



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE LICENCIATURA
FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA**

**PROCESO DE EXTRACCIÓN DE CLOROFILA
A PARTIR DE ESPINACAS
(SPINACIA OLERACEA)**

TESIS presentada por:

CYNTHIA HERAS CERVANTES

**A la Facultad de Ingeniería Química como
requisito parcial para obtener el
título de:**

INGENIERO QUÍMICO

Morelia, Mich.

AGOSTO DEL 2006

ÍNDICE

Resumen	iii
Lista de tablas	1
Lista de figuras	2
Reconocimientos	3
Capítulo 1. Introducción	5
1.1 Generalidades	5
1.2 Objetivo	13
1.3 Justificación	14
1.4 Alcance	15
1.5 Hipótesis	16
Capítulo 2. Marco Teórico	17
2.1 Espinaca	17
2.1.1 Composición de la espinaca	18
2.1.2 Valor Nutricional	18
2.1.3 Taxonomía y morfología	21
2.1.4. Cultivo	22
2.1. 5. Requerimientos edafoclimáticos	23
2.1.6. Mejora genética	24
2.1.7. Plagas y enfermedades	25
2.1.8.Recolección	27
2.1.9. Normas de calidad para espinacas en estado fresco destinadas al mercado interior.	28
2.2. Industrialización de la espinaca.	30
2.2.1. Obtención de la clorofila	30
2.2.2. Clorofila	31
2.2.3. Características y propiedades de la clorofila	34
2.2.4. Tipos de clorofila	35
2.2.5. Degradación de clorofilas y feofitinas a diferentes	37

Temperaturas	
2.2.6 Aplicaciones de la clorofila	38
2.3. Métodos utilizados en el laboratorio	39
2.3.1 Destilación simple	39
2.3.2. Maceración.	40
2.3.3. Técnica de espectrofotometría	41
2.3.4 Extracción soxhlet.	42
Capítulo 3. Metodología	43
3.1. Características de espinaca para su procesamiento	43
3.2 Desarrollo experimental	43
3.2.1. Reactivos y Solventes.	43
3.3 Técnicas en el laboratorio para la obtención de clorofila	45
3.3.1. Maceración	45
3.3.2 Extracción soxhlet	45
3.4. Condiciones del trabajo experimental	45
3.4.1. Espinaca húmeda macerada	45
3.4.2 Espinaca húmeda equipo soxhlet	46
3.4.3 Espinaca seca macerada	46
3.4.4. Espinaca seca equipo soxhlet	46
3.4.5 Espinaca seca a temperatura ambiente macerada	46
3.4.6 Espinaca seca a temperatura ambiente equipo soxhlet	46
3.5 Instrumentos utilizados	47
3.6 Medición de absorbancia	47
3.7 Cuantificación de la clorofila	48
3.8 Diagnostico económico	48
Capítulo 4. Diagnóstico económico	49
4.1 Extracción de clorofila por maceración de la espinaca	51
4.1.1 Etapa de secado	51
4.1.2 Etapa de maceración	52
4.1.3 Etapa de separación. Destilación simple.	54
4.2 Extracción de clorofila por equipo soxhlet de la espinaca	57

secada (dentro de la estufa)	
4.2.1. Etapa de secado	57
4.2.2 Etapa de extracción	59
4.2.3 Etapa de separación (destilación)	61
Capítulo 5. Resultados	66
Conclusiones	81
Bibliografía	82

LISTA DE TABLAS

Capítulo	Descripción	Página
1.1.	Producción Internacional de Espinaca	10
1.2.	Producción de Espinaca y Zonas de Cultivo más Importantes.	12
2.1.	Composición Nutritiva de de la Espinaca	22
2.2.	Rendimiento del cultivo de Espinaca (Primavera Verano2003/2003)	25
2.3.	Cultivo de Espinaca año agrícola 2003	26
2.4.	Pulverización con Aficidas.	29
3.1	Propiedades Físicas y Química del Acetona	51
4.1	Resultados del Diagnostico Económico.	64
4.2	Resultados del Diagnostico Económico Soxhlet.	74
5.1	Concentración de Resultados.	86
5.2.	Clorofila Total Obtenida.	86
5.3	Rendimiento Obtenido	87
5.4	Variación en la Cantidad de Clorofila y Proteína.	87

LISTA DE FIGURAS

Capítulo	Descripción	Página
2.1	Estructura de las Clorofilas a y b.	39
2.2	Destilación Simple.	44
2.3, 2.4, 2.5	Muestran la Extracción por Equipo Soxhlet.	47
4.1	Diagrama de Flujo Obtención de Clorofila por Maceración.	59
4.2	Etapas de Secado a Temperatura ambiente.	60
4.3	Etapas de Maceración.	61
4.4	Destilación Simple.	63
4.5.	Diagrama de Flujo Extracción en Equipo Soxhlet.	66
4.6	Etapas de Secado.	67
4.7	Etapas de Extracción.	69
4.8	Etapas de Destilación.	72

RESUMEN

PROCESO DE EXTRACCIÓN DE CLOROFILA A PARTIR DE ESPINACAS (SPINACIA OLERACEA)

Por
CYNTHIA HERAS CERVANTES

Agosto del 2006

Licenciatura en Ingeniería Química
Dirigida por: M.C. Anabel Cruz Flores

El presente trabajo muestra los resultados obtenidos para la extracción de clorofila a partir de las espinacas, con el propósito de darle un valor agregado en la producción de espinaca en el Valle de Zamora, Michoacán.

De forma integral, el proceso de extracción se realizó por dos métodos diferentes: 1) Por Maceración, 2) Equipo Soxhlet; cada una de las cuales involucró condiciones como: la espinaca húmeda, la espinaca secada a 32°C en la estufa y espinaca secada a temperatura ambiente de 21°C.

La extracción de clorofila se llevó a cabo usando como solvente una solución acetona-agua con una proporción en volumen de 80-20, obteniéndose la clorofila, posteriormente se cuantificó usando un método espectrofotométrico que consiste en medir la densidad óptica del espectro a una longitud de onda de 663 nm y otra de 645 nm, que de acuerdo al método de Bruisma (Bruisma 1963), nos da la cuantificación de clorofila "a" y "b".

Comparando la cantidad de clorofila que obtuve a partir de las espinacas, del 19.3%, con el tomate del 16.26% (Rodríguez ET. AL. "Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate". Terra, volumen No. 2, 1998.) y con alfalfa del 1.15% (Cortes Sánchez, Gallardo Navarro 2005, "Obtención de concentrados proteicos a partir de alfalfa". VII Congreso nacional de ciencia de los alimentos y III Foro de ciencia y tecnología de alimentos, pág. 254-263); se nota que hay una diferencia favorable en la extracción a partir de las espinacas.

De acuerdo a los resultados del diagnostico económico realizado, el cual dio un alto porcentaje de beneficio, 99.88%, con esto nos damos cuenta de que el proceso resulta rentable.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES

1.1. La Espinaca (*Spinacia Oleracea*)

1.1.1 Origen y Variedades

No se conoce la forma silvestre de la espinaca, fueron los árabes quienes en el siglo XI introdujeron la espinaca por primera vez en España. Su cultivo se extendió por Europa en los siglos XV y XVI, donde países como Holanda, Inglaterra o Francia fueron los principales consumidores. Más tarde llegó a América, aunque no fue hasta la década de 1920 cuando la espinaca logró ser popular, y en el que se descubrieron sus magníficas propiedades nutricionales. En la actualidad su cultivo está extendido por todo el mundo, Estados Unidos, Italia, Francia y Alemania son sus principales productores.

Las dos variedades de espinacas que se cultivan son:

Variedad de hoja rizada: se comercializa fresca, resiste muy bien el transporte y está adaptada para crecer en invierno.

Variedad de hoja lisa: se comercializa congelada o enlatada y su consumo está más extendido que en el caso de la variedad rizada.

Las espinacas se pueden clasificar según la época del año en la que se siembran.

Variedades de verano: se siembran en primavera y verano. Son las más empleadas. Dentro de este grupo se encuentran la espinaca "Rey de Dinamarca" y la "Cleanleaf".

Variedades de invierno: son de hoja triangular, más gruesas y resistentes que las de verano. Las espinacas más consumidas dentro de este grupo son las espinacas "Broad-Leaved Princkly", "Greenmarket" y "Monnopa".

Se comercializan otras variedades de espinaca que se dividen en función del color y la textura de sus hojas. Estas son: espinaca "Lagos", de color verde oscuro muy brillante; "Martine", de hojas redondas y color verde muy oscuro; "Taunus", con hojas de color verde brillante y gruesas, además de la variedad "Viroflay", que presenta hojas lisas de color verde.

1.1.2 SU MEJOR ÉPOCA

Las espinacas frescas están presentes en el mercado entre los meses de otoño y primavera. También se las puede adquirir durante el verano, aunque en esta época presentan una calidad inferior. Son verduras muy aptas para la congelación, por ello se pueden comprar conservadas de este modo durante todo el año. Además, cuentan con la ventaja de que conservan muy bien sus propiedades originales y de que se facilita su cocinado.

1.1.3 CARACTERÍSTICAS

Forma: se trata de un conjunto de hojas lisas o rizadas dispuestas en roseta que surgen de un tallo más o menos ramificado.

Tamaño: el tallo mide unos 15 centímetros de largo y las hojas cerca de 20 centímetros, aunque su tamaño dependerá de la variedad a la que pertenezcan.

Color: el color de las hojas es verde oscuro y brillante.

Sabor: ligera acidez, pero agradable.

La espinaca es un cultivo exigente en el tipo de suelo, requiere suelos ligeros, de buena estructura y adecuado drenaje, siendo muy sensible a los encharcamientos.

El pH óptimo de la espinaca está alrededor de 6,5-7. En suelos alcalinos desarrolla estados carenciales y presenta hojas con el pecíolo clorótico (blanquecino).

Sin embargo, frecuentemente los suelos en los que se cultiva la espinaca tienen un pH más bien alcalino. Por ello es recomendable la aplicación de abonos que no tengan efecto alcalinizante sobre el suelo.

Los abonos con inhibidores de la nitrificación (abonos estabilizados) no sólo no aumentan el pH del suelo sino que lo pueden bajar hasta 2 unidades en las inmediaciones de la raíces, siendo su efecto tanto más pronunciado cuanto más alto sea el pH.

Si bien la espinaca no es un cultivo sensible a la salinidad, es recomendable la aplicación de abonos que no incrementen la salinidad del suelo.

Los abonos de la gama Nitrofoska han sustituido en sus fórmulas el cloruro potásico por sulfato potásico a fin de garantizar un efecto salinizante mínimo y evitar los daños de fitotoxicidad provocados por el cloro.

Además aportan adicionalmente azufre, un elemento necesario para la nutrición vegetal y frecuentemente olvidado.

La espinaca es muy exigente en nitrógeno y potasio, teniendo un pico de necesidades aproximadamente tres semanas antes de la cosecha. Estudios recientes demuestran que con la aplicación mayoritaria del nitrógeno en forma amoniacal se obtienen cosechas de espinacas más elevadas y de mayor calidad. Los abonos estabilizados, al contener una fracción nítrica y una fracción amoniacal estabilizada (se inhibe el paso a nitrógeno nítrico) se adaptan a los requerimientos de la espinaca. El amonio favorece la asimilación del fósforo, ante todo en suelos más bien alcalinos y ricos en calcio, y mejora la calidad de la cosecha al reducir la cantidad de ácido oxálico en hojas. Es además conveniente tener en cuenta las limitaciones de nitratos en hoja que establecen algunos países de la comunidad europea de cara a la importación, la aplicación de nitrógeno en forma de amonio reduce la concentración de nitratos en hojas en aproximadamente un 10%-20%.

La espinaca se cultiva preferentemente sobre suelos ligeros, aspecto que conlleva un alto riesgo de pérdidas de nitrógeno por lavado. Los abonos estabilizados minimizan este efecto, ya que mantienen el nitrógeno en forma estable en el suelo, permitiendo un alto rendimiento en el cultivo.

No es recomendable aplicar riegos hasta después de unas dos-tres semanas tras plantación, es decir, será conveniente aplicar un abono que proporcione los nutrientes adecuados hasta el inicio de la fertirrigación.

La espinaca necesita del potasio. Es un elemento muy importante para la obtención de una cosecha de calidad, así por ejemplo reduce la cantidad de ácido oxálico en las

hojas (al igual que el aporte de nitrógeno amoniacal), mejorando su calidad. Las hojas son más carnosas y se conservan mejor, sin deshidratarse. Además el potasio confiere resistencia a condiciones ambientales adversas (heladas, sequía...) y ataque de enfermedades. En cuanto al fósforo, hay que tener precaución en no excederse, ya que favorece la subida a flor.

El magnesio, componente principal de la molécula de clorofila, interviene directamente en el desarrollo de sus funciones ya que la clorofila es la responsable de realizar la transformación de los nutrientes absorbidos en materia vegetal. La espinaca es un cultivo especialmente sensible a la carencia de magnesio.

Existen dos variedades botánicas de la espinaca, aunque todas las variedades comerciales cultivadas pertenecen a las de semilla espinosa de hojas triangulares, cuyo limbo es sutil, de dimensiones algo reducidas, superficie lisa y pecíolo bastante largo.

Los cultivares se clasifican por sus características morfológicas (color, forma de la hoja, longitud del pecíolo...), por su resistencia a la subida de flor y por su precocidad. Las variedades más precoces presentan una menor resistencia a la subida de flor, por lo tanto son empleadas en siembras a finales de verano y otoño-invierno.

Las variedades menos precoces son más resistentes a la subida de flor y se siembran a finales de invierno y en primavera. Otras características varietales a destacar son la resistencia a mildiu (*Peronospora farinosa*, *P. spmaceae*, *P. efusa*) y la resistencia al frío.

- Polka: resistente a tres cepas de mildiu. Planta semierecta, vigorosa de hojas muy lisas, color verde oscuro. Para cultivo de otoño, invierno y primavera.
- Valeta: muy productivo, sobre todo en primavera. Resistente a subida de flor y tres cepas de mildiu. Follaje erecto, hojas carnosas y color verde intenso.
- Rico: resistente a tres cepas de mildiu. Hojas abullonadas de color verde oscuro y muy productiva.
- Carambole: resistente a tres cepas de mildiu. Ciclo tardío, resistente a la subida de flor, hojas gruesas y muy productivas.
- Rimbo: resistente a tres cepas de mildiu y a la subida de flor. Hoja carnosa de color verde oscuro y muy productiva.
- Bolero: resistente a cuatro cepas de mildiu. Buen color y buena calidad de la hoja.

- Resco: resistente a cuatro cepas de mildiu. Buen color y buena calidad de la hoja.
- Spinackor: resistente a cuatro cepas de mildiu. Hojas lisas verde oscura. Valida tanto para industria como para el mercado en fresco.
- Clermon: resistente a cuatro cepas de mildiu. Crecimiento rápido y hoja lisa.
- San Felix: vigoroso, resistente a cuatro cepas de mildiu. Precoz, poco resistente a la subida de flor. Hoja carnosa, color verde oscuro y muy productiva.
- Dolphin: ciclo corto y resistente a cinco cepas de mildiu. Su cultivo está poco extendido.
- Whale: ciclo largo y resistente a cinco cepas de mildiu. Su cultivo está poco extendido.

1.2. PRODUCCIÓN INTERNACIONAL DE ESPINACA

El cultivo de la espinaca en España se desarrolla fundamentalmente al aire libre en regadío; aunque está más indicado en los invernaderos de las zonas del interior. La producción de espinaca se puede destinar tanto a la industria como al mercado en fresco durante todo el año, mientras que en el norte y centro de Europa el periodo de producción es mucho más reducido (junio-octubre).

La quinta parte de la espinaca transformada por la industria española se destina a la exportación, siendo sus principales destinos los países del norte y centro de Europa, ya que éstos son grandes consumidores de espinacas.

El cultivo de la espinaca tiene muy buenas expectativas de futuro, especialmente el cultivo para industria debido al creciente mercado europeo. A continuación en la Tabla 1.1. se muestra la producción internacional de espinaca.

Tabla 1.1 Producción Internacional de Espinaca.

