



ASOCIACIÓN DE CIENTÍFICOS
Y TECNÓLOGOS DE ALIMENTOS
DE CASTILLA Y LEÓN



JICITA

**Congreso Nacional de Jóvenes Investigadores en
Ciencia, Ingeniería y Tecnología de los Alimentos**



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

Salamanca, 10 y 11 de noviembre de 2022



JICITA
Congreso Nacional de Jóvenes Investigadores en
Ciencia, Ingeniería y Tecnología de los Alimentos

III Congreso Nacional de Jóvenes Investigadores en
Ciencia, Ingeniería y Tecnología de los Alimentos

Organizan:

Asociación de Científicos y Tecnólogos de Alimentos de Castilla y León
(ACTA/CL)

Universidad de Salamanca

ISBN: 978-84-09-46076-2

Salamanca, 10 y 11 de noviembre de 2022

Comités

Comité organizador

Coordinadores

María Teresa Escribano Bailón

Montserrat Dueñas Patón

Ignacio García Estévez

Elvira Manjón Pérez

Cristina Alcalde Eon

Junta Directiva de ACTA/CL

Teresa María López Díaz

Pedro A. Caballero Calvo

José María Rodríguez Calleja

Erica Renes Bañuelos

Manuel Fernández Calderón

Beatriz Quirós

Isabel Jaime Moreno

Patricia Fernández Castaño

Ana Ojeda Alonso

Eva Guillamón Fernández

María Jesús Rodríguez González

Francisco José Rodríguez Hernández

Javier Tejedor Martín

Colaboradores

Rebeca Ferreras Charro

Bárbara Torres Rochera

María Oyón Ardoiz

Diana Bosch Crespo

Comité científico

Jesús Ángel Santos Buelga (Universidad de León)

M^a Eugenia Tornadijo Rodríguez (Universidad de León)

Felicidad Rondas Balbas (Universidad de Valladolid)

Pedro Antonio Caballero Calvo (Universidad de Valladolid)

María Teresa Sancho Ortiz (Universidad de Burgos)

Miriam Ortega Heras (Universidad de Burgos)

María Teresa Escribano Bailón (Universidad de Salamanca)

Montserrat Dueñas Patón (Universidad de Salamanca)

Extracción de clorofilas a partir de subproductos de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*

Adriana K. Molina^{1,2}, Leonardo Corrêa Gomes^{1,2}, Carla Pereira¹, Maria Inês Dias¹, Miguel A. Prieto², Isabel C. F. R. Ferreira¹ y Lillian Barros¹

¹ Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal, amolina@ipb.pt

² Grupo de Nutrição e Bromatologia, Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Vigo, Ourense, Espanha

La industria alimentaria tiene un gran interés en el uso de residuos y subproductos para el desarrollo de colorantes naturales con propiedades bioactivas. Como pigmentos naturales más abundantes en las plantas, las clorofilas tienen un gran potencial de aplicación en este sector. En el presente estudio, se realizaron dos tipos de extracción a partir de las partes aéreas de tomate, con el fin de maximizar el rendimiento de extracción de las clorofilas. Para esto, se variaron los parámetros involucrados en cada método de extracción: en la maceración, el tiempo de extracción y el solvente, y en la extracción asistida por ultrasonidos, la potencia y el solvente. Por otro lado, para priorizar los procesos amigables con el medio ambiente, se utilizaron los solventes verdes etanol y hexano. La identificación y cuantificación de los compuestos clorofílicos se efectuó por HPLC-DAD/ESI-MS. En general, las partes aéreas de tomate revelaron concentraciones considerables de clorofilas y derivados, hasta $211,6 \pm 0,3$ $\mu\text{g/g}$. La técnica de ultrasonidos fue más eficaz que la maceración y en comparación con el hexano, el etanol permitió un rendimiento de extracción 100 veces mayor. Este estudio puede servir de base para futuras investigaciones en la extracción de clorofilas con alta capacidad colorante.

Palabras clave: Clorofilas, HPLC, Maceración, Extracción asistida por ultrasonidos, Solventes verdes.

