

Efecto de presión y temperatura en la extracción de isotiocianato de bencilo por fluidos supercríticos a partir de hojas de *Tropaeolum majus* L.

Effect of pressure and temperature in the extraction of bencilo's isotiocianato for flow supercritics from leaves gives *Tropaeolum majus* L.

Clara Espinoza Silva¹, Flor Gamarra Quezada¹, Marianela Ramos Filio¹, Miguel Quispe Solano¹, Omar Flores Ramos²

¹Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional del Centro del Perú.

²Facultad de Ingeniería Mecánica, Universidad Nacional del Centro del Perú.

(Teléfono (051) 960515049; cespinoza_silva@hotmail.com)

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Artículo recibido 19-08-2017
Artículo aceptado 26-08-2017
On line: 25-10-2017

PALABRAS CLAVES:

Tropaeolum majus L.,
Fluidos supercríticos,
bencil isotiocianato.

ARTICLE INFO

Artículo recibido 19-08-2017
Artículo aceptado 26-08-2017
On line: 25-10-2017

KEY WORDS:

Tropaeolum majus L.,
supercritical fluids,
benzyl isothiocyanate.

RESUMEN

El *Tropaeolum majus* L. es una planta originaria de América del Sur y Central, era usada desde tiempos muy antiguos por nuestros antepasados para combatir distintas enfermedades. Entre sus componentes se encuentra la glucotropaeolina, que al ser hidrolizado forma el bencil isotiocianato (BIT) que fomenta la apoptosis celular (muerte celular programada en células cancerosas). Por ello, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo la evaluación del efecto de la presión y temperatura de extracción del bencil isotiocianato por CO₂ Supercrítico a partir del *Tropaeolum majus* L. La extracción se realizó en un equipo extractor de fluidos supercríticos Speed SFE BASIC Marca: Poly science, las hojas de *Tropaeolum majus* L. fueron trituradas resposadas por una hora y liofilizadas hasta obtener una humedad de 6%. La extracción con CO₂ supercrítico, se realizó con presiones de 200 y 300 bar, temperaturas de 50°C, 60°C y 70°C, obteniendo por la conjugación de estos seis tratamientos. Se identificó el bencil isotiocianato por cromatografía de capa fina usando como patrón el bencil isotiocianato al 98%, y como fase móvil hexano: diclorometano (4:2). Posteriormente la cuantificación del bencil isotiocianato se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). El mayor rendimiento de oleoresina de la extracción por CO₂ supercrítico se obtuvo a presión de 300 Bar y temperatura a 60°C (35, 67%); y el mayor contenido de bencil isotiocianato se obtuvo a presión de 200 Bar, temperatura de 70°C por 30 minutos, obteniéndose 113,615 ± 0,03 mg de BIT/100 g de materia seca.

ABSTRACT

Tropaeolum majus L. is a native plant to South and Central America, used since ancient times by our ancestors to combat different diseases. Glucotropaeolinin is one of its main components, which when hydrolyzed forms benzyl isothiocyanate (BIT) that promotes cellular apoptosis (programmed cell death in cancer cells). Therefore, the present research aims to evaluate the effect of the pressure and temperature of benzyl isothiocyanate extraction by supercritical CO₂ from *Tropaeolum majus* L. The extraction was carried out in a supercritical fluid extractor equipment Speed SFE BASIC Brand: Poly science, the leaves of *Tropaeolum majus* L. were ground for one hour and lyophilized until obtaining a humidity of 6%. The extraction with supercritical CO₂ was carried out with pressures of 200 and 300 bar, temperatures of 50 °C, 60 °C and 70 °C, obtaining by the conjugation of these six treatments. Benzyl isothiocyanate was identified by thin layer chromatography using 98% benzyl isothiocyanate as the standard, and as the mobile phase hexane: dichloromethane (4: 2). Subsequently benzyl isothiocyanate quantification was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). The highest yield of oleoresin by supercritical CO₂ extraction was obtained pressure 300 bar and temperature at 60 °C (35. 67%); and the higher content of benzyl isothiocyanate at pressure 200 Bar and 70 °C for 30 minutes to obtain 113.615 ± 0.03 mg BIT / 100 g dry matter was obtained.