Países	Producción espinacas año 2001 (toneladas)	Producción espinacas año 2002 (toneladas)
China	7.411.000	7.811.000

Japón	319.300	320.000
Estados Unidos	283.540	328.180
Turquía	210.000	210.000
Bélgica-Luxemburgo	150.000	110.000
República de Corea	122.000	122.000
Francia	112.419	109.511
Italia	94.825	90.000
Indonesia	85.000	85.000
Pakistán	75.908	77.542
España	60.000	60.000
Alemania	59.453	55.139
Grecia	47.000	47.000
Países Bajos	35.000	40.000
México	27.218	27.000
Bangladesh	27.000	27.000
Portugal	14.000	14.000
Túnez	12.500	12.000
Perú	8.291	11.373
Austria	7.799	10.089
Hungría	7.000	11.000
República Checa	5.280	4.624
Australia	5.000	5.000

1.3. PRODUCCION NACIONAL DE ESPINACA

En la Tabla 1.2 que se muestra en seguida presenta los datos de la producción de espinaca de cada estado de la Republica Mexicana.

Tabla 1.2. Producción de espinaca y Zonas de Cultivo más importantes.

Estado	Producción (ton)
Aguascalientes	1273
Baja California	1332
Coahuila	2184
Chihuahua	29
Distrito Federal	1199
Durango	82
Guanajuato	1630
Jalisco	8
México	525
Michoacán	15
Puebla	3932
Sonora	1158
Tlaxcala	4875
Veracruz	13

La producción total en México es de 18240 toneladas. (Fuente INEGI: Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos, 2003 por Estado.)

El estado de Tlaxcala tiene como principal cultivo la espinaca que equivale al 26.7 % de la producción nacional, ocupando el 1er. lugar nacional de 14 estados.

1.4. PRODUCCIÓN REGIONAL

De acuerdo a la información de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, en el Concentrado Estatal del año agrícola del 2004 de la Delegación en el estado de Michoacán, en el valle de Zamora, Michoacán, se tiene una producción de 204 toneladas de espinacas.

Debido a que en el Valle de Zamora se tiene una tierra muy fértil para el cultivo; de y otras especies vegetales y leguminosas, como son: calabacita, cebolla blanca, col (repollo), ebo (janamargo o veza) forrajero, frijol flor de junio, frijol peruano, garbanzo grano, maíz grano blanco, pepino, sorgo grano, tomate rojo (jitomate), tomate verde, brócoli.

Fuente: Sistema SIACAP Delegación Michoacán.

1.5. OBJETIVO

- a) Mediante la experimentación a nivel laboratorio, encontrar las mejores condiciones y método de extracción de clorofila.
- b) Por espectrofotometría cuantificar el contenido de clorofila en las espinacas, para realizar el comparativo de rendimiento, entre la alfalfa y el tomate.
- c) Ofrecer una aplicación rentable, a la producción de espinaca en el Valle de Zamora, comprobable con un estudio económico.

1.6. JUSTIFICACIÓN

La clorofila, además de aportar energía proveniente de la fotosíntesis, desintoxica y oxigena nuestras células de forma muy efectiva, con la ventaja de ser un alimento 100% natural y extremadamente saludable. La clorofila es una fuente fácilmente digerible de vitaminas y minerales, que apoya la circulación sanguínea, intestino, riñones e hígado, al ayudar a equilibrar nuestro metabolismo. Es un suplemento alimenticio que tiene una actividad desodorizante. De gran utilidad para combatir los problemas de mal aliento ocasionados por el tabaco, bebidas alcohólicas y alimentos; ayuda a eliminar los olores provocados por la transpiración. Posee acción antioxidante. Nutre y fortalece el sistema circulatorio e intestinal. La clorofila posee un potencial anticarcinogénico y antimutagénico, puede ayudar a proteger contra algunas toxinas y pueden mejorar los efectos secundarios de algunos fármacos. Es efectiva en la reducción del olor urinario y fecal en algunas circunstancias pueden ayudar a aliviar el estreñimiento. Puede tener beneficio en el tratamiento de piedras de oxalato cálcico y pueden tener actividad antiaterogénica a la clorofila se le atribuyen importantes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Desde la antigüedad los alimentos de color verde, ricos en clorofila, han sido tradicionalmente usados para depurar, renovar y proteger el organismo. La clorofila es la demostración palpable de la fuerza vital de las plantas sobre la salud del hombre.

Debido a las diversas aplicaciones que presenta la clorofila, para el mejoramiento de salud, se pretende obtener clorofila a partir de espinacas ya a que en la actualidad la clorofila que se encuentra en el mercado es extraída de alfalfa, puesto que todos los vegetales verdes contienen clorofila, obviamente con distintos rendimientos.

Se propone obtenerla de espinaca debido a los enriquecidos nutrientes con los que cuenta la espinaca además que la hoja de espinaca es grande y con un color verde intenso más que el de la alfalfa, para obtener un mayor rendimiento.

1.7 ALCANCE

Comprobar el alto rendimiento de la extracción de clorofila a partir de espinaca, separar la clorofila del solvente para su recuperación. Encontrar las condiciones adecuadas para la extracción. La clorofila utilizada en uso oral demostró su capacidad de eliminación del olor corporal y mal aliento. Cuando la clorofila se toma en forma de dieta vegetariana no es totalmente liberada de dentro de las paredes celulares del tejido de la planta y consecuentemente no es absorbida. El daño y la alteración del ADN por genotóxicos medioambientales es una de las principales causas de cáncer y desórdenes genéticos. Se ha descubierto la acción protectora de la clorofila frente a ciertos genotóxicos como el diesel, el humo del tabaco y el polvo del alquitrán. Además de la clorofila, en los jugos verdes de las plantas podemos encontrar cantidades importantes de carotenos, de los que existen diferentes estudios que los relacionan con la disminución de riesgo a padecer cánceres epiteliales y otros tipos de cáncer, en especial por su riqueza en b-caroteno, xantofila y luteína.

Gracias al proceso de la fotosíntesis, las plantas absorben la energía del sol, las vitaminas y minerales de la tierra, concentrado todo en un super alimento llamado clorofila, que en la sangre de los humanos, es imprescindible para nuestra vida.

En la desintoxicación del organismo, las plantas juegan un papel importante en el proceso de eliminación y limpieza. Tienen un alto contenido de vitaminas y minerales y otros nutrientes que ayudan al cuerpo a mantener sus funciones en equilibrio.

1.8 HIPÓTESIS

De acuerdo a las investigaciones, la extracción de clorofila, industrialmente, solamente se ha realizado a partir de alfalfa y tomate. Por las características de las espinacas, se cree que se puede obtener un mayor rendimiento en la obtención de clorofila, buscando el método y condiciones a las que debe llevarse la extracción.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. Espinaca

La espinaca no es un cultivo sensible a la salinidad, es recomendable la aplicación de abonos que no incrementen la salinidad del suelo. Los abonos de la gama Nitrofoska han sustituido en sus fórmulas el cloruro potásico por sulfato potásico a fin de garantizar un efecto salinizante mínimo y evitar los daños de fitotoxicidad provocados por el cloro.

Además aportan adicionalmente azufre, un elemento necesario para la nutrición vegetal y frecuentemente olvidado.

La espinaca es muy exigente en nitrógeno y potasio, teniendo un pico de necesidades aproximadamente tres semanas antes de la cosecha.

Estudios recientes demuestran que con la aplicación mayoritaria del nitrógeno en forma amoniacal se obtienen cosechas de espinacas más elevadas y de mayor calidad.

Los abonos estabilizados, al contener una fracción nítrica y una fracción amoniacal estabilizada (se inhibe el paso a nitrógeno nítrico) se adaptan a los requerimientos de la espinaca. El amonio favorece la asimilación del fósforo, ante todo en suelos más bien alcalinos y ricos en calcio, y mejora la calidad de la cosecha al reducir la cantidad de ácido oxálico en hojas.

Es además conveniente tener en cuenta las limitaciones de nitratos en hoja que establecen algunos países de la comunidad europea de cara a la importación, la aplicación de nitrógeno en forma de amonio reduce la concentración de nitratos en hojas en aproximadamente un 10%-20%.

Como ya se ha dicho anteriormente, la espinaca se cultiva preferentemente sobre suelos ligeros, aspecto que conlleva un alto riesgo de pérdidas de nitrógeno por lavado. Los abonos estabilizados minimizan este efecto, ya que mantienen el

nitrógeno en forma estable en el suelo, permitiendo un alto rendimiento del nitrógeno.

Además el potasio confiere resistencia a condiciones ambientales adversas (heladas, sequía...) y ataque de enfermedades. En cuanto al fósforo, hay que tener precaución en no excederse, ya que favorece la subida a flor.

El magnesio, componente principal de la molécula de clorofila, interviene directamente en el desarrollo ya que la clorofila es la responsable de realizar la transformación de los nutrientes absorbidos en materia vegetal. La espinaca es un cultivo especialmente sensible a la carencia de magnesio.

2.1.1. Composición de la Espinaca

La espinaca es una verdura de hoja que pertenece a la familia de las Quenopodiáceas. Esta familia comprende unas 1.400 especies de plantas propias de zonas costeras o de terrenos salinos templados. El nombre de espinaca deriva del término spina o espina, debido a que los frutos de esta planta hortícola, cuando están en sazón, es decir, en su punto de maduración, se presentan armados de espinas.

Las espinacas están compuestas en su mayoría por agua. Su contenido de hidratos de carbono y grasas es muy bajo. Aunque tampoco tiene una cantidad muy alta de proteínas, es uno de los vegetales más ricos en este nutriente. Su contenido en fibra, al igual que ocurre con la gran mayoría de las verduras, es considerable, lo que resulta beneficioso para la salud.

2.1.2. Valor Nutricional

La espinaca es una hortaliza con un elevado valor nutricional y carácter regulador, debido a su elevado contenido en agua y riqueza en vitaminas y minerales. En la Tabla 2.1. se muestra la composición nutritiva de la espinaca.

Tabla 2.1 Composición nutritiva de la espinaca.

Composición nutritiva de las espinacas por 100 g de producto comestible (según Fersini, 1976; Wattt et al., 1975)	
Prótidos (g)	3.2-3.77
Lípidos (g)	0.3-0.65
Glúcidos (g)	3.59-4.3
Vitamina A (U.I.)	8.100-9.420
Vitamina B1 (mg)	110
Vitamina B2 (mg)	200
Vitamina C (mg)	59
Calcio (mg)	81-93
Fósforo (mg)	51-55
Hierro (mg)	3.0-3.1
Valor energético (cal)	26

Las espinacas destacan sobre todo por una riqueza en vitaminas y minerales que sobrepasa a la de la mayoría de los vegetales en general.

En relación con su riqueza vitamínica, las espinacas presentan cantidades elevadas de provitamina A y de vitaminas C y E, todas ellas de acción antioxidante. Asimismo es muy buena fuente de vitaminas del grupo B como folatos, B2, B6 y, en menor proporción, también se encuentran B3 y B1.

La provitamina A se transforma en vitamina A conforme el cuerpo la necesita. Dicha vitamina es esencial para la visión, el buen estado de la piel, el cabello, las mucosas, los huesos y para el buen funcionamiento del sistema inmunológico.

La vitamina C interviene en la formación de colágeno, glóbulos rojos, huesos y dientes, al tiempo que favorece la absorción del hierro de los alimentos y aumenta la resistencia frente las infecciones.

La vitamina E interviene en la estabilidad de las células sanguíneas y en la fertilidad.

Los folatos colaboran en la producción de glóbulos rojos y blancos, en la síntesis de material genético y en la formación de anticuerpos del sistema inmunológico. La vitamina B2 o Riboflavina se relaciona con la producción de anticuerpos y de glóbulos rojos, interviene en procesos de obtención de energía y en el mantenimiento del tejido epitelial de las mucosas.

En cuanto a su contenido en minerales, las espinacas son ricas en calcio, hierro, magnesio, potasio, sodio, además de presentar también buenas cantidades de fósforo y yodo. Lo que ocurre es que el calcio es de peor aprovechamiento que el que procede de los lácteos u otros alimentos que son fuente importante de este mineral. Algo similar ocurre con el hierro, cuya absorción es mucho mayor cuando procede de alimentos de origen animal.

El magnesio se relaciona con el funcionamiento de intestino, nervios y músculos. Además, forma parte de huesos y dientes, mejora la inmunidad y posee un suave efecto laxante.

El potasio, al igual que el sodio, es un mineral necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso y para la actividad muscular normal. Regula también el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula.

El fósforo tiene una importante función estructural. Forma parte de huesos y dientes y colabora en los procesos de obtención de energía.

El yodo es indispensable para el buen funcionamiento de la glándula tiroidea, que regula el metabolismo.

De su contenido de sustancias antioxidantes, además de la provitamina A y de las vitaminas C y E, las espinacas son ricas en glutatión, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido beta-cumárico y carotenoides como la luteína y la zeaxantina. Éstos últimos son compuestos muy importantes para la salud de los ojos.

2.1.3. Taxonomía y Morfología.

Familia: chenopodiaceae.

Especie: Spinacea Oleracea L.

Planta: es una primera fase forma una roseta de hojas de duración variable según condiciones climáticas y posteriormente emite el tallo. De las axilas de las hojas o

directamente del cuello surgen tallitos laterales que dan lugar a ramificaciones secundarias, en las que pueden desarrollarse flores. Existen plantas masculinas, femeninas e incluso hemafroditas, que se diferencian fácilmente, ya que las femeninas poseen mayor número de hojas basales, tardan más en desarrollar la semilla y por ello son más productivas.

Sistema radicular: raíz pivotante, poco ramificada y de desarrollo radicular superficial.

Tallo: erecto de 30 cm. a 1 m de longitud en el que se sitúan las flores.

Hojas caulíferas, más o menos alternas y pecioladas, de forma y consistencia muy variables, en función de la variedad. Color verde oscuro. Pecíolo cóncavo y a menudo rojo en su base, con longitud variable, que va disminuyendo poco a poco a medida que soporta las hojas de más reciente formación y va desapareciendo en las hojas que se sitúan en la parte más alta del tallo.

Flores: las flores masculina, agrupadas en número de 6-12 en las espigas terminales o axiales presentan color verde y están formadas por un periantio con 4-5 pétalos y 4 estambres. Las flores femeninas se reúnen en glomérulos axiales y están formadas por un periantio bi o tetradentado, con ovarios uniovulares, estilo único y estigma dividido en 3-5 segmentos.

2.1.4. Cultivo

Estadísticas del Cultivo de Espinaca en México.

Tabla 2.2 Rendimiento del cultivo de Espinaca (Primavera-Verano 2003/2003).

	Rendimiento (Ton/Ha)
--	-----------------------------

Estado	Riego	Temporal	Total
Aguascalientes	19		19
Baja California	9.643		9.643
Chihuahua	9.500		9.500
Coahuila	42.00		42.00
Distrito Federal	10.192	10.00	10.149
Durango	12.00		12.00
Guanajuato	6.767		6.767
Jalisco	8.00		8.00
México	11.653	9.160	9.832
Puebla	9.534	9.00	9.496
Tlaxcala	30.00		30.00

Tabla 2.3. Cultivo de Espinaca año agrícola 2003.

Superficie Cosechada (Ha)			Producción (Ton)		
Riego	Temporal	Total	Riego	Temporal	Total
67		67	1273		1273
160		160	1332		1332
3		3	29	2	29
52		52	2184		2184

100	15	115	1049	150	1199
7		7	82		82
231		231	1630		1630
1		1	8		8
14	39	53	168	357	525
5		5	15		15
392	25	417	3707	225	3932
96		96	1158		1158
240		240	4875		4875
3		3	13		13

Fuente INEGI: Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos, 2003 por Estado.

En las Tablas 2.2. y 2.3. se muestran los datos más recientes, registrados por el INEGI.

2.1.5. Requerimientos Edafoclimáticos.

La espinaca soporta temperaturas por debajo de 0° C, que si persisten bastante, además de originar lesiones foliares, producen una detención total del crecimiento, por lo que el cultivo no rinde lo suficiente. La temperatura mínima mensual de crecimiento es aproximadamente 5° C. La adaptabilidad a las temperaturas bajas es de gran importancia práctica, dado que la mayor demanda de esta verdura coincide con el período otoñal-primaveral.

Las condiciones de iluminación y temperatura influyen decisivamente sobre la duración del estado de roseta. Al alargarse los días (más de 14 horas de luz diurna) y al superar la temperatura los 15° C, las plantas pasan de la fase vegetativa (roseta) a la de “elevación” y producción (emisión de tallo y flores). La producción se reduce mucho si el calor es excesivo y largo el fotoperiodo, dado que las plantas permanecen en la fase de roseta muy poco tiempo, con lo que no se alcanza un crecimiento adecuado.

Las espinacas que se han desarrollado a temperaturas muy bajas (5-15°C de media mensual), en días muy cortos, típicos de los meses invernales, florecen más rápidamente y en un porcentaje mayor que las desarrolladas también en

fotoperiodos cortos, pero con temperaturas más elevadas (15-26°C). También las lluvias irregulares son perjudiciales para la buena producción de espinacas y la sequía provoca una rápida elevación, especialmente si se acompaña de temperaturas elevadas y de días largos.

