



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SOLUBLES EN DIÓXIDO DE CARBONO EN
CONDICIONES SUPERCRÍTICAS A PARTIR DE HOJAS DESHIDRATADAS DE ESPINACA
(*Spinacia oleracea*)**

Livia Johana Alvarez González

Asesorado por el Ing. Qco. Benjamín Piedrasanta

Co-asesorado por el Lic. Qco. Eduardo Robles

Guatemala, marzo de 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SOLUBLES EN DIÓXIDO DE CARBONO EN
CONDICIONES SUPERCRÍTICAS A PARTIR DE HOJAS DESHIDRATADAS DE ESPINACA
(*Spinacia oleracea*)**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

LIVIA JOHANA ALVAREZ GONZÁLEZ
ASESORADO POR EL ING. QCO. BENJAMÍN PIEDRASANTA
CO-ASESORADO POR EL LIC. QCO. EDUARDO ROBLES

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, MARZO DE 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paíz Recinos
VOCAL I	Ing. Alfredo Enrique Beber Aceituno
VOCAL II	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL III	Ing. Miguel Angel Dávila Calderón
VOCAL IV	Br. Luis Pedro Ortiz de León
VOCAL V	P.A. José Alfredo Ortíz Herincx
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paíz Recinos
EXAMINADOR	Ing. Víctor Monzón
EXAMINADOR	Ing. Manuel Galván
EXAMINADOR	Ing. Benjamín Piedrasanta
SECRETARIO	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

**EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SOLUBLES EN DIÓXIDO DE CARBONO EN
CONDICIONES SUPERCRÍTICAS A PARTIR DE HOJAS DESHIDRATADAS DE ESPINACA
(*Spinacia oleracea*)**

Tema asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha Junio de 2009.

Livia Johana Alvarez González

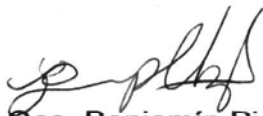
Guatemala, octubre de 2010

Director Escuela Ingeniería Química
Ing. Qco. Williams Alvarez
Presente

Por este medio hago constar que he asesorado y revisado el trabajo final de graduación para optar al título de Ingeniera Química de la señorita Livia Johana Alvarez González, titulado **“Extracción de metabolitos solubles en dióxido de carbono en condiciones supercríticas a partir de hojas deshidratadas de espinaca (*Spinacia oleracea*)”** el cual he encontrado satisfactorio, dándole mi visto bueno para que continúe el respectivo procedimiento de aprobación para el mismo.

Sin otro particular por el momento, me suscribo de usted.

Atentamente,


Ing. Qco. Benjamín Piedrasanta
Colegiado No. 715



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Guatemala, 18 de noviembre de 2010
Ref.EIQ.TG.146.2010

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Presente.

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el Acta TG-1172010-B-IF le informo que reunidos los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del informe final del trabajo de graduación, para optar al título de INGENIERA QUÍMICA a la estudiante universitaria LIVIA JOHANA ÁLVAREZ GONZÁLEZ, identificada con carné No. 2004-13331, titulado: **EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SOLUBLES EN DIÓXIDO DE CARBONO EN CONDICIONES SUPERCRÍTICAS A PARTIR DE HOJAS DESHIDRATADAS DE ESPINACA (*Spinacia oleracea*)**, el cual ha sido asesorado por el Ingeniero Químico Benjamín Piedrasanta y co-asesorado por el Licenciado en Química Pura Eduardo Robles.

Habiendo encontrado el referido informe final **satisfactorio**, se procede a recomendarle autorice a la estudiante **Álvarez González**, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑADA A TODOS"

Inga. **Teresa Lisely de León Arana**, **INGENIERA QUÍMICA**
COORDINADORA
Tribunal que revisó el informe final
Del trabajo de graduación



C.c.: archivo



El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación de la estudiante **LIVIA JOHANA ALVAREZ GONZÁLEZ** titulado: "**EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SOLUBLES EN DIÓXIDO DE CARBONO EN CONDICIONES SUPERCRÍTICAS A PARTIR DE HOJAS DESHIDRATADAS DE ESPINACA (*Spinacia oleracea*)**".
Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.


Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía; C.Dr.
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, febrero de 2011

Cc: Archivo
WGAM/ale

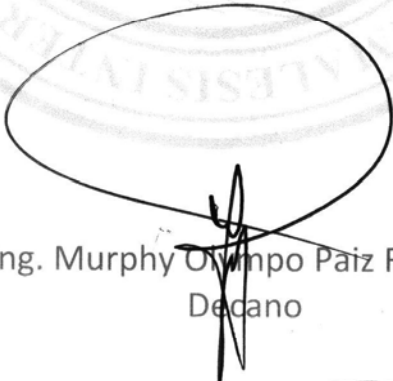




DTG. 073.2011

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SOLUBLES EN DIÓXIDO DE CARBONO EN CONDICIONES SUPERCRÍTICAS A PARTIR DE HOJAS DESHIDRATADAS DE ESPINACA (*Spinacia oleracea*)**, presentado por la estudiante universitaria **Livia Johana Alvarez González**, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:



Ing. Murphy Olimpo Paiz Recinos
Decano

Guatemala, 8 de marzo de 2011.



/gdech

ACTO QUE DEDICO A:

Dios	Por su inmenso amor, permitiéndome una vez más alcanzar la meta
Mis padres Hugo Alvarez y Livia de Alvarez	Por su ejemplo, apoyo, comprensión y amor a lo largo de todas las etapas de mi vida.
Mi novio José Luis Ortega	Por su apoyo y amor durante todos estos años.
Mis hermanos Daniel, José y Alejandra Alvarez	Por su cariño incondicional.
Mi padrino	Por su ejemplo inspirador y consejos a lo largo de mi carrera
Mis abuelos	Por su confianza en mí, animándome siempre a alcanzar la meta.
Mis tíos y primos	Por el apoyo y cariño que siempre me han mostrado.
Mis amigos	Por los momentos compartidos y triunfos juntos alcanzados

AGRADECIMIENTOS A:

Dios

Por permitirme este triunfo.

Lic. Qco. Eduardo Robles

Por su guía y asesoría en el tema de extracción supercrítica y uso del equipo de extracción y análisis.

Ing. Qco. Benjamín Piedrasanta

Por su valiosa colaboración en la asesoría, revisión y corrección en el desarrollo del presente trabajo.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

Por darme la oportunidad de realizar mis estudios profesionales en tan prestigiosa casa de estudios.

Escuela de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería, USAC

Por los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera, los cuales fueron fundamentales para la realización de esta investigación, así como para mi práctica laboral.

Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC

Por permitirme utilizar el equipo para la realización experimental de mi punto de tesis además de facilitarme las instalaciones para el mismo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	V
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XI
GLOSARIO.....	XIII
RESUMEN.....	XVII
OBJETIVOS.....	XIX
HIPÓTESIS.....	XXI
INTRODUCCIÓN.....	XXIII
1. ANTECEDENTES.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Los fluidos supercríticos.....	3
2.1.1 Comparación de los FSC con los líquidos.....	6
2.1.2 Solventes supercríticos más utilizados.....	8
2.1.3 Dióxido de carbono supercrítico.....	11
2.1.3.1 Ventajas del dióxido de carbono.....	11
2.1.3.2 Desventaja principal del dióxido de carbono	12
2.1.3.3 El dióxido de carbono y la química verde...	12
2.1.4 Proceso de extracción supercrítica.....	13
2.1.4.1 Ventajas del proceso.....	13
2.1.5 Extracción supercrítica de analitos polares.....	14
2.1.6 Aplicación de fluidos supercríticos en extracción analítica	16
2.2 Espinaca.....	17
2.2.1 Clasificación científica.....	18

2.3	Senescencia en las hojas.....	18
2.4	Clorofila.....	20
2.4.1	Acciones de la clorofila en el ser humano.....	23
2.5	Cromatografía líquida de alta resolución.....	24
2.5.1	Cromatografía de fase reversa.....	25
2.5.2	Parámetros.....	27
2.5.2.1	Diámetro interno.....	27
2.5.2.2	Medida de las partículas.....	28
2.5.2.3	Tamaño de poro.....	28
2.5.2.4	Presión de la bomba.....	28
2.6	Espectrofotometría de absorción.....	29
3.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	31
3.1	Variables.....	31
3.1.1	Variable dependiente.....	31
3.1.2	Variables independientes.....	31
3.1.3	Variable de respuesta.....	31
3.2	Recursos humanos disponibles.....	31
3.3	Recursos materiales disponibles.....	32
3.4	Técnica cualitativa o cuantitativa.....	33
3.4.1	Diseño de tratamiento.....	33
3.4.2	Diseño experimental.....	33
3.5	Recolección y ordenamiento de la información.....	33
3.5.1	Manejo del experimento.....	33
3.5.2	Descripción del procedimiento.....	34
3.5.3	Análisis en espectrofotómetro UV visible.....	35
3.5.4	Análisis en HPLC.....	36
3.6	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información	36
3.7	Análisis estadístico.....	37