I. INTRODUCCIÓN

El *Tropaeolum majus* L. es una planta originaria de América del Sur y Central que a nivel mundial es usada para combatir distintas enfermedades, debido a que tiene un componente llamado glucotropaeolina, que al ser hidrolizado produce el bencil isotiocianato el cual es un potente antibiótico para combatir infecciones respiratorias y urinarias, impidiendo la proliferación de las bacterias (Nanzi, 1999). A nivel mundial la preocupación a causa de enfermedades cancerígenas va aumentando y con ello va creciendo el interés de la investigación para obtener compuestos presentes en vegetales, semillas, flores ornamentales, que ayudan a contrarrestar la enfermedad y prevenirla. El bencil isotiocianato fomenta la apoptosis o muerte celular programada en células cancerosas de la mama y ovarios, sin afectar a las células sanas cosa contraria con la quimioterapia (Colbert, 2010). Las células cultivadas de *Tropaeolum majus* L. producen cantidades significativas de glucosinolato de bencilo (Spiridon & Barberaki, 2003). La glucotropaeolina o bencil glucosinolato se acumula en plantas maduras de *Tropaeolum majus* L. (Lykkesfeld & Lindberg, 1993), siendo este el principio activo principal del *Tropaeolum majus* L. que es un aceite esencial glucósido llamado glucotropaeolina que ingerido en dosis terapéuticas se le atribuyen propiedades bacteriostáticas y antimicóticos (Benedí & Simón, 2013).

Para esta investigación se tomó como referencia la investigación realizada por Barroso P., Carvalo P., Rocha T., Pessoa F. Azevedo D., Mendes M. (2016) quien realizó la extracción de bencil isotiocianato (BIT) a partir de semillas de *Carica papaya* L., del cual se tomó como referencia su metodología, la identificación del bencil isotiocianato se realizó por cromatografía de capa fina y la cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para la extracción se usó CO₂ supercrítico considerado una tecnología verde cada vez más usado, en la cual en el producto extraído no existen

residuos de solventes orgánicos y su pureza es alta. Existe muy poca bibliografía referida a la extracción de isotiocianato de bencilo por CO₂ supercríticos por lo que se realizó previamente al trabajo un screening de extracción a varias presiones y temperaturas seleccionándose las que reportaron un mayor rendimiento. Los objetivos planteados fueron: Determinación el efecto de la presión y temperatura de extracción por fluido supercrítico en el rendimiento de oleorresina y bencil isotiocianato de hojas de *Tropaeolum majus* L.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y equipos

Las hojas de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.) fueron recolectadas del invernadero de la Estación Experimental El Mantaro de la Universidad Nacional del Centro del Perú. Se recolectó las hojas, trozó y reposó por una hora para ser liofilizadas a condiciones de Presión de 1 Pa, Temperatura de congelación de -70°C, Temperatura final de 15°C; hasta obtener una humedad final de 6%, en un liofilizador marca BIOBASE, luego fueron trituradas hasta obtener un módulo de finura medio. El dióxido de carbono utilizado en la extracción supercrítica fue de pureza de 99,99% (PRAXXAIR S. A Lima – Perú).

Método

Para la extracción de bencil isotiocianato a partir de hojas de *Tropaeolum majus* L., se usó el sistema de extracción por fluidos supercríticos Spe-ed SFE BASIC. Marca: Poly science. Se usó 25 g de hojas trituradas y los experimentos se realizaron bajo las condiciones de 200 y 300 Bar para la presión; y 50, 60 y 70°C para la temperatura, con un tiempo de extracción de 30 minutos, se pesó el extracto obtenido para determinar el rendimiento de oleorresina. El experimento se realizó por duplicado.

Identificación de BITC

Se realizó mediante CCF (cromatografía de capa fina), se usó placas de silicagel de 7x6 cm, siendo identificada cada una por la presión de 200 y 300 bar, cada placa fue dividida en cuatro puntos equidistantes en un punto se sembró el patrón de bencil isotiocianato al 98% estándar y en los otros tres puntos el BIT extraído por las temperaturas de 50, 60 y 70°C. Se usó como fase móvil diclorometano: hexano (2:4) y se dejó desarrollar cada placa en una cámara de vidrio para cromatografía por 5 minutos aproximadamente. Se visualizó en una cámara de luz UV a 254nm luego se esprayó con nitrato de plata amoniacal hasta la aparición de manchas marrón oscuro, luego esprayó con ácido nítrico a 0,5N. Finalmente se determinó el Rf.

Luego de revelar la presencia de BIT por las manchas presentes en los cromatogramas, se realizó la cuantificación por HPLC.