Es una especie bastante exigente en cuanto a suelo y prefiere terrenos fértiles, de buena estructura física y de reacción química equilibrada. Por tanto, el terreno debe ser fértil, profundo, bien drenado, de consistencia media, ligeramente suelto, rico en materia orgánica y nitrógeno, del que la espinaca es muy exigente. No debe secarse fácilmente, ni permitir el estancamiento de agua. En suelos ácidos con pH inferior a 6,5 se desarrolla mal, a pH ligeramente alcalino se produce el enrojecimiento del pecíolo y a pH muy elevado es muy susceptible a la clorosis.

2.1.6 Mejora Genética

Los objetivos que se persiguen en la Mejora Genética de la espinaca son los siguientes: mantener el estado en roseta el mayor tiempo posible, incrementar los rendimientos, porte de la planta (erecta y compacta), adecuar el tipo de hoja según el destino, resistencia al frío, resistencia al amarillamiento, resistencia a enfermedades.

2.1.7 Plagas y Enfermedades.

Plagas

a) Nematodo de la remolacha (*Heterodera schachtii* Smith)

Se observan nudosidades que llevan consigo el marchitamiento de las plantas.

Control:

Utilizar nematocidas como Dicloropropeno, Metam-sodio, etc., previamente a la plantación.

b) Pegomia o mosca de la remolacha (*Pegomya betae* Curtis)

Los adultos tienen la cabeza grisácea con una raya roja en la parte frontal; los ojos son rosados y las patas amarillas. Las larvas miden aproximadamente 6-7 mm de longitud. Los daños son producidos por las larvas, pues perforan la epidermis y

penetran en el interior de los tejidos del limbo, formando galerías que, cuando se unen varias, forman manchas de aspecto plateado, blandas al tacto y color pardusco, llegando a ocupar gran parte de la hoja.

Tienen tres generaciones al año. Las hojas de espinaca no pueden soportar ataques muy graves, pues pierden en seguida su valor comercial.

Control:

Lucha química mediante pulverizaciones dirigidas contra las larvas, respetando los plazos de seguridad. Este tratamiento debe aplicarse lo más pronto posible después de haber detectado la presencia de las primeras larvas. También se pueden realizar tratamientos dirigidos a los adultos con productos de contacto.

c) Pulgones (*Aphis fabae* Scop y *Myzus persicae* Sulz)

En el envés de las hojas se desarrollan colonias, provocando un cispamiento del follaje.

Un ataque de pulgón si está muy avanzado el desarrollo de la espinaca y cercana su recolección, puede inutilizar comercialmente toda la producción, debido al aspecto desagradable que toma la hortaliza.

En la tabla 2.4. se muestra la pulverización con aficidas.

Tabla 2.4 Pulverización con aficidas

Materia activa	Dosis	Presentación del producto.
Alfa Cipermetrin 5%	0.06-0.08%	Suspensión concentrada
Cipermetrin 10%	0.05-0.01%	Concentrado emulsionable
Cipermetrin 2% + Metil Pirimifos 25%	0.20-0.25%	Concentrado emulsionable
Cipermetrin 2.5% + Fenitrothion	0.08-0.15%	Concentrado emulsionable

Cipermetrin 20%	0.04-0.05%	Polvo mojable
Cipermetrin 4% + Metomilo 12%	0.10-0.15%	Concentrado emulsionable
Deltametrin 2.5%	0.03-0.05%	Concentrado emulsionable
Deltametrin 2.5% + Heptenofos 40%	0.05%	Concentrado emulsionable
Permetrin 25%	0.02-0.04%	Concentrado emulsionable

Enfermedades

a) Mildiu de la espinaca (*Peronospora spinaceae* Laub, *P. farinosa* y *P. efusa* (Gw) Tul)

En el haz aparecen manchas de contorno indefinido, con un color verde pálido que más tarde pasa a amarillo. En el envés estas manchas se cubren con un abundante afieltrado gris violáceo. Se produce con altas humedades relativas.

Control.

Rotaciones de cultivos.

Desinfección de las semillas.

Empleo de variedades resistentes.

Aplicaciones preventivas a base de: Captan, Captafol, Propineb, Maneb, etc.

Tratamientos curativos con pulverizaciones a base de: Metalaxil, Cimoxanilo, Oxadixil, Benalaxil, etc., especialmente mezclas con Oxicloruro de cobre, Mancozeb, etc.

b) *Pythium baryanum* Hesse

El follaje se marchita y se vuelve clorótico. La raíz principal se encuentra necrosada desde su extremidad hasta unos 8-10 mm del cuello.

Control.

Tratamientos con TMTD, Captan, etc., pueden tener cierta eficacia.

Virosis

Virus I del pepino. Síntomas: mosaicos deformantes, acompañados de estados cloróticos. Se transmite mediante pulgones.

Mosaico de la remolacha. Síntomas: pequeñas manchas claras de diámetro inferior al milímetro, con un punto negro en su centro. Se transmite mediante pulgones.

Amarillamiento de la remolacha. Síntomas: amarillamiento y necrosis internerviales, especialmente sobre hojas viejas.

2.1.8 Recolección

La recolección se inicia en las variedades precoces a los 40-50 días tras la siembra y a los 60 días después de la siembra con raíz incluida; oscilando las producciones óptimas entre 15 y 20 Tn/ha. La recolección nunca se realizará después de un riego, ya que las hojas se ponen turgentes y son más susceptibles de romperse. Puede efectuarse de dos formas principalmente: manual o mecanizada.

La recolección manual consiste en cortar las hojas más desarrolladas de la espinaca, dando aproximadamente 5 ó 6 pasadas a un cultivo. Si se pretende comercializar plantas enteras, se corta cada planta por debajo de la roseta de hojas a 1cm bajo tierra, en este caso se dará solo una pasada. Si la espinaca se destina a la industria la recolección será mecanizada empleando cosechadoras autopropulsadas, éstas constan de una barra de corte de altura regulable y anchura variable (1-3 m), una cinta transportadora de producto y una tolva. En algunas zonas se realiza un segundo corte unos 10-15 días más tarde de la primera recolección mecánica, dando lugar a una segunda cosecha. Sin embargo, la calidad del producto que se obtiene en este segundo corte es muy inferior.

2.1.9 NORMAS DE CALIDAD PARA ESPINACAS EN ESTADO FRESCO DESTINADAS AL MERCADO INTERIOR

a) Características

En todas las categorías las espinacas deben ser: sanas, de aspecto fresco, limpias, prácticamente desprovistas de tierra, exentas de residuos visibles de abonos o de productos fitosanitarios, exentas de pináculo floral, de olor y/o sabor extraños.

Para las espinacas en plantas, la raíz debe estar cortada inmediatamente por debajo de la base de las hojas exteriores.

Las espinacas deben presentar un desarrollo suficiente y un estado tal que les permita: soportar la manipulación y el transporte, responder en el lugar de destino a las exigencias comerciales.

b) Clasificación

Categoría "I": las espinacas en hojas y las espinacas en plantas clasificadas en esta categoría deben ser de buena calidad.

Las hojas deben ser: enteras, con coloración y aspectos normales, teniendo en cuenta la variedad y la época de recolección, exentas de daños causados por heladas, parásitos animales y por enfermedades que afecten a su aspecto o a su comestibilidad, la longitud del pecíolo de las espinacas en hojas no debe sobrepasar diez centímetros.

Categoría "II": esta categoría comprende las espinacas en hojas o en plantas que no pueden clasificarse en la categoría "I", pero que responden a las categorías mínimas de calidad.

c) Tolerancias

Se admiten tolerancias de calidad en cada envase para los productos que no respondan a las exigencias de la categoría indicada en el mismo.

Categoría "I": 10%, en masa, de espinacas que no respondan a las características de la categoría pero conformes con los de la categoría "II".

Categoría "II": 10%, en masa, de espinacas que no responda a las características de la categoría, pero aptas para el consumo.

Además para las espinacas en plantas, se admite un 10%, en masa, de plantas cuyas raíces puedan alcanzar un centímetro, como máximo, a partir de la corona exterior de las hojas.

c) Envasado y presentación

El contenido de cada envase debe ser homogéneo; compuesto únicamente de espinacas del mismo origen, variedad y calidad.

Está prohibido mezclar en el mismo envase espinacas en hojas y plantas de espinacas.

La parte visible del contenido del envase debe ser representativa del conjunto.

El acondicionamiento debe ser tal que asegure una protección conveniente del producto.

Los materiales utilizados en el interior del envase deben ser nuevos, limpios y de naturaleza tal que no puedan causar a los productos alteraciones externas o internas.

El producto debe estar exento de todo cuerpo extraño después de su acondicionamiento, incluidos los pináculos florales aislados, hojas marchitas y malas hierbas.

Los envases se presentarán limpios y en perfectas condiciones higiénico-sanitarias.

d) Características comerciales

Para permitir una mejor identificación de las categorías comerciales, las etiquetas utilizadas o el fondo sobre el que se impriman directamente sobre el envase los datos del etiquetado obligatorio, serán de los siguientes colores:

Verde para la categoría "I".

Amarillo para la categoría "II".

2.2. INDUSTRIALIZACION DE ESPINACA

2.2.1. Obtención de Clorofila

La clorofila es un suplemento alimenticio que tiene una gran actividad desodorizante. Es un compuesto químico principalmente a partir de vegetales verdes. Para el consumo humano las fuentes principales de este producto son la alfalfa, y en menor cantidad del tomate. Entre sus grandes aplicaciones están: su adición a productos comerciales para combatir los problemas de mal aliento, posee acción antioxidante, nutre y fortalece el sistema circulatorio e intestinal, además se le atribuye potencial anticarcinogénico y antimutagénico, ayuda a aliviar el

estreñimiento. Puede ser benéfico en el tratamiento de piedras de oxalato cálcico a la clorofila se le atribuyen importantes propiedades antiinflamatorias.

2.2.2. Clorofila

Clorofila (del griego khloros = verde claro, verde amarillento; phylos = hoja). La Clorofila es un pigmento que da el color verde a los vegetales y que se encarga de absorber la luz necesaria para realizar la fotosíntesis, proceso que transforma la energía luminosa en energía química. La clorofila absorbe sobre todo la luz roja, violeta y azul, y refleja la verde. La gran concentración de clorofila en las hojas y su presencia ocasional en otros tejidos vegetales, como los tallos, tiñen de verde estas partes de las plantas. En algunas hojas, la clorofila está enmascarada por otros pigmentos. En otoño, la clorofila de las hojas de los árboles se descompone, y ocupan su lugar otros pigmentos. La molécula de clorofila, mostrada en la figura 2.1, está formada en su mayor parte por carbono e hidrógeno; el centro lo ocupa un único átomo de magnesio rodeado por un grupo de átomos que contienen nitrógeno y se llama anillo de porfirinas. De este núcleo central parte una larga cadena de átomos de carbono e hidrógeno que une la molécula de clorofila a la membrana interna del cloroplasto, el orgánulo celular donde tiene lugar la fotosíntesis. Cuando la molécula de clorofila absorbe un fotón, sus electrones se excitan y saltan a un nivel de energía superior, esto inicia en el cloroplasto, una compleja serie de reacciones que dan lugar al almacenamiento de energía en forma de enlaces químicos.

Las clorofilas son los pigmentos responsables del color verde de las hojas de los vegetales y de los frutos inmaduros. Son piezas claves en la fotosíntesis, proceso que permite transformar la energía solar en energía química, y finalmente a partir de ella producir alimentos para todos los seres vivos y mantener el nivel de oxígeno en la atmósfera. Por esta razón han sido estudiadas muy extensamente. Se ha dicho de ellas que son las sustancias químicas más importantes sobre la superficie de la Tierra.

Las plantas superiores tienen dos tipos de clorofila muy semejantes entre ellas, denominadas la “a” y la “b”, siendo la primera la mayoritaria y la que se degrada más fácilmente. Son químicamente muy complicadas, y solo en 1940 se pudo averiguar su estructura completa. Incluyen un átomo de magnesio dentro de su molécula. El interés por la clorofila en tecnología alimentaría no estriba tanto en su uso como aditivo sino en evitar que se degrade durante el procesado y almacenamiento la que está presente en forma natural en los alimentos de origen vegetal. El calentamiento hace que las clorofilas pierdan el magnesio, transformándose en otras sustancias llamadas feofitinas y cambiando su color verde característico por un color pardo oliváceo mucho menos atractivo. Este efecto puede producirse en el escaldado de las verduras previo a su congelación, en el enlatado, etc. También le afecta el oxígeno, la luz y la acidez, resistiendo mal además los periodos de almacenamiento prolongados.

Las clorofilas, que en los vegetales se encuentran dentro de ciertos orgánulos, son insolubles en agua pero solubles en alcohol, con el que pueden extraerse. Las clorofilinas son derivados algo más sencillos obtenidos por rotura parcial de las clorofilas. La substitución del magnesio por cobre da lugar al colorante.

Se encuentran prácticamente en todas las plantas con semilla, helechos, musgos y algas. Pueden formarse en las raíces, tallos, hojas y frutos a condición de que estos órganos estén situados por encima del suelo y queden expuestos a la luz. También aunque aparentemente falten en algunas hojas de color rojo o amarillo, cuando se extraen las otras sustancias colorantes de estas, puede comprobarse incluso allí la presencia de las clorofilas, que estaban enmascaradas por los demás pigmentos.

La estructura de la clorofila puede sufrir cambios en función de las condiciones; en condiciones ácidas con presencia de enzimas la estructura se va a modificar provocando cambios de color.

Se diferencia por su solubilidad, la clorofila y la feofitina son liposolubles y los clorofilidos y los feofórbidos son hidrosolubles. También se puede degradar completamente la estructura de la clorofila y dar productos incoloro.

Durante el procesado de los vegetales se habla de la feofitización que es la formación de feofitina adquiriendo el vegetal un color parduzco. Para evitar este proceso se alcaliniza el medio. Es común añadir bases al medio de cocción de los vegetales. También se recurre a la adición de pigmentos artificiales como un

derivado de la clorofila que es la clorofilina de Na y Cu. A esta clorofilina se le ha eliminado el fitol y se sustituye el magnesio por cobre o por sodio. Es hidrosoluble por lo que es adecuada para la cocción de los productos vegetales.

Las clorofilas son estables en medio alcalino, pero se transforman en presencia de ácidos débiles, lo que determina la separación del Magnesio de la molécula, convirtiéndose en feofitina. Los espectros infrarrojos y de masa de los derivados de clorofila obtenidos en el proceso de extracción del follaje de pino demostraron alto grado de oxidación (Loventale, V., 1989).

La clorofila y la clorofilina poseen potencial anticarcinogénico y antimutagénico, pueden ayudar a proteger contra algunas toxinas y pueden mejorar los efectos secundarios de algunos fármacos.

Las moléculas de clorofila en las membranas tilacoidales están ligadas a proteínas integrales de membrana (fijadoras de clorofila a o b, o proteínas CAB 1) que orientan a la clorofila con respecto al plano de la membrana y le confieren propiedades para la absorción de la luz ligeramente diferentes de las de la clorofila libre. Cuando una molécula de clorofila (o un pigmento accesorio) absorbe un fotón se excita y –en lugar de emitir fluorescencia– transfiere la energía por resonancia a una molécula de clorofila vecina y retorna a su estado basal. El proceso se repite varias veces hasta que se excita la clorofila del centro de reacción, donde se promueve el pasaje de un electrón a un orbital de energía superior, de donde finalmente es cedido a un aceptor electrónico vecino que forma parte de la cadena de transportadores de electrones y que darán como resultado final la generación de ATP y de NADPH.

Las membranas tilacoides tienen dos tipos de fotosistemas, cada uno de ellos con su centro de reacción y su conjunto de moléculas antena. Los dos fotosistemas tienen funciones distintas y complementarias. El fotosistema I tiene un centro de reacción denominado P700 y una elevada proporción de clorofila a en relación con la clorofila b. El fotosistema II, con su centro de reacción P680, contiene cantidades aproximadamente iguales de ambas clorofilas y puede tener también clorofila c. Todas las plantas superiores, algas y cianobacterias tienen ambos fotosistemas, pero las bacterias fotosintéticas, que no desprenden oxígeno, sólo tienen el

fotosistema I, ya que no utilizan el agua como dador de átomos de hidrógeno sino al sulfuro de hidrógeno (SH_2) o directamente al hidrógeno molecular.

Se diferencia por su solubilidad, la clorofila y la feofitina son liposolubles y los clorofilidos y los feofórbidos son hidrosolubles. También se puede degradar completamente la estructura de la clorofila y dar productos incoloro.