3.7.1	Modelo estadístico.....	37
4.	RESULTADOS.....	39
4.1	Absorción vs. Longitud de onda.....	39
4.2	Extractos en HPLC.....	40
4.3	Análisis de varianza.....	41
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	43
	CONCLUSIONES.....	47
	RECOMENDACIONES.....	49
	BIBLIOGRAFÍA.....	51
	APÉNDICE.....	55
	ANEXOS.....	95

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Diagrama de fases	4
2.	Compresión de un fluido	4
3.	Densidad en los fluidos comprimidos	5
4.	Proceso de extracción supercrítica	12
5.	Cambios durante la senescencia en las hojas	20
6.	Barrido espectral traslapado de ambos tamaños de partícula de extracto de espinaca extraído con CO ₂ a las tres distintas presiones, ampliado de 400 a 800 nm	39

TABLAS

I.	Valores típicos para los fluidos supercríticos (FSC)	5
II.	Propiedades críticas de diferentes fluidos	11
III.	Resumen de cuantificación de metabolitos por HPLC presentes en cada extracto en función del área por pico detectado	40
IV.	Resumen de cuantificación de metabolitos totales por HPLC presentes en cada extracto en función del área total	40
V.	Análisis de varianza de dos factores con una muestra por grupo	41
VI.	Resultado análisis de varianza	41

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
$\tau\beta_{ij}$	Efecto de la interacción presión-tamaño de partícula
μ	Efecto de la media general
$\varepsilon_{i,j,k}$	Efecto del error experimental
τ_i	Efecto del i-ésimo presión de extracción
β_j	Efecto del j-ésimo tamaño de partícula
Ha	Hipótesis alterna
Ho	Hipótesis nula
=	Igual
≠	No es igual
Pc	Presión crítica
$\mu M_i T_i$	Rendimiento de clorofila de espinaca de la interacción del i-ésimo experimento
$\mu M_j T_j$	Rendimiento de clorofila de espinaca

de la interacción del j-ésimo
experimento

Tc

Temperatura crítica

$Z_{(ij)}$

Variable respuesta de la i, j-ésima
unidad muestreada experimental

GLOSARIO

Absorbancia	Denominada A , definida por la ecuación $A = -\log T = -\log (P/P_0) = bc$
Absorción	Pérdida de la intensidad de una radiación al atravesar la materia. El que registra la distribución o la abundancia de átomos ionizados, moléculas o partes de moléculas en función de una masa o de la relación masa-carga.
Barrido espectral	Es la variación de la longitud de onda necesaria para la búsqueda de una longitud máxima donde el analito absorbe más luz.
Cromatograma	Es el resultado gráfico de la cromatografía. En el caso de separación óptima, los diferentes picos o manchas del cromatograma se corresponden a los componentes de la mezcla separada. En el eje X se representa el tiempo de retención, y en el eje Y una señal correspondiente

a la respuesta creada por los diferentes analitos existentes en la muestra. En el caso de un sistema óptimo, la señal es proporcional a la concentración del analito específico separado.

Espectrofotometría

Se refiere a la medida de cantidades relativas de luz absorbida por una muestra, en función de la longitud de onda.

FSC

Fluido supercrítico

HPLC

High performance liquid chromatography / Cromatografía líquida de alta eficiencia.

Longitud de onda

Distancia que recorre la onda en el intervalo de tiempo transcurrido entre dos máximos consecutivos de una de sus propiedades. Por ejemplo, la distancia recorrida por la luz azul (que viaja a 300.000 km/s) durante el tiempo transcurrido entre dos máximos consecutivos de su campo eléctrico (o magnético) es la longitud de onda de esa luz azul. La luz roja, viaja a la misma velocidad, pero su campo eléctrico aumenta y disminuye más lentamente que en el caso de la

luz azul. Por tanto, la luz roja avanzará más distancia que en el caso de la luz azul durante el intervalo de tiempo entre dos máximos consecutivos de su campo eléctrico. Por eso la longitud de onda de la luz roja es mayor que la longitud de onda de la luz azul.

Metabolito

Producto del metabolismo. Es cualquier molécula utilizada o producida durante el metabolismo.

Número de Mesh

Especifica el tamaño de partícula de un tamaño mínimo que será retenido en la malla. Por ejemplo si un tamiz es Mesh #8, significa que en 1 pulgada existirán 8 cuadrados de 2.36 mm de longitud.

Tiempo de retención

Es el tiempo característico que tarda un analito particular en pasar a través del sistema (desde la columna de entrada hasta el detector) bajo las condiciones fijadas.

RESUMEN

El presente trabajo estudia la extracción de metabolitos, utilizando dióxido de carbono en condiciones supercríticas, a partir de hojas secas de espinaca. Para esto se analizaron muestras extraídas utilizando tres distintas presiones (1200, 1350 y 1500 PSI) a partir de material vegetal con dos distintos tamaños de partícula (entre tamiz # 6 y 14 y 14 y 22), con el fin de comprender mejor el comportamiento de la extracción supercrítica, determinando si es posible la extracción de metabolitos utilizando dicho método y si existe diferencia significativa en la concentración de los mismos al variar la presión y el tamaño de partícula del material vegetal seco.

Los resultados obtenidos a través del análisis espectrofotométrico demostraron que si es posible obtener metabolitos a partir de la espinaca, utilizando CO₂ en condiciones supercríticas, con alta probabilidad de presencia de clorofila. Con la ayuda de un equipo HPLC, se determinó que no existe diferencia significativa en el rendimiento de metabolitos al utilizar tres distintas presiones supercríticas y dos tamaños de partículas, para un mismo material vegetal con tiempo de residencia y temperatura invariable.

OBJETIVOS

General

Obtener metabolitos solubles en dióxido de carbono en condiciones supercríticas a partir de hojas deshidratadas de espinaca (*spinacea oleracea*).

Específicos

1. Evaluar el rendimiento de la extracción supercrítica a partir de las hojas de la espinaca, por la cantidad de metabolitos detectados por HPLC, en función de tres presiones distintas seleccionadas y dos tamaños de partícula.
2. Identificar por espectrofotometría, posibles tipos de metabolitos extraídos.
3. Determinar si existe diferencia significativa entre la cantidad de metabolitos presentes en los extractos obtenidos por medio de análisis de varianza del área total, medida por HPLC.

HIPÓTESIS

“Es posible extraer metabolitos solubles en dióxido de carbono en condiciones supercríticas de la hoja seca de Spinacea Oleracea.”

Hipótesis estadística

NULA

Ho: No existe diferencia significativa en el rendimiento de metabolitos de Spinacea Oleracea, si se utilizan tres diferentes presiones y dos tamaños de partículas.

$$\mu M_i T_i = \mu M_j T_j$$

Donde:

$\mu M_i T_i$: Rendimiento de metabolitos de espinaca de la interacción del i-ésimo experimento.

$\mu M_j T_j$: Rendimiento de metabolitos de espinaca de la interacción del j-ésimo experimento.

ALTERNATIVA

Ha: Existe diferencia significativa en el rendimiento de metabolitos de Spinacea Oleracea, si se utilizan para la extracción, tres diferentes presiones y dos tamaños de partículas.

$$\mu M_i T_i \neq \mu M_j T_j$$

INTRODUCCIÓN

Cuando un fluido se somete a condiciones por encima de su presión y temperatura crítica, se encuentra en su estado supercrítico. En este estado, la línea de separación de fases líquido-gas se interrumpe. Esto implica la formación de una sola fase en la que el fluido tiene propiedades intermedias entre las de un líquido y las de un gas: mientras se mantiene una gran difusividad (propia de los gases), se consigue una alta densidad (cercana a la de los líquidos).

El uso de solventes supercríticos para la extracción de compuestos orgánicos, ha recibido mucha atención en los últimos años debido a la disminución en el tiempo de extracción (comparado con otras técnicas de extracción) y la utilización de solventes líquidos en menor cantidad.