Cuantificación de isotiocianato de bencilo

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Marca: KNAUER, Modelo: SMARTLINE, compuesto por: Bomba analítica cuaternaria, Detector UV-VIS de onda variable, Automuestreador automatizado, Horno de columna. Se utilizó el Software ChromGATE, se realizó con el método de Rodríguez (2011) siendo validado este método por las pruebas de aptitud mencionadas en USP realizándose la inyección de 5 veces el mismo estándar a una concentración de 53.9 µg/mL, obteniendo el %RSD de 1,21%. Se desarrolló la lectura por HPLC con las siguientes condiciones cromatografías:

Columna: Knauer Eurospher II L7 (C8) 50 mm x 4.6 mm x 5 µm

Fase móvil: Mezcla filtrada y desgasificada de Acetonitrilo: Metanol (50:50)

Detector: UV, 246 nm.

Velocidad de flujo: 1 mL/minuto.

Volumen de inyección: 20 µL.

Temperatura: 30°C

Tiempo de corrida: 5.00 min aproximadamente

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Identificación de isotiocianato de bencilo

Por cromatografía de capa fina se detectó la presencia de BIT en todas las muestras extraídas (Fig 1 y Fig 2), la mancha del patrón de bencil isotiocianato está a la misma altura de los demás tratamientos aplicados, se obtuvo como Rf valores entre 0,5 a 0,6. Csáky y Martínez (2012) menciona que si un componente eluye a un Rf inferior a 0,2 o superior a 0,7, puede ocurrir que lo que parece un compuesto único sea en realidad una mezcla de varios, en estos casos se debe cambiar otro disolvente más o menos polar, respectivamente, el Rf obtenido está dentro de los estándares mencionados anteriormente.

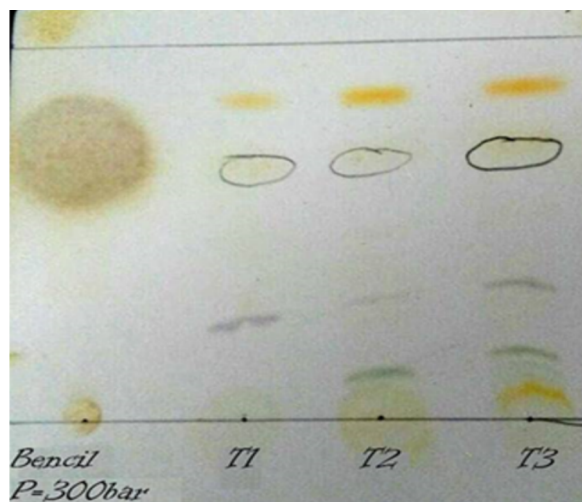


Figura 1. Placa cromatografía a las condiciones de presión 200 Bar y temperatura 50, 60 y 70°C.

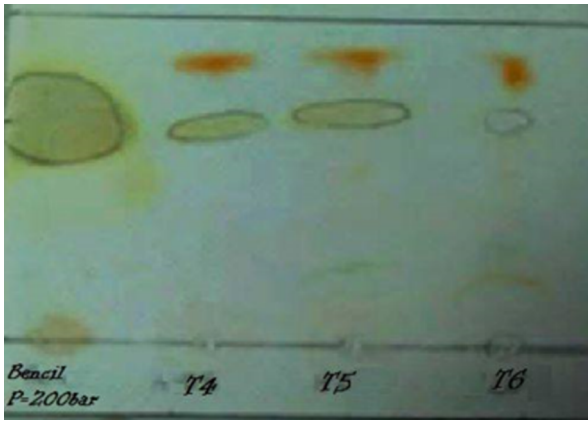


Figura 2. Placa cromatografía a las condiciones de presión 300 Bar y temperatura 50, 60 y 70°C.

Se utilizó como eluyente la solución de hexano: diclorometano en relación 4:2, se realizó la visualización en una cámara de luz UV a 254 nm y usó como revelador el nitrato de plata amoniacal hasta la aparición de manchas marrón oscuro, luego esprayó con ácido nítrico al 0,5N, identificándose de este modo el bencil isotiocianato, para luego realizar la cuantificación por HPLC.