Durante el procesado de los vegetales se habla de la feofitización que es la formación de feofitina adquiriendo el vegetal un color parduzco. Para evitar este proceso se alcaliniza el medio. Es común añadir bases al medio de cocción de los vegetales.

2.2.3. Características y propiedades de la clorofila

a) PRESENTACIÓN

Líquido hidrosoluble

Líquido liposoluble

Polvo hidrosoluble

b) ESTABILIDAD

Al calor: Media

A la luz: Media

A los ácidos: Media – Buena

c) COLORACIÓN

Verde, verde – amarillo

Procedimiento de obtención del extracto

Materia prima: espinaca seca, espinaca fresca.

Procedimiento: Extracción de clorofila a partir de espinacas por maceración y extracción Soxhlet con un disolvente.

d) CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS.

Soporte de secado: maltodextrinas

Humedad: < 5 %

Granulometría laser : $D(v,0.5) : < 100 \mu\text{m}$

pH (solución al 0.1 % m/v en H_2O a 25 °C): 9,5 - 10,5

Tabla 2.5 Solubilidad de la Clorofila.

Solubilidad	H ₂ O	H ₂ O/EtOH (50/50)	EtOH
	Buena a media	Media	Media

2.2.4. Tipos de Clorofila

Hay varios tipos de clorofilas que se diferencian en detalles de su estructura molecular y que absorben longitudes de onda luminosas algo distintas. El tipo más común es la clorofila (a), que constituye aproximadamente el 75% de toda la clorofila de las plantas verdes.

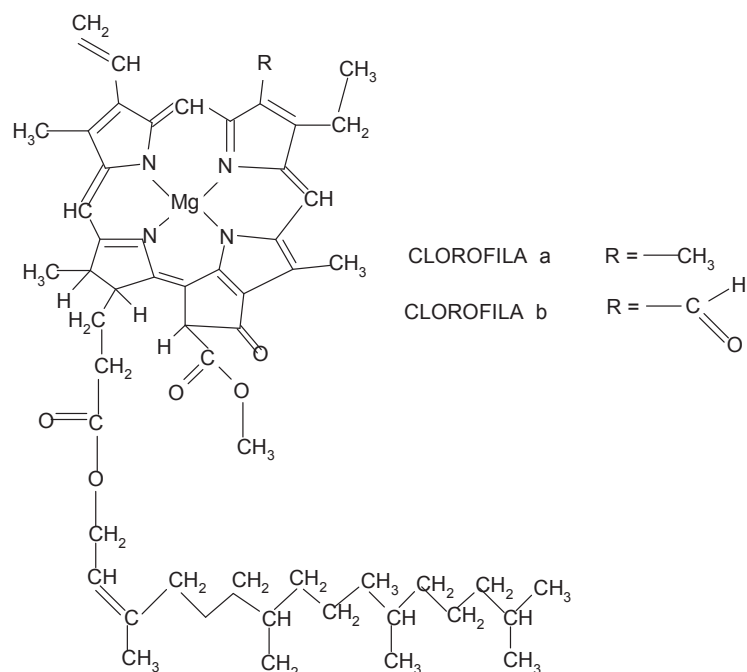


Fig. 2.1 Estructura de las clorofilas a y b

Tal como se observa en la fig. 2.1 la fórmula de la clorofila es una molécula compleja que posee un átomo de magnesio en el centro, mantenido por un anillo de porfirinas. Numerosas modificaciones de la clorofila se encuentran entre las plantas y otros organismos fotosintéticos (plantas, algunos protistas, proclorobacteria y cianobacterias). Los pigmentos accesorios que incluyen a la clorofila b y los carotenoides, como el beta caroteno y las xantofilas (carotenoide de color amarillo), absorben la energía no absorbida por la clorofila. La clorofila a (R = —CHO)

absorbe sus energías de longitudes de onda correspondientes a los colores que van del violeta azulado al anaranjado-rojizo y rojo. Además de las clorofilas a y b, las células de las plantas verdes contienen también varios carotenoides. Estas moléculas también son pigmentos, cuyos colores van del rojo al amarillo. Los carotenoides son a menudo los pigmentos dominantes en las flores y frutos.

En las plantas hay una proporción de 3/1 entre clorofila a y clorofila b.

En las hojas de las plantas es donde se realiza la fotosíntesis, debido a la captación de energía luminosa con intervención de la clorofila a, junto con una cantidad menor de clorofila b. Todas las formas de clorofila tienen la misma estructura de porfirina con los anillos pirrólicos unidos por sus átomos de Nitrógeno a un átomo de Magnesio que ocupa la posición central de la molécula, un quinto anillo, constituido únicamente por átomos de carbono. En las hojas de las plantas es donde se realiza la fotosíntesis, debido a la captación de energía luminosa con intervención de la clorofila a, junto con una cantidad menor de clorofila b. Todas las formas de clorofila tienen la misma estructura de porfirina con los anillos pirrólicos unidos por sus átomos de Nitrógeno a un átomo de Magnesio que ocupa la posición central de la molécula, un quinto anillo, constituido únicamente por átomos de carbono, el grupo propanoico en posición 7 esterificado con una molécula de fitol, siendo este un terpenoide de 20 átomos de carbono. La clorofila a tiene un grupo metilo en posición tres, mientras que la clorofila b presenta en esta posición un grupo aldehído (Yagodin, V. I., 1981; Guardiola, J. L., 1995).

El máximo de absorción de la clorofila b en disolución de éter etílico es a una longitud de onda en 642 nm y la clorofila a en 660 nm (Bachanova, H. V., 1964; Kalenin, F. L., 1971) citados por Yagodin, V. I. (1981) y Guardiola, J. L. (1995) enoide de 20 átomos de carbono. La clorofila a tiene un grupo metilo en posición tres, mientras que la clorofila b presenta en esta posición un grupo aldehído (Yagodin, V. I., 1981; Guardiola, J. L., 1995).

2.2.5. Degradación de Clorofilas y Feofitinas a Diferentes Temperaturas.

El color verde de las hojas y frutas semimaduras se debe a las clorofilas a (verde azulado) y clorofilas b (verdenamarillento) que se encuentran en relación 3:1. Por eliminación del Mg las clorofilas se transforman en feofitinas a y b, que son de color oliva parduzco. La sustitución del ión Mg^{++} por Fe^{++} y Sn^{++} da lugar a la formación de productos pardo-grisáceos. Se comprueba que el calentamiento a temperaturas elevadas y tiempos cortos mantienen mejor el color que tiempos largos y temperaturas bajas (Belitz, Grosch). Van Loey et al reportan que en jugo de brócoli sometido a tratamiento de altas presiones y temperaturas, las feofitinas se degradan a temperaturas mayores a $70^{\circ}C$. A presión atmosférica y temperaturas iguales o superiores a $70^{\circ}C$, el decaimiento en el color verde ocurre en dos etapas, la feofitinización, con una energía de activación de 71 KJ/mol y la pirifeofitinización con 105 KJ/mol.

En el proceso de obtención de yerba mate, las etapas de zapecado, presecado y secado las temperaturas superan los $100^{\circ}C$ y los tiempos van del orden de pocos minutos para zapecado y preseco a unas 2- 2.5 hs en el secadero con variaciones importantes en el contenido de clorofilas (Smalko, Alzadora-2001). El estacionamiento acelerado, con temperaturas del orden de los $50-60^{\circ}C$ y tiempos de hasta 30-40 días influye en la coloración del material notablemente. En el estacionamiento natural el tiempo para lograr el mismo cambio en el contenido de clorofilas es de 9 a 12 meses.

Avanza & col.(1979), en sus trabajos para APRYMA, estudiaron la cinética de degradación de las clorofilas a, b a diferentes temperaturas y granulometría del material. Como resultado obtuvieron que la degradación siga una ley de orden uno, con la verificación de los valores de velocidades específicas para distintas temperaturas. No observaron cambios en la degradación al correlacionarlas con la granulometría del material.

Montiel et al (1996) estudiaron la degradación de clorofilas a-b a distintas temperaturas de almacenamiento en yerba "tipo Brasil", informando una energía de activación del orden de los 50 KJ/mol.

El estudio de la degradación de las clorofilas y su pasaje a las correspondientes feofitinas en material procesado industrialmente, tiene como objetivo final conocer la estabilidad en el tiempo de estacionamiento, tanto “natural” como “acelerado”.

El contenido de feofitinas supera al de clorofilas en las dos especies, esto responde a la conversión de las clorofilas de la hoja fresca a las correspondientes feofitinas por acción de los tratamientos térmicos durante el procesamiento.

El proceso de degradación de clorofilas (a,b) para ambas especies responde a una cinética de primer orden.

La degradación de las de las feofitinas (a,b) a pirofeofitinas aparece como una reacción consecutiva, lo que explicaría los incrementos iniciales en el contenido de éstas según se manifiesta a temperaturas bajas.

El decrecimiento del contenido de feofitinas responde también a una cinética de primer orden.

La velocidad de degradación de clorofilas (a,b) se ven fuertemente influenciados por el aumento de la temperatura.

2.2.6. Aplicaciones de Clorofila

La clorofila tiene un auge en las aplicaciones sobre todo como un producto naturalista que tiene las siguientes aplicaciones:

Ayuda a cada sistema de nuestro cuerpo, proporcionándole soporte y refuerzo para mejorar su actividad.

Sistema Digestivo: Ayuda a la buena digestión por su aporte de enzimas y evita el mal aliento.

Sistema Intestinal: Desodoriza las heces fecales, ayuda a la producción de las bacterias clónicas benéficas y cicatrización para pequeñas ulceraciones.

Sistema Circulatorio: Incrementa la producción de glóbulos rojos, ayuda a eliminar grasas en la sangre y baja los riesgos circulatorios por su acción antioxidante.

Sistema Nervioso: Es un relajante para el sistema nervioso por su contenido de Complejo B.

Sistema Inmunológico: Incrementa la producción de células de defensa y ayuda a la eliminación de tóxicos en la sangre. Apoyo en el tratamiento de cáncer.

Sistema Respiratorio: Es un agente indispensable para la buena oxigenación de nuestro cuerpo.

Sistema Urinario: Los riñones trabajan eficazmente eliminando el exceso de líquidos, toxinas del cuerpo, mejorando la diuresis.

Sistema Glandular: Estimula la producción de hormonas por su acción estroénicas. Desintoxica el hígado y páncreas, mejorando su funcionamiento.

Sistema Estructural. Equilibra los niveles de calcio en el cuerpo, evitando la osteoporosis. Rejuvenece la piel.

2.3. MÉTODOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO

2.3.1 Destilación Simple.

Se usa para separar de líquidos (con *p.e.* $<150^{\circ}\text{C}$) de impurezas no volátiles, o bien separar mezclas de líquidos miscibles que difieran en su *p.e.* al menos en 25°C . Además, dichos líquidos deben presentar puntos de ebullición inferiores a 150°C a presión atmosférica. Para que la ebullición sea homogénea y no se produzcan proyecciones se introduce en el matraz un trozo de plato poroso (o agitación magnética).

La separación y purificación de líquidos por destilación constituye una de las principales técnicas para purificar líquidos volátiles. La destilación hace uso de la diferencia entre los puntos de ebullición de las sustancias que constituyen una mezcla.

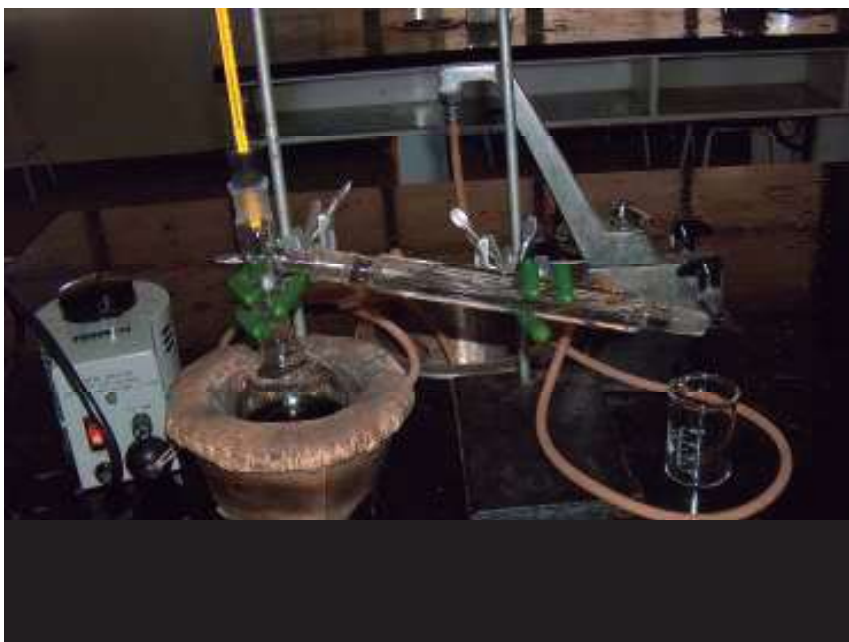


Fig. 2.2 Destilación Simple

2.3.2. Maceración (Extracción).

Machacar en un vaso de precipitado de 250 ml el vegetal (hojas de espinacas), con acetona al 80%.

Dejar macerar un tiempo, agitar y filtrar el líquido obtenido. La solución esta formada por tres pigmentos: la clorofila de color verde, los carotenoides naranjas y las xantofilas amarillas. El material vegetal pulverizado se deposita en un recipiente de buena capacidad, de manera que éste no ocupe más de las dos terceras partes del mismo. Se agrega una solución de acetona al 80 % en una proporción de cinco veces el peso del material pulverizado. La mezcla se deja en reposo, agitándola periódicamente con movimientos circulares.

La extracción es una técnica de separación que se puede aplicar a todo tipo de mezclas, ya sean éstas sólidas, líquidas o gaseosas. La extracción se basa en la diferencia de solubilidad de los componentes de una mezcla en un disolvente adecuado. La forma más simple de realizar una extracción consiste en tratar la mezcla de compuestos con un disolvente de manera que uno de los componentes se disuelva y los demás no. Sin embargo, la técnica de extracción más empleada consiste en la disolución de la mezcla a separar en un disolvente que disuelva a

todos los componentes. A continuación, se procede a la adición de un segundo disolvente, no miscible con el primero, de manera que los componentes de la mezcla se distribuyan entre los dos disolventes según su coeficiente de reparto, que está directamente relacionado con la solubilidad de cada compuesto. Si algún componente de la mezcla es muy soluble en uno de los disolventes y muy poco en el otro quedará prácticamente todo en el que es soluble, mientras que los otros componentes de la mezcla quedarán en el otro disolvente. La separación de los dos disolventes y su evaporación suministrará residuos enriquecidos en los componentes más solubles.

2.3.3. Técnica de espectrofotometría

La base teórica de la espectrofotometría es la incidencia de una fuente de energía sobre la muestra. Se coloca una lámpara uniforme de gran intensidad encendida frente a un espectroscopio, el cual en su parte anterior presenta un orificio por donde pasa el haz de luz. Seguidamente hay un prisma que descompone la luz y la proyecta en una pantalla, en la cual se puede observar con una lente ocular, los diversos colores mencionados anteriormente. Colocar entre la lámpara y el aparato una celda conteniendo el extracto-solvente de las hojas verdes, el aparato hace un comparativo y da lectura de absorbancia.

La principal propiedad fisicoquímica responsable de este hecho es la elevada absorbancia que presenta la clorofila en el intervalo de longitudes de onda entre 645 nm y 663 nm (ver la figura más abajo). La molécula de clorofila puede absorber un fotón de estas longitudes de onda al excitar un electrón de los que ocupan los orbitales moleculares que forman los dobles enlaces conjugados C=C y C=N de la estructura central que rodea al átomo de magnesio. Existen dos tipos principales de clorofila, la clorofila a y la clorofila b, que se diferencian por la presencia de un grupo CH₃ o CHO, respectivamente. La presencia de este grupo funcional altera ligeramente la estructura y energía de los dobles enlaces conjugados, dando lugar a espectros de absorción distintos para cada tipo de clorofila.

Así, la clorofila a en disolución alcohólica presenta máximos de absorción en 645 nm y 663 nm, mientras que la clorofila b los presenta en 645 nm y 663 nm. La posición exacta de estos máximos depende del disolvente que se utilice. Nosotros

trabajaremos con acetona al 80%, por lo que es de esperar que los máximos de absorción estén sólo unos pocos nanómetros desplazados respecto de estos valores.

2.3.4 Extracción Soxhlet.

Se llena completamente con material vegetal pulverizado, la campana de extracción de un equipo Soxhlet.