Los fluidos supercríticos más utilizados son CO_2 , N_2O , CHClF_2 , NH_3 , SF_6 . Sin embargo, la mayoría de investigaciones de extracción con fluidos supercríticos, han utilizado CO_2 debido a su baja toxicidad y costo, sus parámetros críticos razonables y su habilidad para solvatar un gran rango de compuestos orgánicos de baja y moderada polaridad.

Un proceso típico de extracción consiste en un reactor en el que se introduce el substrato original y una cantidad de CO_2 . El sistema se presuriza y se calienta hasta alcanzar condiciones supercríticas con lo que el CO_2 disuelve los compuestos a extraer. A continuación, se transfiere el fluido a otro reactor donde se despresuriza la mezcla resultando la liberación del soluto y la eliminación del CO_2 como gas.

La extracción con fluidos supercríticos tiene el potencial de cambiar el laboratorio analítico y sus procedimientos de extracción actuales dramáticamente. Es por esto que en esta tesis se pretende ampliar el conocimiento sobre extracciones supercríticas y su efectividad para la obtención de metabolitos a partir de material vegetal seco, en este caso la espinaca.

Para la realización de la parte experimental de este estudio se obtuvieron hojas frescas de espinaca de un mercado local, las cuales fueron deshidratadas hasta obtener una humedad constante. Este material fue entonces molido y cernido a modo de obtener dos distintos tamaños de partícula uniforme.

Se realizaron dos extracciones para cada tamaño de partícula a tres distintas presiones con temperatura, tiempo de residencia y volumen de muestra invariable. De estas se obtuvieron doce extractos que fueron analizados por medio de un espectrofotómetro, UV visible, determinando la presencia de metabolitos en cada una de ellas. Una muestra por tratamiento fue entonces analizada con ayuda de un equipo de HPLC, determinando la cantidad de metabolitos presentes en las mismas.

Por último, se determinó por medio de análisis de varianza que no existe diferencia significativa en la cantidad de metabolitos obtenidos en la extracción, con dióxido de carbono en condiciones supercríticas para las tres presiones y dos tamaños de partícula estudiados.

1. ANTECEDENTES

En 1994, Edgar Loaiza, realizó el primer estudio documentado sobre extracción supercrítica en Guatemala, titulado “Extracción supercrítica con CO₂”, como tesis de graduación en la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad San Carlos de Guatemala. En este realizó el diseño y montaje de un aparato para extracción supercrítica con CO₂, con el propósito de demostrar que en Guatemala es posible diseñar y montar un aparato de alta tecnología que permitiera realizar micro-extracciones en el menor tiempo posible y obtener mejores porcentajes de rendimiento de extracción, comparados contra el método de extracción exhaustiva con Soxhlet.

En este estudio se realizaron diez extracciones de metoxicumarina en pericón con el aparato de extracción supercrítica, con CO₂ y diez extracciones por el método de extracción Soxhlet. Evaluando la concentración por cromatografía en ambos casos. Los resultados obtenidos demostraron que se obtuvo un 55% de mayor rendimiento en extracción de 7 – metoxicumarina por extracción supercrítica en comparación con la extracción Soxhlet. También se determinó que el tiempo empleado en la extracción supercrítica fue 90% menor que la extracción Soxhlet. Todos estos resultados fueron obtenidos con un 95% de confiabilidad estadística.

Otro estudio importante sobre la extracción supercrítica en Guatemala fue elaborado en el año 2009 con el informe del proyecto FODECYT No. 49-2006 “Extracción supercrítica y cuantificación HPLC de Luteína y Beta Caroteno presentes en vegetales de consumo popular”. En este se utilizó la tecnología supercrítica para la extracción de los pigmentos Luteína y Beta Caroteno,

debido a la rapidez y eficiencia del mismo. Logrando resultados positivos para la extracción de estos pigmentos los cuales fueron comparados con los tiempos de retención en HPLC de los estándares establecidos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Los fluidos supercríticos

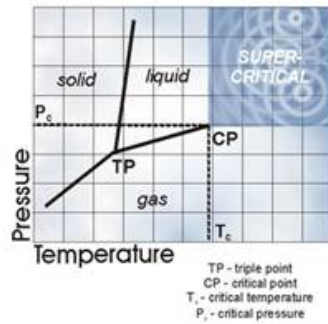
Muchas propiedades fisicoquímicas describen una sustancia o mezcla química. Por ejemplo, el punto de ebullición, la densidad y la constante dieléctrica, pueden ser utilizadas para caracterizar una especie o sistema particular como un sólido, líquido o gas. Sin embargo, si una sustancia es calentada y mantenida arriba de su temperatura crítica se vuelve imposible licuificarla a su presión. Cuando se aplica presión a este sistema se forma una sola fase que muestra propiedades fisicoquímicas únicas. Esta fase es llamada fluido supercrítico y está caracterizada por una temperatura y presión críticas (T_c y P_c).

Los fluidos supercríticos ofrecen recursos para alcanzar propiedades de solvatación que tienen características de gas y líquido sin cambiar de estructura química. Con un adecuado control de la presión y la temperatura, se puede tener acceso a un rango significativo de propiedades fisicoquímicas, sin pasar nunca por un cambio de fase, por ejemplo, de gas a líquido. Así, un fluido supercrítico puede ser considerado un solvente continuamente ajustable.

Cuando un fluido se somete a condiciones por encima de su presión y temperatura crítica, se encuentra en su estado supercrítico. En este estado, la línea de separación de fases líquido-gas se interrumpe. Esto implica la formación de una sola fase (fig. 1) en la que el fluido tiene propiedades intermedias entre las de un líquido y las de un gas: mientras se mantiene una

gran difusividad (propia de los gases), se consigue una alta densidad (cercana a la de los líquidos).

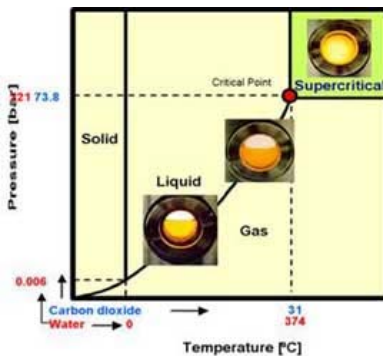
Figura 1. Diagrama de fases



Fuente: Flucomp, 2003

Al sobrepasar el punto crítico el menisco desaparece y se crea una sola fase, como se muestra en la siguiente figura.

Figura 2. Compresión de un fluido



Fuente: Flucomp, 2003

Algunas propiedades de las sustancias varían ampliamente en un rango extenso de temperaturas y presiones alrededor del punto crítico como la densidad, viscosidad, difusividad, capacidad calorífica, conductividad térmica y

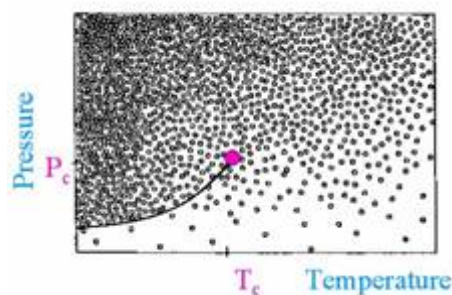
constante dieléctrica. Los valores de ciertas propiedades de los fluidos supercríticos son intermedios entre las de los líquidos y las de los gases.

Tabla I. Valores típicos para los fluidos supercríticos (FSC)

Propiedad	Gas	FSC	Líquido
Densidad (kg/m^3)	1	100-800	1000
Viscosidad (cP)	0.01	0.05-0.1	0.5-1.0
Difusividad (mm^2/s)	1-10	0.01-0.1	0.001

Al igual que los gases, la densidad de los FSC varía enormemente con la presión y la temperatura, aunque se alcanzan densidades muy cercanas a las de los líquidos. Así, la propiedad característica de los fluidos supercríticos es el amplio rango de altas densidades que pueden adoptar, dependiendo de las condiciones de presión y/o temperatura (a diferencia de los líquidos que son prácticamente incompresibles y de los gases que poseen densidades siempre muy bajas).

Figura 3. Densidad en los fluidos comprimidos



En la figura anterior se representa gráficamente la densidad de un fluido. A través de la línea de transición líquido-gas, el cambio de densidad es abrupto.

Cerca de la temperatura crítica, desaparece esa transición y se puede variar de forma continua la densidad en función de la presión.

Dada la relación directa entre la densidad de un fluido con su poder solvatante, se tiene que los fluidos supercríticos pueden variar enormemente su capacidad de solvatación a través de pequeñas variaciones en la presión y/o temperatura.