INTRODUCCIÓN

Los pigmentos naturales de las plantas han sido crecientemente explorados para el desarrollo de formulaciones colorantes. La investigación de estos compuestos, pero también la preocupación por el uso sostenible de sus fuentes naturales, han impulsado a diversos autores hacia la optimización de los procesos involucrados; por ejemplo, las diferentes técnicas de extracción considerando las variables que más afectan a los procesos de extracción, para aumentar el rendimiento de extracción y la pureza de los colorantes obtenidos. El uso de subproductos/biorresiduos de la industria para extraer estas moléculas ha ido ganando adeptos, permitiendo la incorporación de estos compuestos como ingredientes novedosos de alto valor en diversos productos. Más allá de su capacidad colorante, los pigmentos naturales tienen propiedades bioactivas que pueden conferir a los productos en que se aplican. Las clorofilas son los pigmentos naturales más abundantes en las plantas, las cuales, tras la digestión humana, se convierten fácilmente en feofitina, pirofitina y feoforbido, que son valiosos compuestos bioactivos con grandes propiedades antioxidantes y antimutagénicas. Sin embargo, como la mayoría de los pigmentos naturales, las clorofilas presentan una baja estabilidad, siendo fácilmente degradadas mediante reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Por ello, los métodos de extracción aplicados para recuperar estos

pigmentos de matrices naturales tienen una importancia crucial para mantener su integridad y las propiedades colorantes y bioactivas asociadas (Gonzalez De Mejia y col., 2019; Turkiewicz y col., 2020).

En el presente estudio, se extrajeron clorofilas de los subproductos de tomate, mediante técnicas convencionales e innovadoras, empleando siempre disolventes verdes. Para ello, se aplicaron extracciones por maceración y asistidas por ultrasonidos con etanol y hexano como solventes de extracción. Además, se implementó un método cromatográfico para el seguimiento de la composición y concentración de clorofilas en los diferentes extractos preparados, mediante HPLC-DAD/ESI-MS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras. Las partes aéreas de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (tomates cherry) se recuperaron al final del verano, tras la recogida de los frutos comestibles, en Bragança (noroeste de Portugal). Las muestras se limpiaron, congelaron y liofilizaron antes de ser reducidas a un polvo fino y homogéneo. El polvo se almacenó protegido de la luz, a temperatura ambiente, para su posterior extracción.

Extracciones. La técnica de maceración convencional se realizó bajo agitación continua, a temperatura ambiente, protegida de la luz. Para ello, se extrajo 1 g de muestra con 30 mL de solvente y se filtró a través de

papel de filtro nº 4. El residuo se re-extrajo con 30 mL adicionales y se volvió a filtrar. Las variables evaluadas fueron el solvente de extracción y el tiempo. Para la extracción asistida por ultrasonidos, las muestras se sometieron a 3 niveles distintos de potencia ultrasónica, durante 5 min a temperatura ambiente, evitando la exposición a la luz. Se colocó 1 g de muestra en un vaso de precipitados con 50 mL de solvente; después de la extracción, la mezcla se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos y, por último, el sobrenadante se filtró para su posterior análisis. En las dos técnicas de extracción se emplearon como solventes etanol (90%) y hexano.

Para el análisis de las clorofilas, se implementó un método cromatográfico para su identificación y cuantificación mediante HPLC-DAD/ESI-MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la parte aérea del tomate se encontraron ocho compuestos clorofilicos diferentes (Figura 1).

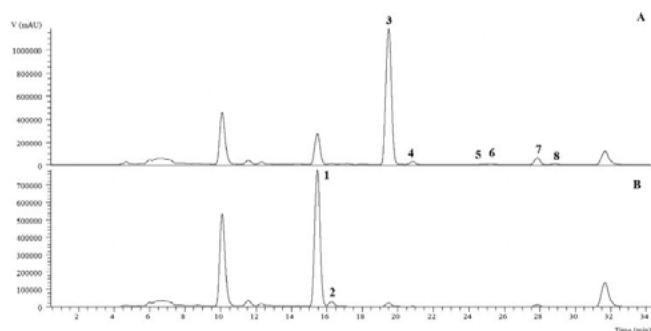


Figura 1: Perfil de clorofilas (A: 430 nm, B: 470 nm); extracción con etanol, asistida por ultrasonidos (400 W).