En un matraz de bola de 500 ml se deposita acetona al 80 % hasta un 75 % de la capacidad del mismo y se conecta a la campana de extracción.

El matraz de bola de 500 ml con la acetona es calentado, iniciándose el proceso de extracción continua, hasta que la acetona pierde coloración, obteniendo un color verde cada vez más intenso según el número de etapas de extracción. Al material así obtenido, se le retira el solvente mediante Destilación simple y se obtiene la clorofila.

La figura 2.3, muestra la extracción por equipo Soxhlet.



Fig. 2.3

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

Este capítulo está dividido en tres fracciones: 1) Desarrollo experimental 2) Extracción de clorofila, y 3) Cuantificación y caracterización de la clorofila.

3.1 Características de Espinaca para su Procesamiento.

La espinaca (*Spinacia Oleracea*) para la extracción de la clorofila se realizó con espinaca seca y húmeda (fresca).

Espinaca húmeda, se eliminaron los tallos y las grandes venas de las hojas.

Espinaca seca dentro de la estufa, se eliminaron los tallos y las grandes venas introduciendo las hojas en un vaso de precipitado, la muestra se introdujo al horno manteniéndose a una temperatura de 30°C y 35 °C.

Espinaca seca a temperatura ambiente, se dejó a la intemperie cuidando de que no recibiera los rayos del sol, durante 8 días.

La espinaca, entre más intenso sea el color verde de ella mayor será el rendimiento de la extracción de la clorofila.

3.2. Desarrollo experimental

En este apartado se detallan las características de los reactivos y solventes utilizados en la extracción de la clorofila.

3.2.1. Reactivos y solventes

a). Acetona (80%) (Agua 20%)

La extracción se efectuó utilizando 100 y 200 ml de Acetona al 80% como solvente a una temperatura de 52 °C. Posteriormente el solvente (acetona), es recuperado por destilación.

Para seleccionar el mejor solvente, se necesitan considerar varios aspectos importantes, como: la facilidad de manejar el solvente, los bajos costos de recuperación, los efectos que tendrá el uso de este, los costos de energía; además de

que la selección del mejor solvente depende de las necesidades que se tengan y las propiedades químicas y físicas de este.

Otra característica importante del solvente es que no debe ser tóxico para los trabajadores de la planta, animales o personas que usen el extracto. Ha sido descubierto que el uso de algunos solventes son potencialmente mortales.

Las propiedades físicas tales como el peso específico, el calor latente de evaporación, el punto de ebullición, la viscosidad, la gravedad específica y la polaridad, estas propiedades afectan la facilidad y cantidad de energía requerida para recuperar el solvente. La recuperación del solvente es necesaria, además de que el solvente debe resistir repetidos ciclos de calentamiento, evaporación y enfriamiento. La estabilidad del solvente es necesaria para prevenir la contaminación del extracto y la descomposición arriesgada del producto. (L.A. Jonson y E.W. Lusas 1983).

Las constantes físicas y químicas de la acetona son presentadas en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Propiedades Físicas y Químicas del Acetona (C_3H_6O).

Punto de Ebullición (°C)	Calor Especifico (Cal/g°C)	Gravedad específica (g/cc)	Viscosidad 10^{-4} Pa*s (300K)
56.5	0.514	0.792	0.077

El solvente debe ser inerte y no corrosivo. La acetona cumple con las características de un buen solvente un alto grado de pureza, ya que entre más puro sea este, más uniformes serán sus características de operación. Los solventes que no son puros y están mezclados con otros compuestos, tienen temperaturas de ebullición o destilación inclusive mayores que los rangos del punto de ebullición de los componentes. Cuando el punto de ebullición de los otros compuestos de la mezcla es más bajo que el del solvente estos pueden escapar a través del condensador; sin embargo, cuando el punto de ebullición de los componentes de la mezcla es mayor que la del solvente pueden quedarse residuos de estos en el extracto, lo cual es peligroso, por lo que tienen que removerse, lo que significa consecuentemente un mayor consumo de energía, además de que puede afectar el sabor y color del extracto.

Finalmente, el solvente ideal debería ser fácil de adquirir y tener un bajo costo.

3.3. Técnicas en el laboratorio para la obtención de clorofila.

3.3.1. Maceración

Se eliminaron los tallos y las grandes venas de las hojas, incorporando en un vaso de precipitado las hojas de espinacas frescas, espinacas secas (a temperatura ambiente y dentro de la estufa a 32°C) se maceraron y se le agregó solvente (Acetona al 80%).

3.3.2. Extracción Soxhlet

La extracción se realizó utilizando de 150 ml a 200 ml de solución de acetona - agua (80%) como solvente, según el peso de materia prima (espinaca), colocando la espinaca seca o fresca en el cartucho y realizando la operación a una temperatura de 45°C,.

El tiempo de duración de la extracción depende de los componentes que se quieran obtener así como también el número de etapas.

3. 4. Condiciones del Trabajo experimental.

3. 4.1. Espinaca Húmeda Macerada.

En un vaso de precipitado las hojas de espinacas frescas se pusieron en contacto con 200 ml de solvente 80% Acetona y 20 % Agua se maceró, se dejó reposando dos días, en el tercer día se midió la absorbancia del extracto para cuantificar la clorofila.

3.4.2. Espinaca Húmeda Equipo Soxhlet.

Se utilizó un cartucho en el cual se incorporó la hoja de espinaca, la malla de calentamiento se mantuvo a 22 voltios para obtener las siguientes temperaturas: Temperatura cerca del cartucho de 45 °C la Temperatura del solvente se mantuvo 60°C, obteniendo una extracción óptima sin oxidación, se utilizaron para la extracción 200 ml de solvente al 80%, quedando después de la extracción 187 ml de solvente clorofila.

3.4.3. Espinaca Seca Macerada.

Las hojas de espinacas se introdujeron a la estufa manteniéndose a una temperatura de 30°C durante 7 días, en el séptimo día se maceró la espinaca seca introduciendo 100 ml de solvente, dejando 2 días de reposo.

3.4.4. Espinaca Seca Equipo Soxhlet.

Las hojas de espinacas se introdujeron a la estufa manteniéndose a una temperatura de 30°C durante 5 días, en el quinto día se realizó la extracción con el equipo soxhlet, obteniéndose después de la extracción 143 ml de acetona y clorofila.

3.4.5. Espinaca Seca a Temperatura ambiente Macerada.

Se dejó a la intemperie la muestra de hojas de espinacas a una temperatura inicial de 22°C y una temperatura final de 22°C, durante 8 días. Posteriormente se maceró la muestra con 200 ml de solvente dejando reposar 10 días, en el onceavo día se midió la absorbancia de la clorofila ya extraída, para realizar la medición en el espectrofotómetro se hizo una dilución de 9 ml de solvente y 1 ml de clorofila.

3.4.6. Espinaca Seca a Temperatura ambiente Equipo Soxhlet.

Se dejó a la intemperie la muestra de hojas de espinacas a una temperatura inicial de 26°C y una temperatura final de 22°C, durante 9 días. En el noveno día se realizó la extracción con el equipo soxhlet utilizando 200 ml de solvente, la malla de calentamiento se mantuvo a 26 voltios para obtener las siguientes temperaturas: Temperatura cerca del cartucho de 40°C la temperatura del solvente se mantuvo 60°C, obteniendo una extracción óptima sin oxidación, se utilizaron para la extracción 200 ml de solvente al 80%, quedando después de la extracción 171 ml de solvente clorofila.

3.5. INSTRUMENTOS USADOS

- Balanza analítica Santorius.
- Estufa felisa (Fabricante de equipos para laboratorio e industria, S.A. de
- Malla de calentamiento.

- Aparato de extracción equipo soxhlet.
- Regulador
- Espectrofotometro spectronic type genesys 8
- Cartucho para equipo Soxhlet
- Matraz de bola 500ml
- Vaso de precipitado 250 ml, 100 ml
- Conexión en Y
- Soporte universal
- Pinzas para soporte
- Agitadores
- Mangueras
- Condensador
- Termómetro
- Probeta 100 ml, 10ml

3.6. Medición de absorbancia

Por medio del espectrofotómetro se midió la absorbancia, con los valores de las absorbancias a λ_{663} y λ_{645} y aplicando el método de Bruisma obtenemos la cantidad de clorofila “a” y “b” del extracto.

3.7. Cuantificación de la clorofila

Se realizó la cuantificación de la clorofila por medio del espectrofotómetro a las longitudes de onda de 663 y 645, para realizar la medición de la absorbancia se utilizó una celda blanca es decir, solvente al 80% y otra celda con clorofila.

La cantidad de clorofila presente en el extracto, expresándola como mg de clorofila por g de tejido foliar extraído, de acuerdo a las siguientes formulas:

Se realizó la cuantificación de clorofila de la espinaca seca y espinaca fresca, usando el método de Bruisma en 1963, el cual se basa en la extracción de la clorofila con acetona al 80% y se calcularon las siguientes concentraciones de clorofilas por medio de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila "a"} = (12.7 (\lambda_{663}) - (2.7 (\lambda_{645})))$$

$$\text{Clorofila "b"} = (22.9 (\lambda_{645}) - (4.7 (\lambda_{663})))$$

Clorofila Total = Clorofila “a” + Clorofila “b”

Donde:

λ = densidad óptica del extracto de clorofila leída a la longitud de onda indicada en el subíndice.

3.8 Diagnostico Económico.

Mediante el diagnostico económico sabemos si el proceso de extracción de clorofila a partir de espinacas resulta rentable, por maceración o utilizando el equipo Soxhlet, para posteriormente establecer una planta de clorofila a nivel industrial.

Con el estudio de mercado que se realizó obtuvimos el precio de venta de la clorofila, y calculando los costos de producción del proceso, obtenemos el beneficio o ganancias que podemos tener realmente.

El beneficio es igual al precio de la clorofila restándole los costos totales de producción totales.

Beneficio = Costo de la Clorofila – Costo Totales de Producción

CAPÍTULO 4

DIAGNÓSTICO ECONÓMICO

El estudio económico que se presenta a continuación, contempla la producción de clorofila a partir de espinacas, utilizando datos a nivel laboratorio.

Para el diagnostico económico se tomaron las siguientes consideraciones:

1. Se presentan para el secado realizado de dos diferentes formas, a temperatura ambiente y en la estufa, por ser los de mayor rendimiento en la obtención de clorofila.
2. Los costos en este diagnostico son únicamente los de materia prima e insumos necesarios para la producción de 1Kg. de clorofila, no se consideran los costos por concepto de equipo.
3. La cantidad de espinaca necesaria para la producción de 1 Kg. de clorofila, tomando como base un rendimiento de 19.3%, de acuerdo a la cantidad de clorofila obtenida bajo las siguientes condiciones: espinaca deshidratada a temperatura ambiente por 8 días, macerada con 8 días de reposo a 21 °C).
4. Llevar a cabo este proceso a una planta piloto permite la disminución de gastos, ya que, el solvente puede ser reutilizado una vez recuperado de una o varias extracciones.

El diagrama general de las operaciones necesarias para la extracción de la clorofila, así como de cada una de las etapas que se realizan incluyendo su balance de materia, se muestran en la figura 4.1.

La espinaca tiene un gran porcentaje de clorofila, ya que de esta sustancia depende del color verde de los vegetales, al realizar la extracción con acetona posteriormente se hace la recuperación del solvente.

En este proceso el solvente se puede decir, que es el que tiene el mayor costo pero la recuperación de éste es lo que hace rentable el proceso, por lo que se recomienda llevar a cabo la extracción de la clorofila a partir de las espinacas a nivel industrial, además que en el mercado la clorofila no ha sido extraída de espinacas, sino de otros vegetales como la alfalfa, tomate, etc., que de acuerdo a los resultados, los rendimientos fueron menores respecto al rendimiento que se obtuvo de las espinacas (espinaca 19.3 %, alfalfa 1.15%, tomate 16.3%).

El precio de venta de la clorofila encontrado es de 13.5 USD por 200 mg, esto permite que con los costos de producción y el precio de venta, se obtenga una rentabilidad favorable.

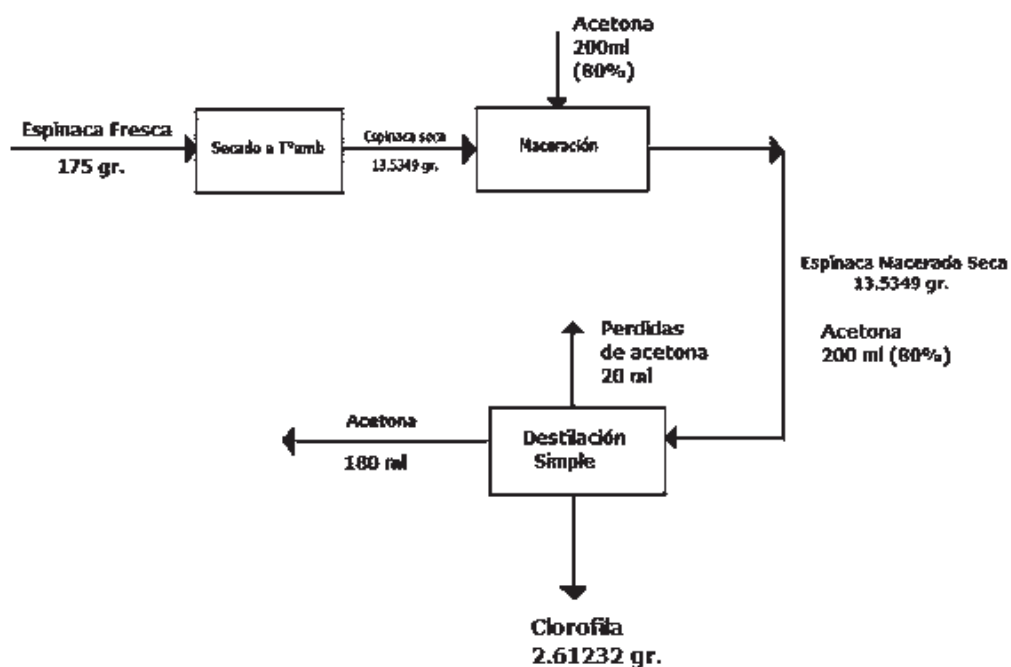


Fig. 4.1 Diagrama de Flujo Obtención de Clorofila por Maceración.

A continuación se realiza el detalle etapa por etapa bajo las condiciones e inversiones necesarias:

4.1 Extracción de clorofila por maceración de la espinaca

4.1.1. Etapa de Secado:

El secado de la espinaca se realizó a temperatura ambiente, su valor fluctuó entre 26°C que corresponde al primer día y la temperatura del último día de 22°C.

La figura 4.2 muestra el diagrama de la etapa de secado.

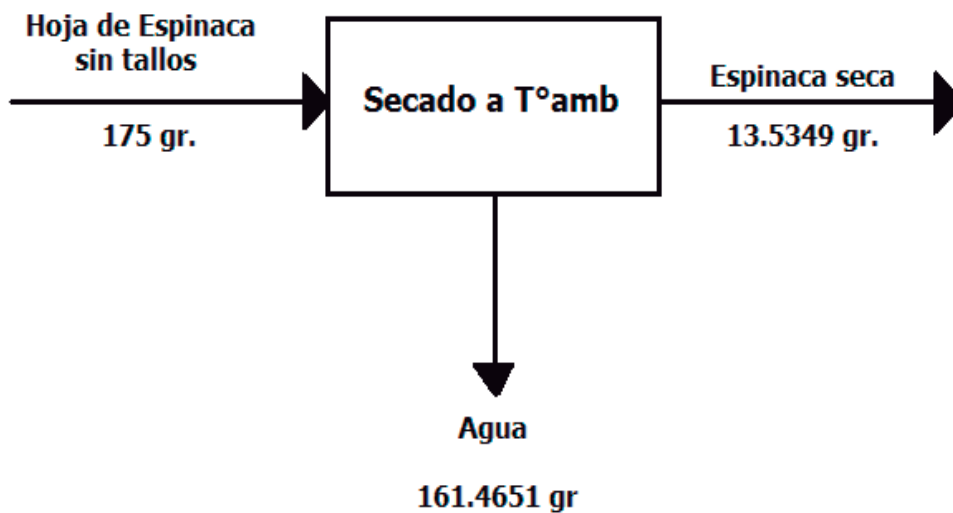


Fig. 4.2 Etapa de secado a temperatura ambiente.

- No se utilizó energía eléctrica por que el secado fue a temperatura ambiente.
- Tiempo de secado 8 días.