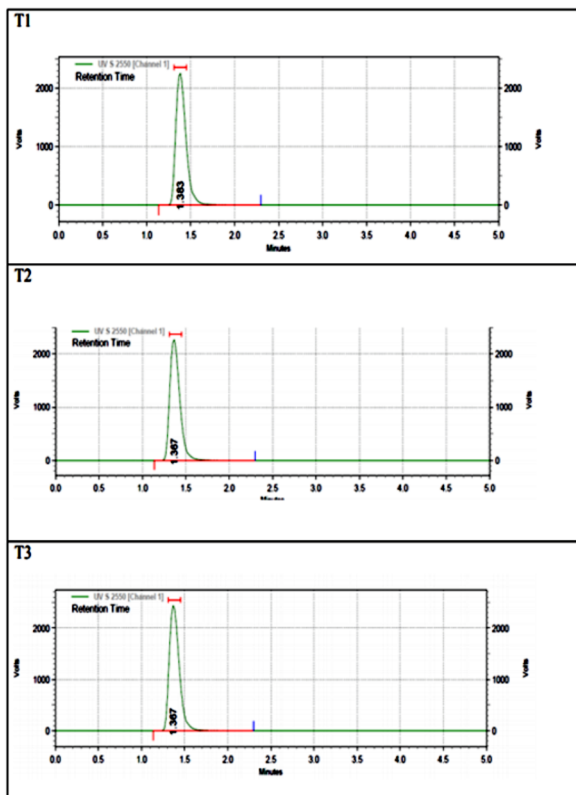


Figura 4. Cromatograma de los extractos de isotiocianato de bencilo a presión de 300 bar , T1=50°C T2=60°C T3=70°C

B. Cuantificación de BIT

Se cuantificó por HPLC la cantidad de bencil isotiocianato que presentó cada tratamiento, se obtuvo la cantidad más alta en el tratamiento a condiciones de presión 200 bar y temperatura de 70°C con $113,615 \pm 0,03$ mg de BIT por 100 g de muestra seca. Las cantidades de BIT se calcularon a partir de las áreas de los picos obtenidos al realizar HPLC.

Se muestra el perfil cromatográfico del estándar del bencil isotiocianato (Fig. 3) el cual nos muestra el pico cromatográfico bien definido y resuelto a un tiempo de retención de 1,367 min que corresponde al bencil isotiocianato.

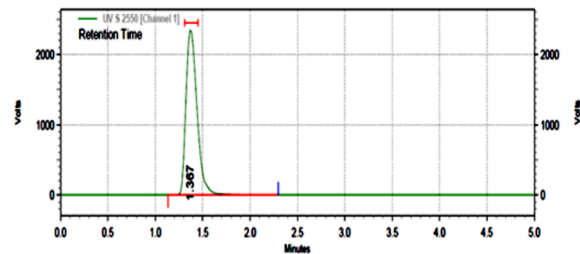


Figura 3. Pico cromatográfico del estándar de bencil isotiocianato

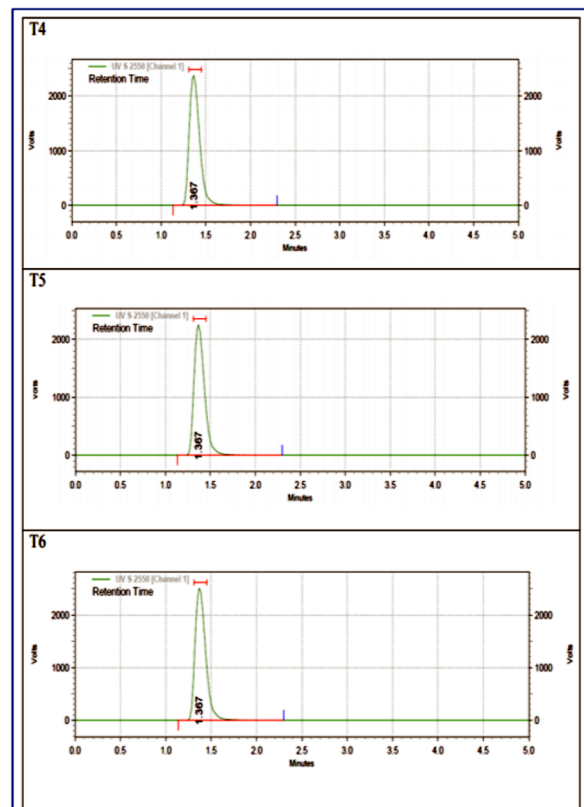


Figura 5. Cromatograma de los extractos de isotiocianato de bencilo a presión de 200 bar , T1=50°C T2=60°C T3=70°C

Se realizó los perfiles cromatograficos de los seis tratamientos aplicados para la extracción de bencil isotiocianato del *Tropaeolum majus* L. por CO₂ supercrítico (Fig 4 y 5) donde los picos cromatograficos están bien definidos y resueltos en un tiempo de 1,367 minutos, al ser comparados con el estándar aparecen en un tiempo de retención aproximado lo que indica la presencia del compuesto (BIT) en las oleorresinas obtenidas por CO₂ supercrítico.