2.1.1 Comparación de los FSC con los líquidos

- La densidad es la propiedad responsable del poder disolvente de los fluidos.
- La baja viscosidad dota a los fluidos supercríticos de una gran facilidad de transporte y de una velocidad de transferencia de masa más elevada.
- La elevada difusividad y la tensión superficial prácticamente nulas permiten una mejor penetración en las matrices sólidas.

Teniendo en cuenta estas características, los FSC se convierten en disolventes ideales, puesto que su enorme difusividad les permite penetrar perfectamente a través de matrices porosas y su capacidad de solvatación modulable les permite una gran versatilidad y selectividad según las condiciones de presión y temperatura a las que se sometan. Sus aplicaciones principales son:

- Extracción (especialmente de productos naturales): no deja residuos, se obtienen extractos de alta pureza y no requiere altas temperaturas.

- Precipitación: obtención de cristales con morfología muy uniforme, alta pureza y libre de residuos de disolvente.
- Medio de reacción: la existencia de una sola fase permite una óptima transferencia de masa y de energía.

Debido a sus características únicas, los fluidos supercríticos han recibido gran atención en un buen número de campos científicos. Varias razones son tomadas en cuenta para escoger un fluido supercrítico sobre otros sistemas de solvatación, pero la elección está gobernada generalmente por: 1) la solvatación única y las propiedades de transferencia de masa favorables y, 2) la facilidad con que el potencial químico puede ser variado, simplemente ajustando la presión o temperatura del sistema.

En la última década, ha ocurrido bastante progreso en la tecnología de fluidos supercríticos. Por ejemplo, los fluidos supercríticos han encontrado un amplio uso en extracciones y cromatografía, procesos de reacciones químicas, y recuperación de aceites. Recientemente, se han utilizado como solventes para cargar reacciones basadas en enzimas. Desafortunadamente, a pesar que, los fluidos supercríticos son utilizados efectivamente en muchas áreas, existe todavía falta de entendimiento detallado de procesos fundamentales que gobiernan estos solventes peculiares.

En un esfuerzo por cubrir esta debilidad, se han realizado estudios significativos para determinar los aspectos fundamentales de las interacciones soluto – soluto, soluto – fluido, y soluto – cosolvente en procesos de fluidos supercríticos. En algunos casos se ha utilizado espectroscopia óptica y otros ha usado cromatografía como herramienta para probar estas interacciones. Muchos de estos estudios experimentales se han completado con cálculos

teóricos. La conclusión general de estos estudios determinó que existe un aumento de densidad local del soluto cerca del punto crítico. También se ha sugerido que existe una mejor interacción soluto – soluto, cerca del punto crítico.

2.1.2 Solventes supercríticos más utilizados

El uso de solventes supercríticos para la extracción de compuestos orgánicos, ha recibido mayor atención debido a la disminución en el tiempo de extracción (comparado con otras técnicas de extracción) y la utilización de solventes líquidos en menor cantidad. Los fluidos supercríticos más utilizados son: CO₂, N₂O, CHClF₂, NH₃, SF₆

La mayoría de investigaciones de extracción con fluidos supercríticos, han utilizado CO₂ debido a su baja toxicidad y costo, sus parámetros críticos razonables y su habilidad para solvatar un gran rango de compuestos orgánicos de baja y moderada polaridad. Sin embargo, extracciones cuantitativas desde algunas matrices ambientales, requieren fluidos supercríticos que no sean capaces únicamente de interactuar con la matriz (o analito) para facilitar la interacción entre el soluto y el fluido supercrítico.

Desafortunadamente, muchos de los fluidos supercríticos puros, que son significativamente más polares que el CO₂ tienen condiciones críticas (temperatura y presión) altas o son reactivos (por ejemplo amoníaco) para utilizarse en extracciones supercríticas analíticas. Sin embargo, extracciones supercríticas con una mayor polaridad, como N₂O (momento dipolar permanente de 0.2Debye versus 0.0 para el CO₂) pueden incrementar la eficiencia de la extracción de compuestos de alto peso molecular, indicando que

los fluidos con altos momentos dipolares permanentes, pueden utilizarse para incrementar eficiencias de extracción con fluidos supercríticos.

Investigaciones realizadas por Hawthorne, Lagenfeld y Miller (1992), indican que la selección de fluidos para extracciones supercríticas, es limitada debido a la necesidad de alcanzar presiones y temperaturas críticas altas, que sean químicos inertes, baja toxicidad y un estado gaseoso a condiciones ambientales (para facilitar la recolección de analitos extraídos). Algunos freones no exhiben esta posibilidad, aunque pueden tener propiedades como alto momento dipolar. Pero el uso de fluoroclorocarbonados, freones en particular, para procesos industriales es también reducido (pueden tener menos uso para pruebas analíticas), el probable reemplazamiento, por clorofluorocarbonados hidrogenados que tiene menor efecto en el agotamiento de la capa de ozono y son mejores fluidos extractores.

Hawthorne y demás investigadores, no recomiendan utilizar el N_2O como solvente extractor, ya que es altamente oxidante y, extracciones de grandes cantidades de material orgánico a alta temperatura, pueden causar accidentes fatales.

Raynie, D. (1993), realizó extracciones de aceites esenciales de café utilizando N_2O , resultando una explosión y destrucción del recipiente de extracción. Él recomienda no utilizar N_2O en extracciones supercríticas, especialmente cuando las muestras a extraer, tienen alto contenido de compuestos orgánicos. Además no utilizar mezcla de cosolventes en la extracción junto al N_2O .

Sievers y Hansen analizan el potencial explosivo que tiene el Oxido nitroso al utilizarlo como solvente. Ellos mezclaron el N_2O junto al metanol en la extracción, lo cual produjo una explosión de la celda inmediatamente.

Hawthorne, Langenfeld y Miller concluyen que extracciones supercríticas con $CHClF_2$, dá consistentemente mayores rendimientos de extracción de Hidrocarburos Polialicíclicos, Policloro bifénilos, un rango de analitos iónicos y no polares, que utilizando otros solventes supercríticos como el CO_2 y N_2O . Recomiendan el uso de CO_2 como supercrítico ya que, los otros dos antes mencionados, el N_2O es altamente peligroso y el $CHClF_2$ destruye la capa de ozono.

Langenfeld, J. y Hawthorne, S. midieron la densidad de tres fluidos supercríticos CO_2 , N_2O , $CHClF_2$ y CO_2 modificado con metanol al 5% en volumen, utilizando un gran rango de presiones (60-600atm) y temperaturas (40-150°C). Las densidades de los fluidos supercríticos calculados con la ecuación de estado modificada, concordaron con las mediciones experimentales y hubo desviación menor al 4% entre los valores obtenidos. La técnica utilizada es buena, segura y reproducible; el aparato utilizado fue fácilmente ensamblado.

En la siguiente tabla se muestran las propiedades críticas de diferentes fluidos, remarcando el CO_2 y el H_2O ya que estos son, sin duda, los más estudiados.

Tabla II. Propiedades críticas de diferentes fluidos

Fluido	Temperatura Crítica [°C]	Presión Crítica [bar]	Densidad Crítica [kg/m ³]
Etileno	9.3	50.4	220
Xenón	16.6	58.4	120
Dióxido de Carbono	31.1	73.8	470
Etano	32.2	48.8	200
Óxido Nitroso	36.5	71.7	450
Propano	96.7	42.5	220
Amoníaco	132.5	112.8	240
I-Propanol	235.2	47.6	270
Metanol	239.5	81.0	270
Agua	374.2	220.5	320
Tolueno	318.6	41.1	290

2.1.3 Dióxido de carbono supercrítico

Sin duda el fluido más utilizado, tanto a nivel de investigación como en aplicaciones industriales, es el CO₂. Se trata de un gas inocuo, abundante y barato, cuyas condiciones críticas son relativamente bajas (31°C, 73 atm) y por tanto fáciles de operar.

2.1.3.1 Ventajas del dióxido de carbono

- Parámetros críticos accesibles

- Baja temperatura crítica: muy ventajosa para extraer productos naturales sin que ocurra degradación térmica
- Baja toxicidad: PEL = 5000ppm
- No es inflamable
- Es bastante inerte desde el punto de vista químico
- Bajo costo

2.1.3.2 Desventaja principal del dióxido de carbono

- No disuelve bien los compuestos polares

2.1.3.3 El dióxido de carbono y la química verde

- Es un disolvente inocuo y no inflamable. Conduce a procesos seguros.
- Los productos obtenidos suelen ser seguros porque no hay residuos de disolvente.
- Es un recurso abundante en la atmósfera y se puede considerar renovable (eliminando, por supuesto, el exceso de origen antropogénico).