4.1.2 Etapa de Maceración (Extracción).

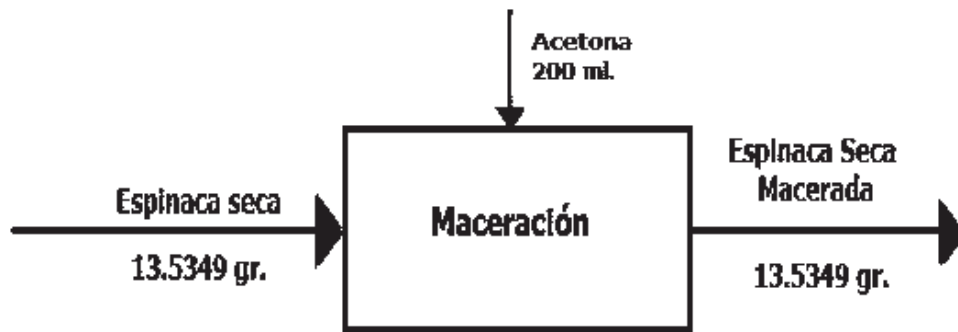


Fig. 4.3 Etapa de Maceración.

- No hay consumo de energía eléctrica por que la maceración fue manual.
- Consumo Total de Acetona pura = 160 ml.
- Tiempo de reposo: 8 días

Cálculos para la obtención de un kilogramo de clorofila mediante esta técnica:

Con 13.5349 gr. de espinaca seca se obtuvo 0.193 gr. de clorofila por gramo de espinaca es decir, se obtuvo un total de 2.61232 gr. de clorofila.

$$(13.5349 \text{ gr. de espinaca}) \left(0.193006 \frac{\text{gr. clorofila}}{\text{gr. de espinaca}} \right) = 2.61232 \text{ gr. de Clorofila}$$

- Cantidad de espinaca necesaria para obtener 1 Kg. de clorofila:

$$\left(\frac{(1000 \text{ gr. de clorofila})(13.5349 \text{ gr. de espinaca seca})}{2.61232 \text{ gr de clorofila}} \right) = 5181.18 \text{ gr. de Espinaca seca}$$

$$(5181.18 \text{ gr.}) \left(\frac{1 \text{ Kg.}}{1000 \text{ gr.}} \right) = 5.1812 \text{ Kg. de espinaca seca}$$

- Espinaca Húmeda requerida para obtener 1 Kg. de Clorofila

$$\left(\frac{175 \text{ gr. de Espinaca Humeda}(1000 \text{ gr. de Clorofila})}{2.61224 \text{ gr. de Clorofila}} \right) = 66,992.3 \text{ gr. de Espinaca humeda}$$

$$(66,992.3 \text{ gr.}) \left(\frac{1 \text{ Kg.}}{1000 \text{ gr.}} \right) = 66.9923 \text{ Kg.}$$

- Volumen necesario de acetona (80%):
- Con 160 ml de acetona se obtuvieron 2.61232 gr. de clorofila.

$$\left(\frac{(1000 \text{ gr. de clorofila}) (160 \text{ ml de acetona.})}{2.61232 \text{ gr de clorofila}} \right) = 61,248.2 \text{ ml}$$

$$\text{Densidad de la Acetona} = 0.790 \text{ gr} / \text{ml}$$

$$(61248.2 \text{ ml}) \left(\frac{0.790 \text{ gr}}{\text{ml}} \right) = 48,386.1 \text{ gr.}$$

$$(61248.2 \text{ ml}) \left(\frac{1 \text{ Lt.}}{1000 \text{ ml}} \right) = 61.2482 \text{ Lt.}$$

$$\text{Volumen de Acetona} = 61.2482 \text{ Lt.}$$

$$W_{\text{acetona}} = 160 \text{ ml} \left(0.790 \frac{\text{gr}}{\text{ml}} \right) = 126.4 \text{ gr.}$$

4.1.3 Etapa de separación. Destilación simple

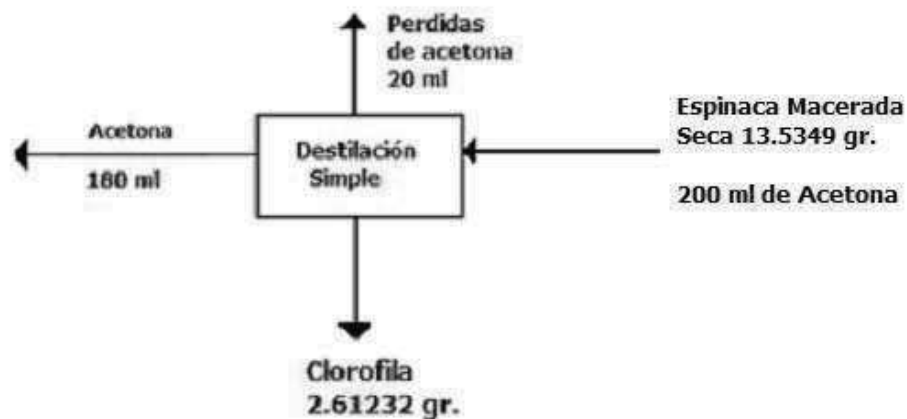


Fig. 4.4 Destilación Simple.

- Durante la operación de destilación no hay pérdidas de agua ya que se cuenta con una bomba para su recirculación.
- La malla de calentamiento consume 750 W.

$$\left(750 \frac{\text{J}}{\text{s}}\right) \left(\frac{2.778 \times 10^{-7} \text{ kW} \cdot \text{hr}}{1 \text{ J/s}} \right) = 0.000208 \text{ kWhr}$$

- Para la destilación de 160 ml (94.8) de acetona se necesitaron 1.5 hrs.

Tiempo requerido para la recuperación de 48386.1 gr. de acetona, necesarios para la extracción de 1kg. de clorofila.

$$\text{tiempo} = \left(\frac{(48,386.1 \text{ gr. de Acetona})(1.5 \text{ hrs})}{126.4 \text{ gr. Acetona}} \right) = 574.202 \text{ hrs.}$$

$$\text{Consumo de Energía} = (0.000208 \text{ kW})(574.202 \text{ hrs}) = 0.1194 \text{ kW} \cdot \text{hr.}$$

$$\text{Costo de Energía Eléctrica} = \left(\frac{\$1.608}{100 \text{ kWhr}} \right)$$

$$\text{Costo de la Energía} = \left(\frac{\$1.608}{100 \text{ kW} \cdot \text{hr}} \right) (0.1194 \text{ kW} \cdot \text{hr}) = \$0.00192$$

Costo del solvente en la destilación

Cantidad de solvente para recuperación = 48,386.1 gr. de acetona

Factor de perdidas para el solvente = 0.001

Perdidas del solvente = (48,386.1 gr. de Acetona)(0.001) = 48.3861 gr. de Acetona

$$\left(\frac{48,386.1 \text{ gr. de Acetona}}{\frac{0.790 \text{ gr.}}{\text{ml}}} \right) = 61.2482 \text{ ml}$$

$$\text{Costo del solvente} = \left(\frac{\$102.35}{\text{Lt}} \right) (61.2482 \text{ ml}) \left(\frac{1 \text{ Lt}}{1000 \text{ ml}} \right) = \$ 6.26876$$

Tabla 4.1 Resultados del diagnóstico económico

Descripción	Cantidad	Unidad	Precio/Unidad (\$/U)	Importe
Espinaca Húmeda	66.9923	Kg.	12.00	\$803.908
Agua	10	Lt.	0.80	\$ 8.00
Acetona	0.061248	Lt.	102.35	\$ 6.26875
Consumo de Energía	0.119434	Kw	\$1.608/100 Kw hr	\$0.00192

Costos totales de producción

$$(\$803.908) + (\$8.00) + (\$6.26875) + (\$0.00192) = \$818.178$$

Costo comercial de la clorofila:

200 mg. = 13.50 USD

$$\left(\frac{(1000 \text{ gr.})(13.50)}{0.2 \text{ gr.}} \right) = 67,500 \text{ USD}$$

Precio de clorofila = 67,500 dólares /Kg.

Tomando en cuenta un tipo de cambio bancario de \$10.90 con fecha del 18 de agosto del 2006.

Precio de clorofila = \$ 735,750 / Kg.

El precio de la clorofila fue proporcionado por: Productos de Naturavit Inc. Florida USA.
(USD 13.50 / 200 mg. de clorofila.)

Beneficio = Costo de la clorofila – Costo de producción

Beneficio = \$735,750 - \$818.178 = \$ 734,931.822

$$\% \text{ de Beneficio} = \frac{(\$734,931.822)(100\%)}{735,750} = 99.888\%$$

En la figura 4.5 muestra el Diagrama de flujo de la extracción en equipo soxhlet. de la clorofila a partir de espinaca secada a $T = 35^{\circ}\text{C}$ (dentro de la estufa)

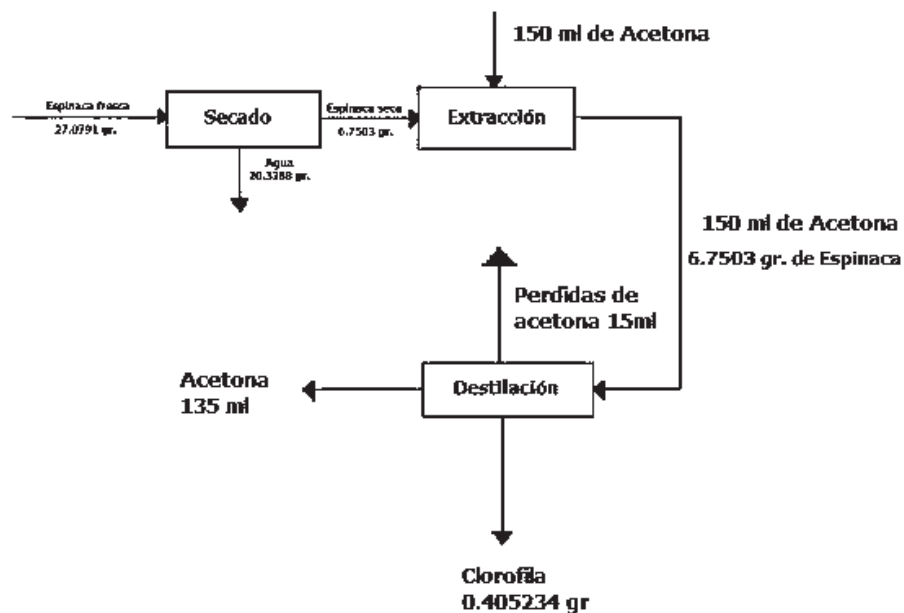


Fig. 4.5 Diagrama de Flujo Extracción en Equipo Soxhlet.

4.2 Extracción de clorofila por equipo soxhlet de la espinaca secada (dentro de la estufa)

4.2.1 Etapa de Secado

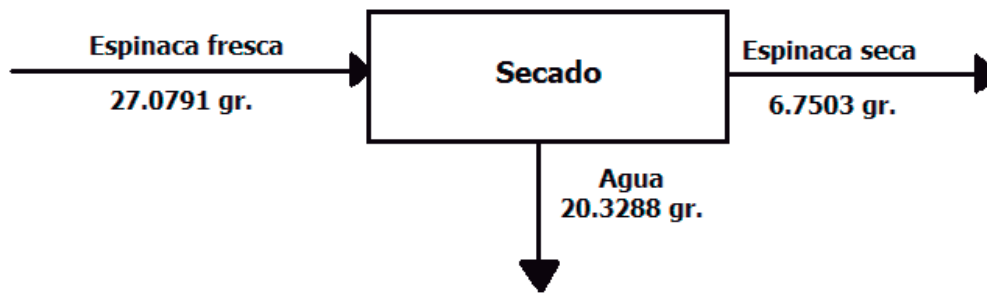


Fig. 4.6 Etapa de Secado

- Tiempo de secado 5 días (120 hrs).
- La estufa en la cual se realizó el secado de la espinaca consume 750 W.

$$\left(750 \frac{\text{J}}{\text{s}} \right) \left(\frac{2.778 \times 10^{-7} \text{ kW} \cdot \text{hr}}{1 \text{ J/s}} \right) = 0.000208 \text{ kWhr}$$

$$(5 \text{ dias}) \left(\frac{24 \text{ hrs}}{1 \text{ dia}} \right) = 120 \text{ hrs.}$$

- Para obtener 1 kg. de clorofila se necesitan 16,657.8 gr. de espinaca seca.

$$\left(\frac{(1000 \text{ gr. de Clorofila})(6.7503 \text{ gr. de Espinaca seca})}{0.405234 \text{ gr. de Clorofila}} \right) = 16,657.8 \text{ gr. de Espinaca}$$

- La estufa puede secar hasta 5 kg. de espinaca.

Espinaca húmeda requerida para obtener 1 kg. de clorofila

$$\left(\frac{27.0791 \text{ gr. de Espinaca Humeda}(1000 \text{ gr. de Clorofila})}{0.405234 \text{ gr. de Clorofila}} \right) = 66,822.9 \text{ gr. de Espinaca humeda}$$

$$(66,822.9 \text{ gr.}) \left(\frac{1 \text{ Kg.}}{1000 \text{ gr.}} \right) = 66.8229 \text{ Kg.}$$

- Para secar 27.0791 gr. de espinaca húmeda se necesitaron 120 hrs.

Tiempo requerido para secar 66,822.9 gr. de espinaca húmeda, si la estufa tiene una capacidad de 5000 gr. de espinaca.

$$\left(\frac{(66,822.9 \text{ gr. de Espinaca Húmeda})(120 \text{ hrs.})}{5000 \text{ gr. de Espinaca Húmeda}} \right) = 1603.75 \text{ hrs.}$$

$$\text{Consumo de Energía} = (0.000208 \text{ kW})(1603.75 \text{ hrs}) = 0.33358 \text{ kW} \bullet \text{hr.}$$

$$\text{Costo de Energía} = \left(\frac{\$1.608}{100 \text{ kWhr}} \right)$$

$$\text{Costo de Energía} = \left(\frac{\$1.608}{100 \text{ kW} \bullet \text{hr}} \right) (0.33358 \text{ kW} \bullet \text{hr}) = \$0.005364$$

4.2.2. Etapa de extracción

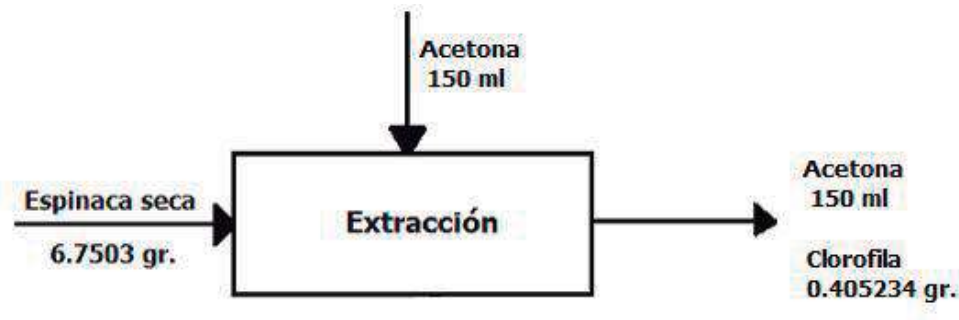


Fig. 4.7 Etapa de extracción

- Tiempo de extracción 4 hrs.
- La malla de calentamiento consume 750 W.

$$\left(750 \frac{\text{J}}{\text{s}} \right) \left(\frac{2.778 \times 10^{-7} \text{ kW} \cdot \text{hr}}{1 \text{ J/s}} \right) = 0.000208 \text{ kWhr}$$

- Se obtuvo 0.060032 gr. de clorofila por gramo de espinaca seca.
- En 6.7503 gr. de espinaca seca se obtuvieron 0.405 gr. de clorofila.
- Para obtener 1 kg. de clorofila se necesitan 16,667.8 gr. de espinaca seca.

$$\text{Cantidad de Espinaca} = (1000 \text{ gr. de Clorofila}) \left(\frac{6.7503 \text{ gr. de Espinaca}}{0.405234 \text{ gr. de Clorofila}} \right) = 16,667.8 \text{ gr.}$$

En cada extracción soxhlet se obtiene 0.405234 gr. de clorofila con 6.7503 gr. de espinaca seca entonces para obtener 1kg. de clorofila se necesita el siguiente número de extracciones:

$$\text{Numero de Extracciones} = \left(\frac{16,657.8 \text{ gr. de Espinaca}}{6.7503 \text{ gr. de Espinaca / Extracción}} \right) = 2467.71$$

Por lo tanto, para obtener 1kg. de clorofila se necesitan hacer 2467.71 extracciones en el equipo soxhlet, depositando en cada cartucho 6.7503 gr. de espinaca seca.