Los picos 1 y 3 se identificaron como clorofila *b* y *a*, respectivamente, por comparación de sus características cromatográficas de tiempo de retención, espectros UV y patrón de fragmentación con los estándares comerciales disponibles. Los picos 2 y 4 presentaron las mismas características cromatográficas de los picos 1 y 3, respectivamente, y, siguiendo lo descrito previamente por otros autores (Turkiewicz y col., 2020), fueron identificados tentativamente como isómeros de clorofila *b* y *a*, por lo que se denominaron clorofila *b'* y *a'*, respectivamente. El pico 7 presentó un ion pseudomolecular y un fragmento MS² único, correspondiente a la pérdida de 248 mu, que coincide con lo descrito por Turkiewicz y col. (2020) en los frutos de los cultivares de *Chaenomeles*, siendo identificado tentativamente como feofitina *a*. El pico 8 presentó la misma respuesta cromatográfica que el pico 7, siendo identificado tentativamente como un isómero, la feofitina *a'*. Por último, dos derivados desconocidos de la clorofila (picos 5 y 6) se identificaron tentativamente basándose únicamente en sus espectros UV característicos; desafortunadamente, el método de

masas no permitió la identificación del ion pseudomolecular principal.

En cuanto a las extracciones, se presentaron concentraciones considerables de clorofila, siendo mayor en todos los extractos de etanol. Los extractos obtenidos por la técnica de ultrasonidos revelaron concentraciones de $211,6 \pm 0,3$, $126,75 \pm 0,01$ y $103,3 \pm 0,3$

$\mu\text{g/mL}$ aplicando 400, 200 y 100 W de potencia ultrasónica, respectivamente, durante 5 min. El aumento de la potencia aplicada se reflejó en el incremento de las concentraciones de clorofila *b* y *a*, que se detectaron en todos los extractos de etanol en ultrasonidos, pero la mayor cantidad total también se explica por la extracción adicional de feofitina *a* con 200 W y de feofitina *a* y clorofila *a'* con 400 W. Mediante la extracción por maceración, la recuperación de los compuestos fue significativamente menor, oscilando entre $37,27 \pm 0,04$ y $27,03 \pm 0,03$ $\mu\text{g/mL}$, extraídos durante 120 y 60 min, respectivamente. En cuanto a los extractos obtenidos por ultrasonidos con hexano, sólo se extrajo la feofitina *a* en una concentración cuantificable.

En conclusión, la aplicación de metodologías de maceración y extracción asistida por ultrasonidos a biorresiduos de partes aéreas de tomate permitió recuperar concentraciones considerables de compuestos clorofilicos, con potencial de aplicación en varios campos industriales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación para la Ciencia y la Tecnología (FCT, Portugal) el apoyo financiero a través de los fondos nacionales FCT/MCTES al CIMO (UIDB/00690/2020). A la financiación nacional FCT, P.I., a través del programa institucional de empleo científico-contrato de C. Pereira, M.I. Dias y L. Barros y a la beca de doctorado de A.K. Molina (2020.06231.BD). Al Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Operativo Regional Norte 2020, en el ámbito del Proyecto GreenHealth - Norte-01-0145-FEDER-000042.

BIBLIOGRAFÍA

- GONZALEZ DE MEJIA, E., ZHANG, Q., PENTA, K., ERO, A., & LILA, M. A., 2020. The colors of health: chemistry, bioactivity, and market Demand for colorful foods and natural food sources of colorants. *Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 11, pp. 145-182.
- TUKIEWICZ, I. P., WOJDYŁO, A., TKACZ, K., & NOWICKA, P., 2020. Carotenoids, chlorophylls, vitamin E and amino acid profile in fruits of nineteen *Chaenomeles* cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 93, pp. 103608-103619.