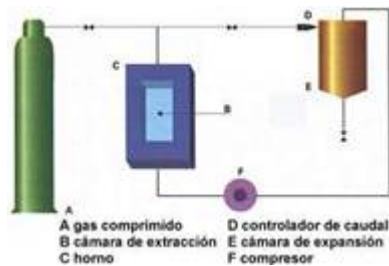
Se sabe que el dióxido de carbono es el causante del efecto invernadero y del calentamiento global del planeta, pero en el caso de su uso, para extracciones, no se produce específicamente para la extracción supercrítica,

por lo que no contribuye al aumento de la cantidad total en la atmósfera. Puede también reciclarse en el proceso, lo cual es una forma de secuestrar CO₂, si bien en pequeñas cantidades. La situación ideal se presentaría si el CO₂ se capturase directamente de la atmósfera.

2.1.4 Proceso de extracción supercrítica

Un proceso típico de extracción consiste en un reactor en el que se introduce el substrato original y una cantidad de CO₂. El sistema se presuriza y se calienta hasta alcanzar condiciones supercríticas, con lo que el CO₂ disuelve los compuestos a extraer. A continuación, se transfiere el fluido a otro reactor donde se despresuriza la mezcla, resultando la liberación del soluto y la eliminación del CO₂ como gas.

Figura 4. Proceso de extracción supercrítica



Fuente: Ciencia Hoy, Volumen 8, N° 43.

2.1.4.1 Ventajas del proceso

- Utiliza condiciones suaves (especialmente importante en compuestos termolábiles).

- Mayor pureza del extracto: el CO₂, al convertirse en gas, se elimina prácticamente por completo sin dejar residuos en el extracto. Además, es inocuo, a diferencia de la mayoría de disolventes industriales.
- Mayor rendimiento del proceso: el CO₂ supercrítico penetra mejor en el interior de la matriz; además el soluto, una vez extraído, se recupera totalmente (su solubilidad en el gas es nula).
- La modulación del poder solvatante permite la extracción y recuperación selectiva de diferentes productos.
- Respeto al medio ambiente: evita el uso de disolventes clorados y no produce efluentes que deban tratarse posteriormente.

2.1.5 Extracción supercrítica de analitos polares

La extracción con fluidos supercríticos en escala analítica, recientemente, ha sido una alternativa atractiva a los métodos de extracción convencional, donde se utilizan solventes líquidos para la recuperación de analitos orgánicos presentes en sólidos y resinas adsorbentes. Esto se hace con el fin de reducir el uso de solventes orgánicos que dejan trazas en la muestra y contaminan el ambiente, además, por obtener buenos rendimientos en la recuperación y pequeños tiempos de extracción.

La mayoría de reportes se han centrado sobre analitos relativamente no polares (por ejemplo, analitos tratados por análisis de CG convencional), extracciones cuantitativas con fluidos supercríticos de analitos polares y analitos iónicos que han requerido la adición de solventes orgánicos para modificar la

polaridad del CO₂, o el uso de fluidos (por ejemplo CHCl₃) el cual es menos aceptable para análisis rutinarios.

Estudios realizados por Hawthorne, S., Miller D., Nivens y White, sobre extracción con fluidos supercríticos de compuestos orgánicos polares desde sólidos, fue hecho por derivatización de los analitos a especies menos polares bajo condiciones de extracción supercrítica estática, utilizando reactivos como Hidróxido de trimetilfenilamonio y trifluoruro de boro en metanol. Después de la derivatización, los analitos fueron extraídos con CO₂ utilizando técnicas estándar de extracción supercrítica y analizadas sin tratamiento adicional utilizando CG capilar convencional.

El estudio lo hacen sobre el desenvolvimiento y aplicación de métodos de derivatización / extracción con fluidos supercríticos para la derivatización y cuantificación (<90%) de herbicidas (ácido (2,4-diclorofenoxi) acético y ácido 3,6 dicloro-2-metoxibenzoico) desde suelos y sedimentos, ácidos grasos fosfolípidos desde células microbianas y desperdicios fenólicos acuosos presentes en agua. Ellos concluyen que la derivatización química en la celda de extracción bajo condiciones de extracción supercríticas puede ser usada para reducir la polaridad de analitos durante un proceso de extracción supercrítica estática. Además, esta técnica es una forma fácil de extraer sustancias polares con alto rendimiento y pueden ser analizados sin ninguna preparación previa.

Este método ha sido aplicado en la extracción de una gran cantidad de compuestos polares desde bentazona, fenilurea, herbicidas, ácidos clorados, hasta aminoácidos y fármacos.

2.1.6 Aplicación de fluidos supercríticos en extracción analítica

La extracción con fluidos supercríticos tiene el potencial de cambiar el laboratorio analítico y sus procedimientos de extracción actuales dramáticamente. Las predicciones de la explotación monetaria de esta técnica son astronómicas. Consecuentemente, la cantidad de investigación, desarrollo y aplicación de extracción supercrítica, está creciendo rápidamente.

En escala analítica, King ha reportado el conocimiento de cuatro parámetros básicos de la extracción de fluidos supercríticos como una ayuda para comprender el comportamiento de soluto en un medio de gas comprimido. Estos cuatro parámetros son la miscibilidad, la solubilidad máxima, el rango de presión de fraccionamiento y las propiedades físicas del soluto.

Específicamente, la miscibilidad es la presión a la cual el soluto empieza a disolver en el fluido supercrítico. Esta presión es dependiente de la técnica y varía con la sensibilidad del método analítico usado para medir la concentración del soluto en la fase del fluido supercrítico. La solubilidad máxima es la presión a la cual el soluto tiene su máxima solubilidad en el fluido supercrítico. Cuando la fuerza de solvatación del solvente de extracción es igualada a la del soluto, el sistema se encuentra en su solubilidad máxima. El rango de presión entre la presión de miscibilidad y la solubilidad máxima, es el rango de presión de fraccionamiento. En este rango, el enriquecimiento de un componente sobre otro en el fluido supercrítico es posible si se varía la presión o densidad.

La regulación de la solubilidad del soluto en el solvente supercrítico todavía se encuentra en sus primeras etapas. El fraccionamiento es aumentado por las diferencias en las propiedades físicas del soluto. Dos solutos con grandes diferencias de punto de ebullición o de fusión pueden ser fácilmente separados por cambios de temperatura en el proceso de extracción

supercrítica. Otros solutos, con propiedades comunes, no son tan fácilmente fraccionados.

Las aplicaciones ambientales de la extracción supercrítica parecen ser las más comunes en la literatura. Un ejemplo típico es la comparación de la eficiencia de extracción de 2,3,7,8-tetraclorodibenceno-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD) de muestras de sedimentos utilizando extracción supercrítica y cinco fases móviles independientes con extracción Soxhlet. Las fases móviles, dióxido de carbono, óxido nitroso, puros y modificados con 2% metanol y sulfuro hexafluoride, fueron examinadas. Los sistemas con óxido nitroso puro, dióxido de carbono modificado y óxido nitroso modificado, dieron los recobramientos en un rango aceptable del 80 al 100%. Los otros dieron una recuperación menor al 50%, bajo las mismas condiciones.

Las recuperaciones con Soxhlet fueron menores al 65%. La elección de la fase móvil, es todavía una de las principales dudas en la extracción supercrítica, aparenta ser dependiente de varios factores: polaridad del soluto de interés, interacciones esteáricas y también las interacciones entre la fase móvil y la matriz. Los parámetros físicos del soluto de interés, como fue sugerido por King, también deben ser considerados.

2.2 Espinaca

Nombre binomial: *Spinacia oleracea*

La espinaca es una planta anual, de la familia de las *amarantáceas*, cultivada como verdura por sus hojas comestibles, grandes y de color verde muy oscuro. Su cultivo se realiza durante todo el año y se puede consumir

fresca, cocida o frita. En la actualidad es una de las verduras que habitualmente se encuentra congelada.

Es rica en vitaminas A y E, yodo y varios antioxidantes. También contiene bastante ácido oxálico, por lo que se ha de consumir con moderación. Fue cultivada por primera vez en Persia y de ahí deriva su nombre: *Esfenaj*. Los árabes la introdujeron a España hacia el siglo XI y se extendió por toda Europa alrededor del siglo XV.