Tiempo requerido para realizar las extracciones:

$$t = (120 \text{ hrs.}) (2467.71 \text{ extracciones}) = 296,125 \text{ hrs.}$$

$$\text{Consumo de agua} = (1000 \text{ gr. Clorofila}) \left(\frac{4 \text{ hr}}{0.405 \text{ gr. de clorofila}} \right) \left(\frac{180 \text{ ml de agua}}{1 \text{ min}} \right) \left(\frac{60 \text{ min}}{1 \text{ hr.}} \right) \left(\frac{1 \text{ Lt}}{1000 \text{ ml}} \right)$$

$$\text{Consumo de agua} = 106,667 \text{ Lt.}$$

El agua no se tira por que se tiene una recirculación.

- Volumen de acetona requerido para obtener 1 kg. de clorofila:

$$\text{Volumen de Acetona} = \frac{(1000 \text{ gr. de Clorofila})(120 \text{ ml. de Acetona})}{0.405234 \text{ gr. de Clorofila}} = 296,125 \text{ ml de Acetona}$$

$$\text{Acetona requerida} = 296,125 \text{ ml} \left(\frac{0.790 \text{ gr}}{\text{ml}} \right) = 233,939 \text{ gr. de Acetona}$$

Para la extracción se utilizaron 120 ml acetona por cada 6.7503 gr. de espinaca seca.

$$\text{Densidad de la Acetona} = 0.790 \text{ gr} / \text{ml}$$

$$W_{\text{acetona}} = 120 \text{ ml} \left(0.790 \frac{\text{gr}}{\text{ml}} \right) = 94.8 \text{ gr.}$$

$$\text{Perdidas de Acetona} = \left(\frac{94.8 \text{ gr. de Acetona}}{\text{Extracción}} \right) (0.001)(2467.71 \text{ Extracciones}) = 233.939 \text{ gr.}$$

$$\text{Factor de perdidas de acetona} = 0.001$$

$$\left(\frac{233.939 \text{ gr. de Acetona}}{\frac{0.790 \text{ gr.}}{\text{ml}}} \right) = 296.125 \text{ ml}$$

$$\text{Costo del solvente} = \left(\frac{\$102.35}{\text{Lt}} \right) (296.125 \text{ ml}) \left(\frac{1 \text{ Lt}}{1000 \text{ ml}} \right) = \$ 30.3084$$

$$\text{Costo del solvente} \$102.35$$

En 4 hrs. de extracción, se obtuvieron 0.405 234gr. de clorofila.

Tiempo requerido para la extracción de 1 kg. de clorofila:

$$\text{tiempo} = \left(\frac{(1000 \text{ gr. de Clorofila})(4 \text{ hrs})}{0.405234 \text{ gr. de Clorofila}} \right) = 9870.84 \text{ hrs.}$$

$$\text{Consumo de Energía} = (0.000208 \text{ kW})(9870.84 \text{ hrs}) = 2.05313 \text{ kW} \bullet \text{hr.}$$

$$\text{Costo de la energía eléctrica} = \left(\frac{\$ 1.608}{100 \text{ kWhr}} \right)$$

$$\text{Costo de la Energía} = \left(\frac{\$ 1.608}{100 \text{ kW} \cdot \text{hr}} \right) (2.05313 \text{ kW} \cdot \text{hr}) = \$ 0.033014$$

4.2.3 Etapa de separación (destilación).

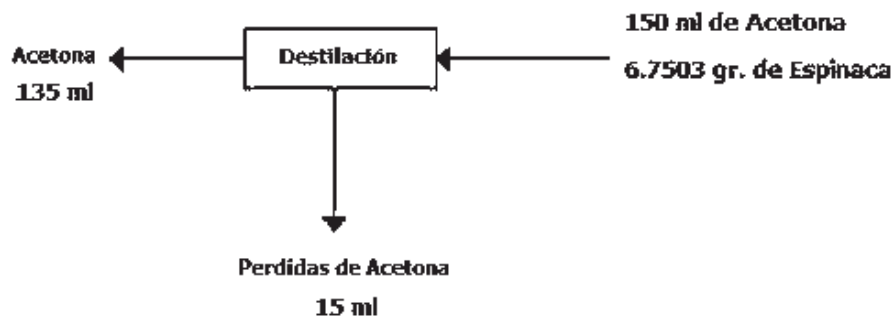


Fig. 4.8 Etapa de destilación

El agua no se tira por que se tiene una recirculación.

- La malla de calentamiento consume 750 W.

$$\left(750 \frac{\text{J}}{\text{s}} \right) \left(\frac{2.778 \times 10^{-7} \text{ kW} \cdot \text{hr}}{1 \text{ J/s}} \right) = 0.000208 \text{ kWhr}$$

- Cantidad de acetona después de la extracción:

$$(292,423.64 \text{ gr. de Acetona iniciales} - 701.817 \text{ gr. de Acetona consumidos en la extraccion}) = 291,722 \text{ gr}$$

- Para la destilación de 120 ml (94.8) de acetona se necesitaron 1.5 hrs.

Tiempo requerido para la recuperación de 291,722 gr. de acetona, necesarios para la extracción de 1kg. de clorofila.

$$\text{tiempo} = \left(\frac{(291,722 \text{ gr. de Acetona})(1.5 \text{ hrs})}{94.8 \text{ gr. Acetona}} \right) = 4615.85 \text{ hrs.}$$

$$\text{Consumo de Energía} = (0.000208 \text{ kW})(4615.85 \text{ hrs}) = 0.96 \text{ kW} \bullet \text{hr.}$$

$$\text{Costo de la energía eléctrica} = \left(\frac{\$1.608}{100 \text{ kWhr}} \right)$$

$$\text{Costo de la Energía} = \left(\frac{\$1.608}{100 \text{ kW} \bullet \text{hr}} \right) (0.96 \text{ kW} \bullet \text{hr}) = \$0.015438$$

Costo del solvente en la destilación

$$\text{Cantidad de solvente para recuperación} = 291,722 \text{ gr. de acetona}$$

$$\text{Factor de perdidas para el solvente} = 0.001$$

$$\text{Perdidas del solvente} = (291,722 \text{ gr. de Acetona})(0.001) = 291.722 \text{ gr. de Acetona}$$

$$\left(\frac{291.722 \text{ gr. de Acetona}}{\frac{0.790 \text{ gr.}}{\text{ml}}} \right) = 369.268 \text{ ml}$$

$$\text{Costo del solvente} = \left(\frac{\$102.35}{\text{Lt}} \right) (369.268 \text{ ml}) \left(\frac{1 \text{ Lt}}{1000 \text{ ml}} \right) = \$37.7946$$

Costo total de energía

$$\text{Costo total de energía} = \$ \text{secado} + \$ \text{extracción} + \$ \text{destilación}$$

$$\text{Costo total de energía} = \$0.005364 + \$0.033014 + \$0.015438$$

$$\text{Costo Total de Energía} = \$0.053816$$

Costo total de acetona

$$\text{Pérdidas totales de acetona} = \text{pérdidas extracción} + \text{pérdidas destilación}$$

$$\text{Perdidas Totales de Acetona} = \$30.3084 + \$37.7946 = \$68.1036$$

Tabla 4.2 Resultados del diagnostico económico
extracción soxhlet.

Descripción	Cantidad	Unidad	Precio/Unidad (\$/U)	Importe
Acetona	0.6654	Lt.	102.35	\$ 68.1036
Espinaca	66.8229	Kg.	12.00	\$801.8748
Consumo de energía	111.639	kW hr	1.608/100 kW hr	\$ 0.053816
Agua de enfriamiento	8	Lt.	0.80	\$ 6.4

Costos totales de producción

$$(\$68.1036) + (\$801.8748) + (\$0.053816) + (\$6.4) = \$876.4322$$

Costo comercial de clorofila:

$$200 \text{ mg.} = 13.50 \text{ USD}$$

$$\left(\frac{(1000 \text{ gr.})(13.50)}{0.2 \text{ gr.}} \right) = 67,500 \text{ USD}$$

$$\text{Precio de clorofila} = \$ 67,500 \text{ dólares /Kg.}$$

Tomando en cuenta un tipo de cambio bancario de \$10.90 con fecha del 18 de agosto del 2006.

$$\text{Precio de clorofila} = \$ 735,750 / \text{Kg.}$$

El precio de la clorofila fue proporcionado por: Productos de Naturavit Inc. Florida USA.
(USD 13.50 / 200 mg. de clorofila.)

No se encontró información de cómo comparar con especificaciones y propiedades de la clorofila.

Beneficio = Costo de clorofila – Costo totales de producción

$$\text{Beneficio} = \$735,750 - \$876.4322 = \$ 734,873.5678$$

$$\% \text{ de Beneficio} = \frac{(\$734,873.5678)(100\%)}{770.85} = 99.881\%$$

CAPITULO 5

RESULTADOS

Se realizó la cuantificación de clorofila de la espinaca seca y espinaca fresca usando el método de Bruisma 1963 (*The Cuantitative Analisis of Clorophylls a and b in plant extracts, Phytochem. Pres. Great Britain Vol. 2:241-249*), el cual se basa en la extracción de la clorofila con acetona al 80% y se calcularon las siguientes concentraciones de clorofilas por medio de las siguientes ecuaciones:

Ecuaciones y resultados del contenido de clorofila en espinaca (Método Bruisma).

$$\text{Clorofila "a"} = (12.7(\lambda_{663}) - 2.7(\lambda_{645}))$$

$$\text{Clorofila "b"} = (22.9(\lambda_{645}) - 4.7(\lambda_{663}))$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila "a"} + \text{Clorofila "b"}$$

Para medir la absorbancia de la clorofila en el espectrofotómetro, se utilizó una blanco para calibrar (acetona 80% y/o agua), y otra con clorofila-solvente.

La celda que contenía clorofila se diluyó 9 ml de solvente al 80% y 1 ml del extracto de clorofila, para obtener una concentración más exacta ya que la clorofila que se obtuvo era demasiado concentrada y no se podía tener una lectura real de absorbancia, por lo tanto al resultado total de clorofila obtenida se multiplica por 10, debido a la dilución anteriormente explicada.

Los cálculos para obtener la cantidad de clorofila presente en el extracto, expresándola como mg de clorofila por gr. de tejido foliar extraído (espinaca), de acuerdo con el método de Bruinsma.

- **ESPINACA HUMEDA MACERADA**

Datos:

$$W_{\text{espinaca húmeda}} = 138.7157 \text{ gr.} - 114.0719 \text{ gr.} = 24.6438 \text{ gr.}$$

Tiempo de reposo = 2 días

Volumen del solvente = 200 ml (acetona 80%)

λ = densidad óptica del extracto de clorofila leída a la longitud de onda indicada

$$\lambda_{663} = 0.396 \text{ nm}$$

$$\lambda_{645} = 0.168 \text{ nm}$$

$$\text{Clorofila "a"} = (12.7(\lambda_{663}) - 2.7(\lambda_{645}))$$

$$\text{Clorofila "a"} = (12.7(0.396) - 2.7(0.168))$$

$$\text{Clorofila "a"} = 4.5756 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila "b"} = (22.9(\lambda_{645}) - 4.7(\lambda_{663}))$$

$$\text{Clorofila "b"} = (22.9(0.168) - 4.7(0.396))$$

$$\text{Clorofila "b"} = 1.986 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila "a"} + \text{Clorofila "b"}$$

$$\text{Clorofila Total} = 4.5756 \text{ mg/g} + 1.986 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = 6.5616 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = 65.616 \text{ mg/g}$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{65.616}{1000} \times 100 = 6.56\%$$

Se obtuvieron 1617.03 mg. de clorofila a partir de 24.6438 gr. de espinaca húmeda.

$$\left(65.616 \frac{\text{mg. de Clorofila}}{\text{gr. de Espinaca Humeda}} \right) (24.6438 \text{ gr. de Espinaca Humeda}) = 1617.03 \text{ mg. de Clorofila}$$

- **ESPINACA HUMEDA “EXTRACCION EN EQUIPO SOXHLET”**

Datos:

$$W_{\text{cartucho}} = 3.2208 \text{ gr.}$$

$$W_{\text{cartucho + espinaca}} = 17.6799 \text{ gr.}$$

$$W_{\text{espinaca húmeda}} = (17.6799 \text{ gr.} - 3.2208 \text{ gr.}) = 14.4591 \text{ gr.}$$

$$\text{Tiempo de extracción} = 4 \text{ hrs.}$$

$$\text{Volumen del solvente} = 200 \text{ ml (acetona 80\%)}$$

$$\text{Volumen final del extracto clorofila - solvente} = 183 \text{ ml.}$$

λ = densidad óptica del extracto de clorofila leída a la longitud de onda indicada

$$\lambda_{663} = 0.467 \text{ nm}$$

$$\lambda_{645} = 0.226 \text{ nm}$$

$$\text{Clorofila "a"} = (12.7(\lambda_{663}) - 2.7(\lambda_{645}))$$

$$\text{Clorofila "a"} = (12.7(0.467) - 2.7(0.226))$$

$$\text{Clorofila "a"} = 5.3207 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila "b"} = (22.9(\lambda_{645}) - 4.7(\lambda_{663}))$$

$$\text{Clorofila "b"} = (22.9(0.226) - 4.7(0.467))$$

$$\text{Clorofila "b"} = 2.9805 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila "a"} + \text{Clorofila "b"}$$

$$\text{Clorofila Total} = 5.3207 \text{ mg/g} + 2.9805 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = 8.3012 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = 83.012 \text{ mg/g}$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{83.012}{1000} \times 100 = 8.012$$

Se obtuvieron 1200.28 mg. de clorofila a partir de 14.4591 gr. de espinaca húmeda.

$$\left(83.012 \frac{\text{mg. de Clorofila}}{\text{gr. de Espinaca Humeda}} \right) (14.4591 \text{ gr. de Espinaca Humeda}) = 1,200.28 \text{ mg. de Clorofila}$$

- **ESPINACA MACERADA SECA (DENTRO DE LA ESTUFA)**

Datos:

$$W_{\text{vaso}} = 111.2616 \text{ gr.}$$

$$W_{\text{vaso} + \text{espinaca}} = 149.8990 \text{ gr.}$$

$$W_{\text{espinaca húmeda}} = 149.8990 \text{ gr.} - 111.2616 \text{ gr.} = 38.6374 \text{ gr.}$$

$$\text{Temperatura de la estufa} = 30^{\circ}\text{C}$$

$$\text{T tiempo de secado} = 7 \text{ días}$$

$$\text{T tiempo de reposo} = 2 \text{ días}$$

$$W_{\text{espinaca seca}} = 9.0887 \text{ gr.}$$

$$W_{\text{perdida de agua}} = W_{\text{espinaca húmeda}} - W_{\text{espinaca seca}}$$

$$W_{\text{perdida de agua}} = 38.6374 \text{ gr.} - 9.0887 \text{ gr.} = 29.5487 \text{ gr.}$$

$$\text{Volumen del solvente} = 100 \text{ ml (acetona 80\%)}$$

λ = densidad óptica del extracto de clorofila leída a la longitud de onda indicada

$$\lambda_{663} = 0.350 \text{ nm}$$

$$\lambda_{645} = 0.191 \text{ nm}$$

$$\text{Clorofila "a"} = (12.7(\lambda_{663}) - 2.7(\lambda_{645}))$$

$$\text{Clorofila "a"} = (12.7(0.350) - 2.7(0.191))$$

$$\text{Clorofila "a"} = 3.9293 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila "b"} = (22.9(\lambda_{645}) - 4.7(\lambda_{663}))$$

$$\text{Clorofila "b"} = (22.9(0.191) - 4.7(0.350))$$

$$\text{Clorofila "b"} = 2.7289 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila "a"} + \text{Clorofila "b"}$$

$$\text{Clorofila Total} = 3.9293 \text{ mg/g} + 2.7289 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = 6.6582 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = 66.582 \text{ mg/g}$$

$$\text{Re ndim iento} = \frac{66.582}{1000} \times 100 = 6.682$$

Se obtuvieron 605.144 mg. de clorofila a partir de 9.0887 gr. de espinaca seca.

$$\left(66.582 \frac{\text{mg. de Clorofila}}{\text{gr. de Espinaca Seca}} \right) (9.0887 \text{ gr. de Espinaca Seca}) = 605.144 \text{ mg. de Clorofila}$$

• **ESPINACA SECA A TEMPERATURA AMBIENTE EXTRACCIÓN DE CLOROFILA POR MACERACION**

Datos:

$$W_{\text{espinaca húmeda}} = 175 \text{ gr.}$$

Temperatura ambiente = 21°C

$W_{\text{espinaca seca}} = 13.5349 \text{ gr.}$

$W_{\text{perdida de agua}} = W_{\text{espinaca húmeda}} - W_{\text{espinaca seca}}$

