. Solución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) en microplaca. Donde el blanco B (Fila A) corresponde a metanol sin DPPH, y el resto de los pozos sí contienen el radical (solución DPPH-metanol).

Asimismo, los resultados obtenidos del ensayo de colorimetría indicaron que las muestras de licopeno obtenidas sí contaban con un potencial antioxidante debido a que hubo un cambio de color de la solución radical empleada al entrar en contacto con estas. En la Figura 1 se puede observar la microplaca utilizada con la solución de metanol-DPPH, previo a la colocación de las muestras de licopeno.

En la figura 2 se observa un vire de color de morado intenso a amarillo en B, C, D, E, G y H, y rosa tenue en I, esto quiere decir que hay presencia de antioxidante en la muestra, tanto para hexano como etanol. Al observarse de colores claros indica una mayor presencia de antioxidante. Mientras que colores oscuros representan menor potencial antioxidante. Para dar validez a los datos se realizaron análisis estadísticos.

Con el fin de definir si existe diferencia entre tratamientos se utilizó la herramienta Análisis de datos en Excel 2016 para obtener un ANOVA que muestre la diferencia estadística entre tratamientos, en este contexto, recirculaciones. Al observar un valor P del 1.85×10^{-7} y al ser menor a un valor de alfa de 0.05, bajo una hipótesis nula donde las medias son iguales y una hipótesis alternativa donde las medias son diferentes; se concluye que existe una media distinta desconocida.

Para lo anterior, se realizó un análisis LSD (Least Significant Difference) con el que se determinó entre qué grupos es significativa la diferencia y a partir de esto cuál es el número de recirculaciones por oleorresina que tiene el mayor potencial antioxidante. De tal forma que con base en la prueba T-student de 2 colas se obtiene la diferencia mínima que debe haber entre muestras para ser estadísticamente distintas. La ecuación es la siguiente:

$$LSD = T(0.05,25) * \sqrt{CM * \left(\frac{1}{6} + \frac{1}{6}\right)}$$

(Ecuación 2)

Se obtuvo que la oleorresina de 15 recirculaciones es la que presenta mayor potencial antioxidante, ya que presenta diferencia significativa entre todas las muestras excepto contra la referencia de licopeno comercial; obteniendo mayor promedio de potencial en su densidad óptica tanto en tiempo 0 como a los 30 minutos, como se establece el

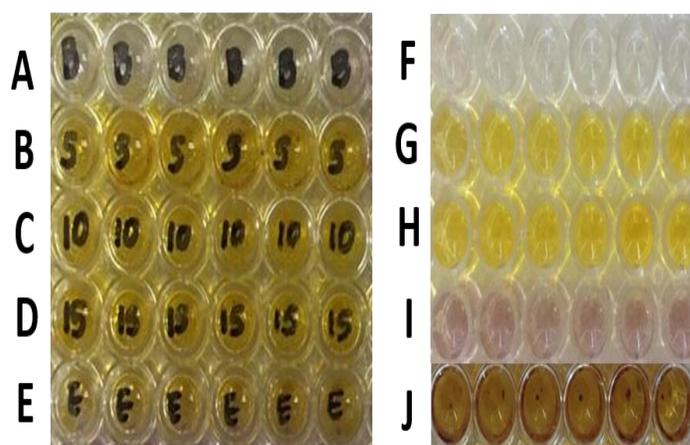


Figura 2. Ensayo de DPPH. (A) y (F) Blanco correspondiente a metanol, (B), (G) y (H) oleorresina con 5 recirculaciones en hexano, (C) 10 recirculaciones en hexano, (D) 15 recirculaciones en hexano, (E) e (I) 10 recirculaciones en etanol y (J) referencia estándar de licopeno.

protocolo. Estos resultados se reafirman en la Figura 3, donde cada punto representa una extracción con base en su absorbancia promedio y su desviación estándar.

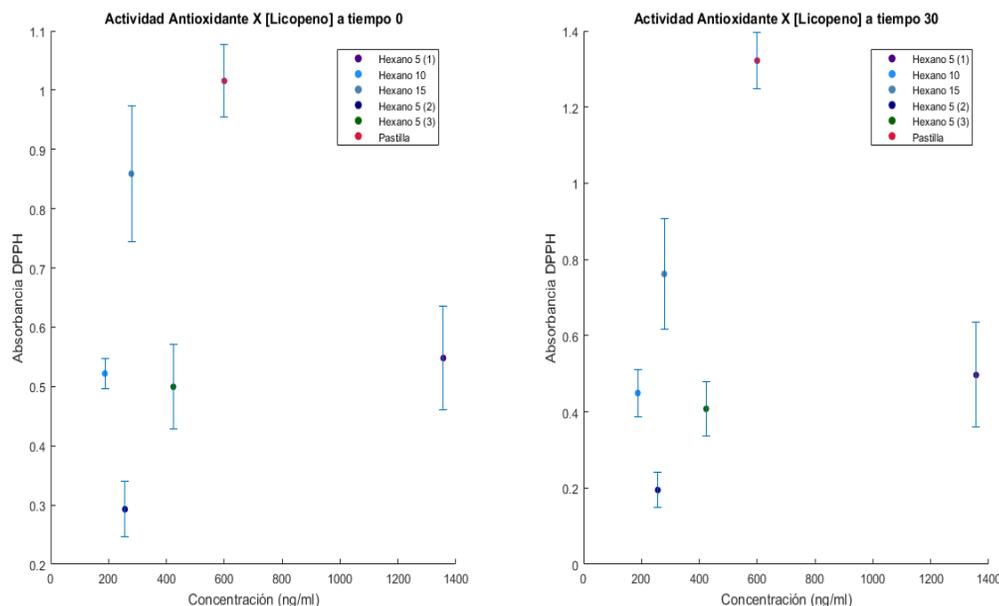


Figura 3. Gráficas de dispersión de las distintas extracciones con hexano.

BIBLIOGRAFÍA

- Arsad, A., Ahmad, M., Danlami, J. & Sulaiman, H. (2014). A comparative study of various oil extraction techniques from plants. *Reviews in Chemical Engineering*, 30(6), 605-626.
- Cardona, E., Ríos, L., Restrepo, G. (2006). Extracción del carotenoide licopeno del tomate chonto (*Lycopersicon esculentum*). *Revista de la facultad de química farmacéutica* 13(2), 44-53.
- Cruz Bojórquez, R. M., González Gallego, J., & Sánchez Collado, P. (2013). Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1), 6-15.
- Kumcuoglu, S., Yilmaz, T. & Tavman, S. (2013). Ultrasound assisted extraction of lycopene from tomato processing wastes. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4102-4107.
- López, O. (02 de enero de 2018). ¿Sabes cuántas toneladas de comida tira México a la basura?. *El Universal*. Recuperado de: <https://www.eluniversal.com.mx/nacion/sociedad/mexico-desperdicia-20-millones-de-toneladas-de-comida>
- Periago, M. J., Martínez-Valverde, I., Ros, G., Martínez, C., & López, G. (2001). Propiedades químicas, biológicas y valor nutritivo del licopeno. In *Anales de veterinaria de Murcia* (Vol. 17, pp. 51-66).
- SAGARPA. (2017). *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030*. Subsecretaría de Agricultura.
- Universidad de Barcelona. (s.f.). Tipos de destilación. En *Destilación*. Recuperado de: www.ub.edu/oblq/oblq_castellano/destilacio_tipus.html
- Waliszewski, K. N., & Blasco, G. (2010). Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud Pública de México*, 52(3), 254-265.