2.2.1 Clasificación científica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Amaranthaceae

Género: *Spinacia*

Especie: *S. oleracea*

2.3 Senescencia en las hojas

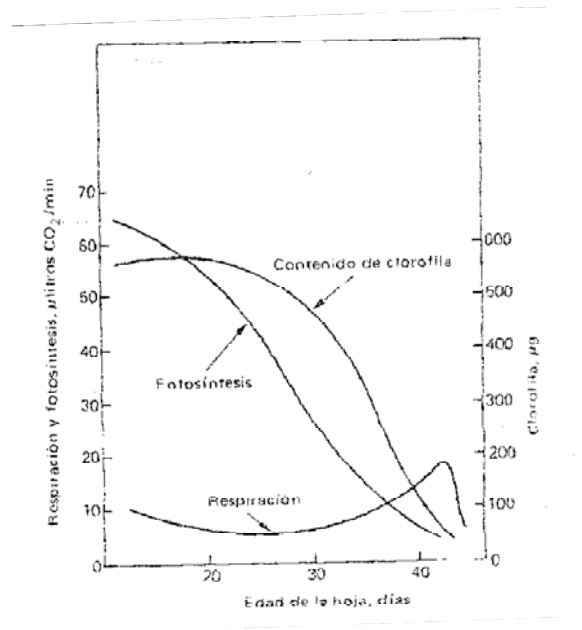
A nivel celular la senescencia parece estar controlada rígidamente, si bien no se conocen los mecanismos de control. Las células senescentes sufren una reducción de su estructura y la mayoría de las inclusiones membranosas subcelulares se rompen. Se ha sugerido que la vacuola actúa como un lisosoma, secretando enzimas hidrolíticas que digieren el material celular que ha dejado de ser necesario. Es evidente que ocurre algún tipo de destrucción del tonoplasto y las enzimas hidrolíticas se liberan al citoplasma. Sin embargo,

la situación no es tan simple pues también se reduce la estructura interna de los cloroplastos y mitocondrias; parece que esto sucede antes que se rompan sus membranas externas.

Por lo tanto, parece probable que se inicien procesos de degradación o se eliminen procesos de síntesis, tanto en los organelos como en las células. Posiblemente la misma señal que causa la senescencia en las células, es percibida también por sus organelos provocando que lleguen a la senectud simultáneamente.

En el metabolismo y contenido de los órganos, en senescencia, tienen lugar cambios conspicuos. Se ha observado un decrecimiento en el DNA, RNA, proteínas, iones inorgánicos y varios nutrientes orgánicos. Ocurren cambios profundos en la velocidad de ciertas reacciones metabólicas. La fotosíntesis decrece un poco antes que se inicie la senescencia y la destrucción de la clorofila, no ocurre sino hasta mucho más tarde; probablemente esto se debe a la reducción en la demanda de productos fotosintetizados que controlan la tasa de la fotosíntesis hasta cierto punto. Pero, conforme empieza la senescencia y decrecen las proteínas y la clorofila, ocurre una mayor declinación de la fotosíntesis. Poco después se advierte un clímax respiratorio. El nitrógeno soluble aumenta brevemente al producirse el rompimiento de las proteínas, pero estos compuestos se transportan a otro lado rápidamente. Cuando ocurre la muerte se han salvado muchos de los valiosos nutrientes de las hojas transportándose a las partes de la planta aún en crecimiento.

Figura 5. Cambios durante la senescencia en las hojas



Fuente: Bidwell, R.G.S. **Fisiología Vegetal**

2.4 Clorofila

Clorofila es un término general que se aplica a varios tipos de pigmentos verdes, estrechamente relacionados entre sí, que tienen en común la capacidad para absorber energía lumínica y pasarla a otras moléculas en forma de energía química.

La clorofila se encuentra contenida en los cloroplastos, en la célula viviente, ésta y algunos pigmentos asociados ocurren en conjunción con proteínas, pero al ser extraídos de células muertas pueden no contener proteínas. Por lo común, existe en dos formas que presentan ligeras diferencias, llamadas clorofila a y clorofila b. La fórmula para la clorofila a de extracción difiere de la clorofila b porque esta tiene un átomo más de oxígeno y dos menos de hidrógeno. Hay aún otras variantes de la clorofila que se presentan en algunas algas y bacterias.

La clorofila esencial en toda la fotosíntesis de las plantas verdes es la clorofila a, por lo cual está presente en todas las plantas fotosintéticas. Esta clorofila recibe energía lumínica, tanto en forma directa como por transferencia de otras clorofilas y pigmentos accesorios. La clorofila b está presente en la mayoría de las plantas verdes, en las algas verde-azul, en su lugar hay ficocianina, en las algas pardas fucoxantina y en las algas rojas ficoeritrina.

El núcleo de la molécula de clorofila está constituido por un átomo de magnesio rodeado de cuatro átomos de nitrógeno, a los cuales se fijan anillos y cadenas de carbono, hidrógeno y oxígeno. Una forma más compleja, pero más útil y precisa desde el punto de vista químico para considerar la estructura de la clorofila es comenzar con un pirrol, el cual es un anillo con cuatro átomos de carbono y uno de nitrógeno. La unión de cuatro pirroles ligados químicamente entre sí forma un tetrapirrol; cuando un tetrapirrol por sí mismo forma un anillo cerrado, la sustancia es una porfirina. Una metalporfirina tiene en su centro un átomo metálico. La clorofila es una metalporfirina que contiene magnesio.

En la formación de la clorofila también se emplea hierro, en una forma que a la fecha no se conoce bien, pero este metal no está presente en la clorofila misma. De acuerdo con una especulación filogenética reciente, las primeras metalporfirinas de importancia fueron porfirinas de hierro activas en la respiración anaeróbica y la primera porfirina de magnesio fue resultado de un accidente metabólico antiguo. Se aplica el término clorofilida a una clorofila a la que le falta el grupo fitil. Cuando le falta el átomo de Mg a veces se llama una clorofilina.

Las clorofilas son verdes debido a que absorben la luz de manera principal hacia los dos extremos del espectro visible, transmitiendo o reflejando

la mayor parte de la misma que tiene longitudes de onda intermedias. Absorben la mayor parte de la luz roja y azul y transmiten o reflejan la mayor parte de la luz azul-verde, verde y amarilla a que se les exponga. Los diversos tipos de clorofila que se encuentran en plantas distintas a las bacterias difieren muy poco en su espectro de absorción. Por otra parte, la mayoría de las clorofilas bacterianas, difieren en forma marcada de las no bacterianas en que el pico de absorción cercano al extremo rojo del espectro es desplazado hacia el infrarrojo.

La clorofila siempre va acompañada por uno o más pigmentos asociados que no son verdes. En las plantas superiores, por lo general se encuentran asociados con la clorofila dos pigmentos amarillos, el caroteno y la xantofila, pero su presencia es encubierta por la clorofila, que es más abundante. Caroteno es el nombre de varios compuestos que tienen una relación estrecha entre sí, teniendo todos la fórmula $C_{40}H_{56}$, pero difieren ligeramente en la disposición de los átomos en la molécula. Las xantofilas difieren de los carotenos en que tienen uno o más átomos de oxígeno en su molécula. El caroteno, la xantofila y otros pigmentos, en su mayoría colores que van del amarillo al rojo o tirando al pardo, tienen ciertas características estructurales y químicas en común, se denominan pigmentos carotenoides. Algunas veces estos pigmentos ocurren sin clorofila y dan coloración a muchos cromoplastos.

La clorofilina es un compuesto que se obtiene de la clorofila. En contraste con la clorofila, la clorofilina es soluble en agua y tiene las mismas propiedades que ella. La clorofila y la clorofilina se pueden encontrar como suplementos nutricionales, tanto en comprimidos como en líquidos.

2.4.1 Acciones de la clorofila en el ser humano

La clorofila, además de aportar energía vital 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, y ayuda a equilibrar nuestro metabolismo.

La clorofila es un suplemento alimenticio que tiene una gran 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, debido a que posee acción antioxidante.

Nutre y fortalece los sistemas circulatorios e intestinal. La clorofilina disminuye de forma significativa el colesterol y triglicéridos séricos en estudios preliminares en animales. 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.

Es efectiva en la reducción del olor urinario y fecal; en algunas circunstancias puede ayudar a aliviar el estreñimiento. Puede ser beneficioso en el tratamiento de piedras de oxalato cálcico y pueden tener actividad antiaterogénica.

2.5 Cromatografía líquida de alta resolución

La Cromatografía líquida de alta resolución o High performance liquid chromatography (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

En la HPLC isocrática, el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) a través del bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto de ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa, característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna, mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

Una mejora, introducida a la técnica de HPLC descrita, es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa, puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo, los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas por tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.