$W_{\text{perdida de agua}} = 175 \text{ gr.} - 13.5349 \text{ gr} = 161.4651 \text{ gr.}$

Tiempo de secado = 8 días

Tiempo de reposo = 3 días

Volumen del solvente = 200 ml (acetona 80%)

$\lambda_{663} = 1.193 \text{ nm}$

$\lambda_{645} = 0.483 \text{ nm}$

$\text{Clorofila "a"} = (12.7(\lambda_{663}) - 2.7(\lambda_{645}))$

$\text{Clorofila "a"} = (12.7(1.193) - 2.7(0.483))$

$\text{Clorofila "a"} = 13.847 \text{ mg/g}$

$\text{Clorofila "b"} = (22.9(\lambda_{645}) - 4.7(\lambda_{663}))$

$\text{Clorofila "b"} = (22.9(0.483) - 4.7(1.193))$

$\text{Clorofila "b"} = 5.4536 \text{ mg/g}$

$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila "a"} + \text{Clorofila "b"}$

$$\text{Clorofila Total} = 13.847 \text{ mg/g} + 5.4536 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = 19.3006 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = 193.006 \text{ mg/g}$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{193.006}{1000} \times 100 = 19.3006$$

Se obtuvieron 2612.32 mg. de clorofila a partir de 13.5349 gr. de espinaca seca.

$$\left(193.006 \frac{\text{mg. de Clorofila}}{\text{gr. de Espinaca Seca}} \right) (13.5349 \text{ gr. de Espinaca Seca}) = 2612.32 \text{ mg. de Clorofila}$$

- **ESPINACA SECA DENTRO DE LA ESTUFA A 35° C “EXTRACCIÓN EN EQUIPO SOXHLET”**

Datos:

$$W_{\text{vaso}} = 110.5743 \text{ gr.}$$

$$W_{\text{vaso} + \text{espinaca}} = 137.6534 \text{ gr.}$$

$$W_{\text{espinaca húmeda}} = 27.0791 \text{ gr.}$$

$$\text{Temperatura de la estufa} = 30^{\circ}\text{C}$$

$$\text{Tiempo de secado} = 5 \text{ días}$$

$$\text{Tiempo de extracción} = 4 \text{ hrs.}$$

$$W_{\text{espinaca seca}} = 6.7503 \text{ gr.}$$

$$W_{\text{perdida de agua}} = W_{\text{espinaca húmeda}} - W_{\text{espinaca seca}}$$

$$W_{\text{perdida de agua}} = 27.0791 \text{ gr.} - 6.7603 \text{ gr.} = 20.3288 \text{ gr.}$$

$$\text{Volumen del solvente} = 200 \text{ ml (acetona 80\%)}$$

$$\text{Volumen final extracto (clorofila - solvente)} = 143 \text{ ml.}$$

$$\lambda_{663} = 0.306 \text{ nm.}$$

$$\lambda_{645} = 0.176 \text{ nm}$$

$$\text{Clorofila "a"} = (12.7(\lambda_{663}) - 2.7(\lambda_{645}))$$

$$\text{Clorofila "a"} = (12.7(0.306) - 2.7(0.176))$$

$$\text{Clorofila "a"} = 3.411 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila "b"} = (22.9(\lambda_{645}) - 4.7(\lambda_{663}))$$

$$\text{Clorofila "b"} = (22.9(0.176) - 4.7(0.306))$$

$$\text{Clorofila "b"} = 2.5922 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila "a"} + \text{Clorofila "b"}$$

$$\text{Clorofila Total} = 3.411 \text{ mg/g} + 2.5922 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = 6.0032 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = 60.032 \text{ mg/g}$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{60.032}{1000} \times 100 = 6.003$$

Se obtuvieron 405.234 mg. de clorofila a partir de 6.7503 gr. de espinaca seca.

$$\left(60.032 \frac{\text{mg. de Clorofila}}{\text{gr. de Espinaca Seca}} \right) (6.7503 \text{ gr. de Espinaca Seca}) = 405.234 \text{ mg. de Clorofila}$$

- **ESPINACA SECA A TEMPERATURA AMBIENTE “EXTRACCION EN EQUIPO SOXHLET”**

$$W_{\text{espinaca húmeda}} = 75 \text{ gr.}$$

$$\text{Temperatura ambiente} = 26^{\circ}\text{C}$$

$$W_{\text{espinaca seca}} = 8.6239 \text{ gr.}$$

$$W_{\text{perdida de agua}} = W_{\text{espinaca húmeda}} - W_{\text{espinaca seca}}$$

$$W_{\text{perdida de agua}} = 75 \text{ gr.} - 8.6239 \text{ gr.}$$

$$W_{\text{perdida de agua}} = 66.3761 \text{ gr.}$$

$$\text{T tiempo de secado} = 9 \text{ días}$$

$$\text{Volumen del solvente} = 200\text{ml (acetona 80\%)}$$

$$\text{Volumen Final del Extracto (clorofila - solvente)} = 171 \text{ ml}$$

$$\lambda_{663} = 0.157 \text{ nm.}$$

$$\lambda_{645} = 0.099 \text{ nm}$$

$$\text{Clorofila "a"} = (12.7(\lambda_{663}) - 2.7(\lambda_{645}))$$

$$\text{Clorofila "a"} = (12.7(0.157) - 2.7(0.099))$$

$$\text{Clorofila "a"} = 1.7266 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila "b"} = (22.9(\lambda_{645}) - 4.7(\lambda_{663}))$$

$$\text{Clorofila "b"} = (22.9(0.099) - 4.7(0.157))$$

$$\text{Clorofila "b"} = 1.5292 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila "a"} + \text{Clorofila "b"}$$

$$\text{Clorofila Total} = 1.7292\text{mg/g} + 1.5292 \text{ mg/g}$$

$$\text{Clorofila Total} = 3.2558 \text{ mg/g}$$

Clorofila Total = 32.558 mg/g

$$\text{Rendimiento} = \frac{32.558}{1000} \times 100 = 3.2558$$

Se obtuvieron 280.777 mg. de clorofila a partir de 8.6239 gr. de espinaca seca.

$$\left(32.558 \frac{\text{mg. de Clorofila}}{\text{gr. de Espinaca Seca}} \right) (8.6239 \text{ gr. de Espinaca Seca}) = 280.777 \text{ mg. de Clorofila}$$

Tabla 5.1 Concentrado de resultados

Proceso de Extracción	Cantidad de Espinaca (g)	Clorofila “a” (mg/g)	Clorofila “b” (mg/g)	Clorofila Total (mg/g)
Espinaca húmeda Macerada	24.6438	4.5756	1.986	65.616
Espinaca húmeda Equipo Soxhlet	14.4591	5.3207	2.9805	83.012
Espinaca Seca Macerada	9.0887	3.9293	2.7289	66.582
Espinaca Seca Equipo Soxhlet	6.7503	3.411	2.5922	60.032
Espinaca Seca a T°amb. Macerada	13.5349	13.847	5.4536	193.006
Espinaca Seca a T°amb. Equipo Soxhlet.	8.6239	1.7266	1.5292	32.558

Tabla 5.2. Clorofila total obtenida.

Proceso de Extracción	Cantidad de Espinaca (g)	Clorofila Total (mg)
Espinaca húmeda macerada	24.6438	1617.03
Espinaca húmeda equipo soxhlet	14.4591	1200.28
Espinaca seca macerada	9.0887	605.144
Espinaca seca equipo soxhlet	6.7503	405.234
Espinaca seca a T°amb macerada	13.5349	2612.32
Espinaca seca a T°amb. equipo soxhlet.	8.6239	280.777

Tabla 5.3 Rendimientos obtenido

Proceso de Extracción	Clorofila Total (mg/g)	Rendimiento (%)
Espinaca húmeda macerada	65.616	6.56
Espinaca húmeda equipo soxhlet	83.012	8.012
Espinaca seca macerada	66.582	6.6582
Espinaca seca equipo soxhlet	60.032	6.003
Espinaca seca a T° amb. macerada	193.006	19.3006
Espinaca seca a T° amb. equipo soxhlet.	32.558	3.2558

COMPARACIÓN DE RENDIMIENTO RESPECTO A OTRAS FUENTES.

El tomate tiene un rendimiento del 16.26% de clorofila, se encontró dentro de la bibliografía en el artículo *“Estimación de la Concentración de Nitrógeno y Clorofila en Tomate mediante un medidor portátil de Clorofila”*. (Terra Volumen 16 No. 21998).

La alfalfa tiene un rendimiento de 1.5% de clorofila (Cortez Sanchez, Gallardo Navarro, 2005. “Obtención e concentrados proteínicos a partir de alfalfa VII congreso nacional de ciencia de los alimentos y III foro de ciencia y tecnología de alimentos)

Observaciones del proceso

Durante la extracción mediante el equipo soxhlet, hubo cierta inestabilidad de la temperatura antes de manipular y encontrar la temperatura adecuada. Las primeras extracciones con espinaca seca y húmeda, la clorofila se oxido, debido a la temperatura excesiva, ya que la clorofila se oxida a la temperatura de mayor de 70°C.

También se encontró que existe una diferencia de temperatura entre la temperatura de extracción (cuando sube el solvente al cartucho para realizar las etapas de extracción) y la temperatura real del solvente dicha diferencia corresponde a 15°C.

Para medir la temperatura del solvente (acetona-agua), se tuvo que desarmar el equipo e introducir el termómetro al matraz bola donde se encontraba el solvente, la temperatura de ebullición de la acetona es a 52°C.

La temperatura donde se encontraba el cartucho con la muestra de espinaca, es decir donde comenzaban las etapas de extracción tiene 15°C menos que la temperatura del solvente.

Extracción Soxhlet

El tiempo de duración de la extracción depende de los componentes que se quieran obtener así como también el número de etapas experimental. En la mayoría de los casos fue de 3 a 5 horas de 6 a 10 etapas de recirculación de solvente, según el tiempo de extracción.

Condiciones del Trabajo experimental.

Secado de la espinaca cuidado de temperatura

La espinaca que se secó a temperatura ambiente de 26°C no recibía los rayos del sol, de tal manera que no se fuera a oxidar la espinaca.

Las muestras de espinacas que se secaron dentro de la estufa, se tuvieron que dejar varias muestras a diferentes temperaturas, ya que la temperatura de la estufa incrementaba hasta llegar a una temperatura estable, debido a que la temperatura de la clorofila no debe exceder de 70°C, se tenía que evitar llegar a esta temperatura.

La temperatura óptima para el secado de la espinaca dentro de la estufa fue a 22°C, para tener una temperatura estable dentro de la estufa de 30°C.

Pruebas de Soxhlet oxidadas por la temperatura.

Se hicieron varias extracciones de prueba con el fin de encontrar la cantidad de espinaca adecuada y el volumen de solvente para obtener el mejor rendimiento de la extracción, así como también la manipulación de la temperatura de la malla de calentamiento, en la cual se coloca el matraz de bola con el solvente.

En el equipo soxhlet se tuvieron que manipular dos temperaturas:

1. Temperatura del cartucho que contiene la espinaca, esta temperatura se midió directamente con el termómetro ya que alcanzaba llegar a la superficie del cartucho donde se encontraba la temperatura de evaporación del solvente.
2. Temperatura del solvente (acetona al 80%), para realizar esta medición fue necesario desmontar el equipo para introducir el termómetro al matraz de bola, esto es algo peligroso ya que la temperatura del solvente podría ser mayor que su temperatura de ebullición.

Se encontró que existe una diferencia de temperaturas entre la temperatura donde se encuentra el cartucho que contiene la espinaca y la temperatura real del solvente, para realizar la manipulación de estas temperaturas se tuvieron que manejar diferentes voltajes a la malla de calentamiento donde se introducía el matraz de bola con el solvente, para evitar la elevación de las dos temperaturas evitando la oxidación (temperatura mayor de 70°C) de la clorofila, basándose en la investigación teórica.

Recuperación de solvente

La recuperación del solvente se realizó por destilación simple, la malla de calentamiento se mantuvo con un voltaje de 26, para alcanzar la temperatura de ebullición del solvente a 52°C, así mismo se realizó la recuperación, tomando en cuenta que la clorofila no puede alcanzar temperaturas mayores a 70°C ya que a altas temperaturas oxida.

Durante la destilación simple se tiene una diferencia de temperatura de 31°C:

T_1 = Temperatura del refrigerante

T_2 = Temperatura solvente- clorofila

$$\Delta T = T_2 - T_1 = 83^\circ\text{C} - 52^\circ\text{C} = 31^\circ\text{C}$$

Temperatura del refrigerante 52°C.

Temperatura de la mezcla solvente-clorofila dentro del matraz bola a 83°C.

Las cuales no fue posible manipular debido a que si se bajaba el voltaje al cual se mantuvo la malla de calentamiento, no era posible llevar a cabo la recuperación del solvente, no se alcanzaba la temperatura de ebullición.

En la destilación simple el termómetro debe estar dentro del matraz en contacto con el extracto (clorofila-solvente), para evitar que exista la diferencia de temperatura y no se oxida la clorofila.

La clorofila que se obtuvo después de la destilación se oxidó, ya que sobrepasó los 70°C.

La destilación simple para la recuperación del solvente no es recomendable, debido a la diferencia de temperaturas que existe.

CONCLUSIONES

Las condiciones y recomendaciones para la obtención de un rendimiento favorable de clorofila de acuerdo con los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo, son las siguientes:

1. El rendimiento de las extracciones de clorofila, a partir de alfalfa y tomate es menor que el de las espinacas. La diferencia entre el rendimiento que se obtuvo del tomate y la espinaca es del 3.04% y la diferencia entre el rendimiento que se obtuvo de la alfalfa y la espinaca es del 12.9%, lo que nos lleva a concluir que es un proceso rentable.
2. En las condiciones en las que fue realizado este trabajo, la rentabilidad del proceso de obtención de clorofila a partir de espinaca, se observa en el beneficio del diagnostico económico obtenido que es de 99.9%.
3. El método de separación de clorofila-solvente, destilación simple, no arrojó buenos resultados, debido a la diferencia de temperatura entre la temperatura a la altura del refrigerante y la temperatura a la cual se encuentra la mezcla clorofila-solvente es de 30°C y esto no permite llegar a una manipulación favorable de temperaturas. Se propone para estudios posteriores la separación por métodos cromatográficos.

BIBLIOGRAFÍA

Bruinsma, J. 1963.

The quantitative analysis of chlorophyll a and b in plant extracts.

Photochem and Photobiol 2: 241-249.

Fox, R.H., P. Piekielek y K.M. MacNeal. 1994.

Using chlorophyll meter to predict nitrogen fertilizer needs of winter wheat.

Comm. Soil Plant Anal. 25: 171-181.

Hiderman, J., A. Makino, Y Kurita, T. Masa y K. Ojima. 1992.

Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll a/b protein of PS II in senescence.

Plant Cell

Physiol. 53: 1209-1214.

Krugh, B., L. Bichham y D. Miles. 1994. The solid-state chlorophyll meter, a novel instrument for rapidly and accurately determining the chlorophyll concentrations in seedling leaves.

Maize genetics cooperation. News Letter 68:25-27.

Bassi R, Rigoni F, Giacometti GM.1990.

Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae.

Photochem. Photobiol. 52:1187-206

Schmalko, M.;Alzamora, S.; Color, chlorophyll, caffeine and water content variation during yerba mate processing.

Drying Technology, 19 (3&4), 599-610 (2001).

Van Loey, A.; Ooms, V.; Weemaes, C.; Van den Broek, I.; Ludikhuyze, L.; Indrawati, S.; Denys, S.;Hendrickx,M.

“Thermal and Pressure-Temperature Degradation of Chlorophyll in Brócoli (*Brassica oleracea* L. italica) Juice”: a Kinetic Study, *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 5289-5294

Vernon, P. Spectrophotometric Determinations of Chlorophylls and Pheophytins in Plant Extracts.

Analytical Chemistry, 1960 – Vol 32, N°9 - 1144-1150

Weemaes, C.; Ooms, V.; Van Loey, A.; Indrawati, S.; Ludikhuyze, L.; Hendrickx, M.; Chlorophylls and Pheophytins degradation and green loss upon heating and/or pressurizations- a kinetic case study on broccoli juice. Department of Food and Microbial Technology, Katholieke Universiteit Leuven, Kard. Mercierlaan 92, Leuven, Vlaams-Brabant 3001, Belgium. 48-7-The IFT 1999 – Annual meeting.