Se realizó la cuantificación por las áreas reportadas cuya comparación de medias se muestra en la figura 6.

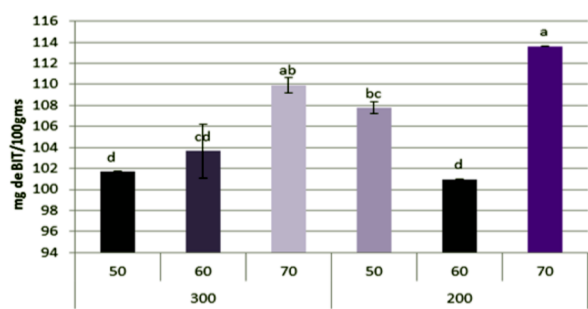


Figura 6. Contenido de medio del bencil isotiocianato en los diferentes tratamientos (Presión =200 y 300 Bar; Temperatura de 50°C, 60°C y 70°C).

El rango de la cantidad de bencil isotiocianato extraído por CO₂ supercrítico va desde 100,963 ±0,02 mg de BIT/100 g de materia seca hasta 113,615 ±0,03 mg de BIT/100 g de materia seca (Fig.6). Al comparar solo la presión de 300 Bar se observa que la cantidad de BIT aumenta conforme aumenta la temperatura que va desde 101,684 a 109,905 mg de BIT por 100g de materia seca, esto no sucede con la presión de 200 Bar ya que a temperatura de 70°C presenta una mayor cantidad de BIT, con respecto a las temperaturas de 50 y 60°C, al bajar la temperatura en 10°C el BIT disminuye notablemente y al disminuir en 20°C el BIT disminuye también, pero presenta mayor cantidad que el de 60°C. La mayor cantidad de BIT se obtuvo en el tratamiento T6 (P=200 y T=70) con 113,615mg de BIT por 100g de muestra seca, seguido del T6 (P=300 y T=70), ambos presentan la misma temperatura con la diferencia que al disminuir la

presión se obtiene mayor cantidad de BIT.

Barroso *et al.* (2016) realizó la evaluación de la eficiencia y composición del aceite extraído de semillas de *Carica papaya* L con dióxido de carbono supercrítico, llegando a la conclusión que el mejor tratamiento se encontró a 40°C y 150 bar seguidas por 80°C y 200 bar, al respecto Ahluwalia (2013) menciona que la composición del extracto se puede controlar mediante la regulación de la presión; con el aumento de temperatura hay mejoras en la transferencia de masa, ya que provoca el aumento de la presión de vapor de los compuestos extraíbles que es más significativo que la reducción en la densidad del disolvente, aumentando por consiguiente el rendimiento de extracción global.

Se realizó análisis estadístico, con el análisis de varianza ANOVA con un $\alpha=0,05$ de la cantidad de bencil isotiocianato obtenido en los seis tratamientos realizados con CO₂ supercrítico en hojas de mastuerzo, para examinar la variabilidad, y comprobar si las medias difieren significativamente, se probó dos variables operacionales como la presión en dos niveles (200 y 300 Bar) y la temperatura a tres niveles (50, 60 y 70°C), se aplicó seis tratamientos con dos repeticiones. Se utilizó el diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x3. Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de TUKEY, donde se observó que los tratamientos T1 (P=300 bar ^ T=50°C) y T5 (P= 200 bar ^ T=60°C) no presentan diferencia estadísticamente significativa para el rendimiento del bencil isotiocianato presente en las hojas de *Tropaeolum majus* L. indicándonos también que tienen el más bajo rendimiento de los tratamientos realizados por ello se le asignó el subgrupo d, también se observa que los tratamientos T1 y T5 presentan diferencia significativa frente a los tratamientos T3, T4 y T6. Los tratamientos T2 (P=300 bar y T=60°C) y T4 (P = 200 bar y T= 60°C) no presentan diferencia significativa con respecto al rendimiento de bencil isotiocianato; se le asignó el grupo c; se observa también que el tratamiento T2 no presenta diferencia significativa con los tratamiento