2.5.1 Cromatografía de fase reversa

La HPLC de fase reversa (RP-HPLC) consiste en una fase inmóvil apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la silica tratada con un alquilo. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se le denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la

unión del compuesto, a la fase estacionaria, es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente.

Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales, puesto que la superficie total se ve reducida.

A parte de la hidrofobicidad de la fase móvil, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH puesto que, puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón como el fosfato de sodio por controlar el valor del pH. Estos

tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquier resto de silica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

Las columnas de fase reversa se echan a perder con menor facilidad que las columnas de silica normales. Aun así, muchas columnas de fase reversa están formadas por silica modificada con cadenas alquil y no se deben utilizar nunca con bases en medio acuoso puesto que, éstas podrían dañar el esqueleto de silica subyacente. Las columnas se pueden utilizar en ácidos en medio acuoso, pero no deberían estar expuestas demasiado tiempo al ácido porque puede corroer las partes metálicas del aparato de HPLC.

2.5.2 Parámetros

2.5.2.1 Diámetro interno

El diámetro interno de una columna de HPLC es un aspecto crítico que determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna y también influye en su sensibilidad. Las columnas de diámetro interno más grande (>10mm) se utilizan normalmente en la purificación de compuestos para su utilización posterior. En cambio, las columnas de diámetro interno menor (4-5mm) se utilizan en el análisis cuantitativo de las muestras, y se caracterizan por el aumento de la sensibilidad y la minimización del consumo de disolventes que conllevan. Estas columnas suelen denominarse columnas de rango analítico y normalmente están asociadas a un detector UV-VIS. Aparte, existen otros tipos de columnas, como las de tipo capilar, con un diámetro inferior a 0.3 mm, utilizadas principalmente en espectrometría de masas.

2.5.2.2 Medida de las partículas

La mayoría de HPLC tradicionales se realiza con una fase estacionaria unida al exterior de partículas esféricas de sílica. Estas partículas pueden tener diferentes medidas, siendo las de 5 μm de diámetro las más utilizadas. Partículas más pequeñas ofrecen una mayor superficie y una mejor separación, pero la presión que se requiere para obtener una velocidad lineal óptima, aumenta de forma inversamente proporcional al cubo del diámetro de la partícula. Esto significa que disminuir la medida de las partículas a la mitad, aumentaría la resolución de la columna, pero a la vez, aumentaría la presión necesaria en un factor de ocho.

2.5.2.3 Tamaño de poro

Muchas fases estacionarias son porosas para proporcionar una mayor superficie. Los poros pequeños proporcionan una mayor superficie mientras que los poros de mayor medida proporcionan una mejor cinética, especialmente para los compuestos de tamaño más grande; por ejemplo, una proteína que sea ligeramente más pequeña que el tamaño de los poros puede entrar, pero difícilmente saldrá con facilidad.

2.5.2.4 Presión de la bomba

La presión de las bombas es variable según el modelo y fabricante, pero su rendimiento se mide en su habilidad para generar un flujo constante y reproducible. La presión puede lograr valores hasta de 40 MPa (o unas 400 atmósferas). Los aparatos más modernos de HPLC incorporan mejoras para poder trabajar a presiones más altas y, por lo tanto, poder utilizar partículas de

tamaño más pequeño en las columnas (< 2 micrometros). Estos nuevos aparatos, denominados Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) pueden trabajar con valores hasta de 100 MPa de presión (unas 1000 atmósferas).

2.6 Espectrofotometría de absorción

Esta técnica mide la intensidad de absorción de la radiación electromagnética de una sustancia, a diversas longitudes de onda. Hay tres regiones del espectro que se utilizan para estas mediciones, a saber, la ultravioleta (80 a 400nm) y la visible (400 a 800nm), así como la del infrarrojo (2.5 a 15 μ). En la región del infrarrojo, la magnitud de la energía de radiación sólo iniciaría vibraciones dentro de la molécula, pero el nivel energético de las regiones visible y ultravioleta es tan elevado, que también se pueden provocar transiciones electrónicas. Esta técnica comunica información muy específica respecto a la estructura y la identificación de moléculas complejas. Las determinaciones cuantitativas en el infrarrojo son menos apropiadas que en las regiones ultravioleta y visible.

Entre las principales aplicaciones están la determinación de la cantidad de concentración de una solución de algún compuesto, determinación de estructuras moleculares e identificación de unidades estructurales específicas ya que éstas tienen distintos tipos de absorbancia (grupos funcionales o isomerías).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Variables

3.1.1. Variable dependiente

Rendimiento de metabolitos de *Spinacea oleracea*

3.1.2 Variables independientes

Presión del CO₂: 1200, 1350 y 1500 psi

Tamaño de partícula de espinaca seca: entre tamiz 6 - 14 y 14 – 22

3.1.3 Variable de respuesta

La variable de respuesta para cada tratamiento será la cuantificación de grupos de metabolitos y metabolitos totales por extracto obtenido, en función de la presión y tamaño de partícula en duplicado.

3.2 Recursos humanos disponibles

Asesor: Ing. Qco. Benjamín Piedrasanta

Co-asesor: Lic. Eduardo Robles

Investigador: Livia Johana Alvarez González

3.3 Recursos materiales disponibles

- Especie vegetal a utilizar: *Spinacia oleracea*
- Equipo de extracción supercrítica a nivel laboratorio, con válvulas tipo aguja, mesh de celda malla No. 100 y volumen total de celda de extracción de 137cm³
- Molino
- 3 Tamices: mesh 6 (0.132plg), mesh 14 (0.0555plg), mesh 22 (0.0310plg)
- Embudo
- Probeta de 50ml
- Beacker de 50ml y de 250ml
- 3 earlenmeyer de 250ml con tapón
- Celdas del espectro
- Etanol al 95% de pureza
- Espectrofotómetro UV / Visible Varian, Modelo CARY 50BIO

- Cromatógrafo HPLC Shimadzu, UV visible, Modelo SPD 20AV. Bomba LC-20AT. Column oven CTD-20A. Columna RP-18

3.4 Técnica cualitativa o cuantitativa

3.4.1 Diseño de tratamiento

Para la obtención y determinación de la concentración de metabolitos se utilizó la hoja seca de espinaca y CO₂ en condiciones supercríticas. De esta extracción se obtuvieron seis tratamientos con dos repeticiones cada uno, dando como resultado doce datos.

3.4.2 Diseño experimental

Se utilizó un diseño controlado, en el cual se aplicó un experimento factorial, con dos factores de efecto fijo, por lo que cada tratamiento se seleccionó específicamente para realizarse en el laboratorio. Con el valor obtenido, por HPLC de cada repetición de la variable de respuesta, se realizó el análisis de varianza.

3.5 Recolección y ordenamiento de la información

3.5.1 Manejo del experimento

Las hojas frescas de *Spinacia oleracea* se obtuvieron de un mercado local, luego fueron secadas, todas las hojas, en un secador por convección para cada tratamiento, hasta una humedad constante uniforme. Este material fue reducido de tamaño por medio de un molino de discos y luego fueron pesadas las cantidades que se requerían para cada tratamiento. El extracto obtenido en

cada tratamiento se almacenó en frascos color ambar, limpios y herméticamente sellados con el fin de evitar contacto directo con la luz.

Se determinó la presencia de metabolitos por medio de barrido en un espectrofotómetro UV visible, el cual debía ser distinto al barrido de una muestra de etanol al 95%, para indicar la presencia positiva de metabolitos. Este barrido se comparó con el barrido teórico de clorofila, determinando la probabilidad de presencia de este metabolito en las muestras obtenidas. Por último, se analizó cada tratamiento en el equipo de HPLC para determinar la cantidad de grupos de metabolitos y metabolitos totales obtenidos en cada uno de los tratamientos.

3.5.2 Descripción del procedimiento

- a. En la celda de extracción se colocó la muestra de material vegetal molido y tamizado y se agregó 25ml de co solvente (etanol al 95%).
- b. Se cargó el CO₂ a la presión de trabajo (por encima de la presión crítica) hacia la celda de extracción
- c. Se calentó la celda a la temperatura de trabajo, 40°C.
- d. El CO₂ en condiciones supercríticas atravesó la celda de modo transversal disolviendo los componentes requeridos.
- e. Se dejó el sistema cerrado por treinta minutos, para que el CO₂ y la muestra vegetal alcanzaran el equilibrio y se diera mayor transferencia de masa.