T1 y T5, pero si es estadísticamente significativo con los tratamientos T3 y T6. Los tratamientos T4 (P=200 bar y T= 60°C) y T3 (P=300 bar y T=70°C) no presentan diferencia estadísticamente significativa para el rendimiento del bencil isotiocianato presente en las hojas de *Tropaeolum majus* L. se le asignó la letra b, ya que presenta un rendimiento intermedio entre los demás tratamientos, se observa también que el T4 no presenta diferencia significativa con el tratamiento T2, pero si es estadísticamente significativo con los tratamientos T1, T5 y T6.

Por ultimo en el subgrupo de los tratamientos T3 (P=300 bar y T=70°C) y T6 (P=200 bar y T=70°C) son los tratamientos que presentan mayor cantidad de bencil isotiocianato que son de 109,905 mg de BIT/100 g de materia seca y 113,615 mg de BIT/100g de materia seca respectivamente, estos tratamientos no presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto al rendimiento del bencil isotiocianato, se observa también que el T3 presenta diferencia significativa con los tratamientos T1, T2 y T5; también se observa que el T6 presenta diferencia estadísticamente significativa con los tratamientos T1, T2, T4 y T5. Entonces podemos afirmar que estadísticamente el mejor tratamiento aplicado para la extracción de bencil isotiocianato por CO₂ supercrítico es el T6 que se realizó a las condiciones de: presión (200 bar) y temperatura (70°C); seguido por el T3 que se realizó con las siguientes condiciones: presión (300 bar) y temperatura (70°C).

IV. CONCLUSIÓN

El mayor rendimiento de oleoresina de hojas de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L) extraído con CO₂ supercrítico fue de 35,67% a las condiciones de Presión=300 Bar y Temperatura= 60 °C y la mayor cantidad de bencil isotiocianato extraído con CO₂ supercrítico a partir de hojas de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L) fue de 113,615 ±0,03 mg de BIT/100 g de materia seca a las condiciones de: Presión= 200 Bar y Temperatura = 70 °C

RECONOCIMIENTO

A INNOVATE PERU por el financiamiento del presente trabajo

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahluwalia, S., Shivhare, U. & Basu, S. (2013). Supercritical CO₂ Extraction of Compounds with Antioxidant Activity from Fruits and Vegetables Waste -A Review. Focusing on Modern Food Industry (FMFI) Volume 2 Issue 1, February 2013
- Barroso, P., de Carvalho, P., Rochab, T., Pessoa, F., Azevedo, D., & Mendes, M. (2016). Evaluation of the composition of Carica papaya L. seed oil extracted with supercritical CO₂. Biotechnology Reports Volume 11, September 2016, Pages 110–116
- Benedí G., C. y Simón P., J. (2013). Plantas Ornamentales Toxiques. Barcelona
- Colbert (2010) La Nueva Cura Bíblica para El Cáncer: verdades antiguas y remedios naturales y los últimos hallazgos para la salud
- Csaky, A. G. & Martinez, G. A. (2012). Técnicas experimentales en síntesis orgánica. Universidad Complutense de Madrid. Segunda edición corregida y ampliada. Editorial SINTESIS S.A. – España.
- Lykkesfeld, J. & Lindberg M. B. (1993) Synthesis of Benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L. Plant Biochemistry Laboratory. Recuperado el 12 de Diciembre, 2016 de maltawildplants.com/TROP/Docs/TPLMJ/TRP MJ-Synthesis_Benzylglucosinolate.pdf
- Nanzi, A. (1999). *Monografía CAPUCHINA*. Recuperado el 12 de diciembre, 2016 de www.youblisher.com/p/61602-Capuchina-Tropaeolum-majus-L/
- Rodríguez, T. L. (2011). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del bencil isotiocianato de carica pubescens (papaya del monte) frente a helicobacter pilory. Revista Médica Basadrina. Revista Médica Basadrina. UNJBG – FACS.

Spiridon, E. & Barberaki, M. (2003). *Plants That Fight Cancer*. Editorial Taylor Francis Group. London And New York. (pag 187).

USP. *The United States Pharmacopeial Convention* (2007). Usp 39. Estados Unidos de America. Pag 499-500.