- f. Se descomprimió el sistema para que saliera el CO₂ y etanol con los compuestos disueltos produciendo un descenso en su densidad por medio de descenso de la presión y temperatura.
- g. Se recuperó el material extraído en un earlenmeyer, evaporándose instantáneamente el CO₂ gaseoso y se tapó automáticamente el recipiente para evitar pérdidas por evaporación.
- h. Una pequeña fracción del extracto obtenido se introdujo en un espectrofotómetro para determinar la presencia de metabolitos en el extracto obtenido.
- i. Al encontrar positiva la presencia de metabolitos en el extracto, se procedió a inyectar una muestra del extracto en el HPLC para cuantificar los metabolitos presentes.
- j. Este procedimiento se repitió para los seis tratamientos, con tres presiones distintas y dos tamaños de partícula.

3.5.3 Análisis en espectrofotómetro UV visible

Se utilizó un mililitro de extracto para el análisis. Obteniendo una lectura completa por cada extracto, así como un gráfico de lectura comparativo por presión trabajada y una lectura comparativa total de todos los extractos.

3.5.4 Análisis en HPLC

Se utilizó una columna de 25cm RP18 y en la fase móvil para la separación se utilizó una mezcla de metanol-agua 70/30, obteniéndose un cromatograma para cada extracto obtenido.

3.6 Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

Cada unidad de tratamiento se distribuyó de la siguiente manera:

30g hoja seca de espinaca / Temperatura: 41°C		Presión (PSI)								
		1200			1350			1500		
Partícula entre tamices	6 y 14									
	14 y 22									

De los extractos obtenidos de cada unidad de tratamiento se obtuvo:

- Barrido espectral traslapado de ambos tamaños de partículas del extracto de espinaca extraído con CO₂ a las tres distintas presiones, para determinar la presencia de metabolitos en los extractos obtenidos.
- Cuantificación de metabolitos por HPLC presentes en cada extracto en función del área por pico detectado y cuantificación de metabolitos totales por HPLC presentes en cada extracto en función del área total.
- Análisis de varianza de dos factores con una muestra por grupo, para determinar si existe diferencia significativa en la cantidad de metabolitos presentes en los extractos obtenidos.

3.7 Análisis estadístico

A la cantidad presente de metabolitos de las tres presiones y los dos tamaños de partículas, se les realizó un análisis de varianza, y prueba de medias con el objeto de determinar si existe diferencia significativa entre el rendimiento que se obtuvo en cada uno de los tratamientos utilizados.

3.7.1 Modelo Estadístico

El modelo es el siguiente:

$$Z_{(i,j)} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{i,j,k}$$

Donde:

$Z_{(ij)}$ = variable respuesta de la i, j –ésima unidad muestreada experimental.

μ = Efecto de la media general.

τ_i = Efecto del i-ésimo presión de extracción.

β_j = Efecto del j-ésimo tamaño de partícula.

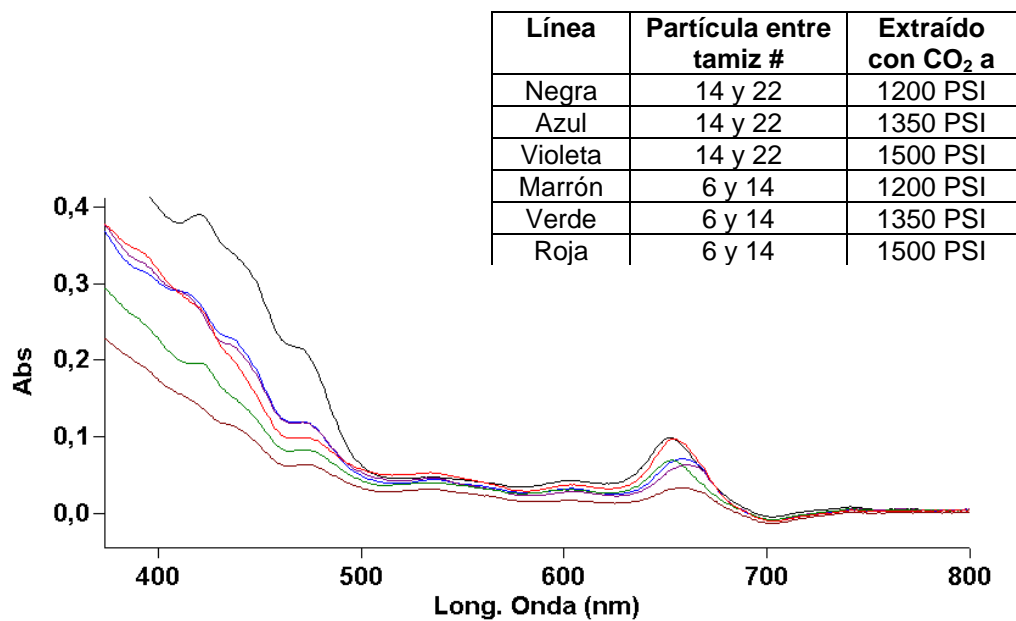
$\tau\beta_{ij}$ = Efecto de la interacción presión-tamaño de partícula.

$\varepsilon_{i,j,k}$ = Efecto del error experimental.

4. RESULTADOS

4.1 Absorción vs. Longitud de onda

Figura 6. Barrido espectral traslapado de ambos tamaños de partícula de extracto de espinaca extraído con CO₂ a las tres distintas presiones, ampliado de 400 a 800 nm



4.2 Extractos en HPLC

Tabla III. Resumen de cuantificación de metabolitos por HPLC presentes en cada extracto en función del área por pico detectado

Detección de metabolitos en función del área							
Temperatura:		Presión (PSI)					
41°C		1200		1350		1500	
Partícula entre tamices:	6 y 14	<i>Tiempo</i>	<i>Área</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Área</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Área</i>
		1.439	9935467	1.462	7978164	1.455	7698889
		1.575	4542928	1.563	5280857	1.555	4851111
		1.688	15147116	1.71	7725109	1.712	15790454
			1.806	10954839			
	14 y 22	1.566	20937640	1.58	11710604	1.533	23960231
		1.687	15281799	1.696	8302337	1.697	11135108
		1.804	19221283	1.803	11527863	1.793	15656337

Tabla IV. Resumen de cuantificación de metabolitos totales por HPLC presentes en cada extracto en función del área total

Detección de metabolitos totales en función del área				
Temperatura: 41°C		Presión (PSI)		
		1200	1350	1500
Partícula entre tamices:	6 y 14	5.5621	3.1592	5.0937
	14 y 22	2.9625	3.1966	2.8468

4.3 Análisis de varianza

Tabla V. Análisis de varianza de dos factores con una muestra por grupo

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	3	13.815	4.605	1.62260287
Fila 2	3	9.0059	3.001966667	0.03175822
Columna 1	2	8.5246	4.2623	3.37896008
Columna 2	2	6.3558	3.1779	0.00069938
Columna 3	2	7.9405	3.97025	2.52427981

Tabla VI. Resultado análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	3.8545738	1	3.854573802	3.76172417	0.191989058	18.5128205
Columnas	1.25935672	2	0.629678362	0.61451056	0.619382755	19
Error	2.04936546	2	1.024682732			
Total	7.16329599	5				

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los barridos espectrales muestran la absorción por longitud de onda, lo cual nos ayuda a determinar si existen o no metabolitos presentes en cada extracto obtenido, utilizando CO₂ supercrítico a una temperatura constante de 41°C. De los barridos obtenidos (figura 6), puede determinarse entonces que en todos los casos se obtuvo una serie de metabolitos, siendo el común denominador una alta concentración de metabolitos en el área no visible, es decir, abajo de 400nm, seguido de un grupo de metabolitos en la longitud de onda entre 400 y 500nm y otro entre 640 y 680nm.

La concentración de metabolitos, en los dos últimos rangos puede indicar la presencia de clorofila en los extractos al comparar el espectro contra el barrido teórico de clorofila (figura 50), sin embargo, su comprobación científica exacta va más allá del alcance de este estudio.

La extracción por tamaño de partícula y presión del solvente se realizó en duplicado, obteniendo barridos espectrales individuales con diferencias de absorción por metabolitos despreciables. Es decir, la reproducibilidad del equipo de extracción es muy alta, de modo que el equipo espectrofotométrico utilizado no logra detectar mayor diferencia. Debido a esta alta reproducibilidad, los cromatogramas para cada condición fueron obtenidos únicamente para uno de los extractos.

Los cromatogramas obtenidos con el equipo de cromatografía líquida de alta resolución muestran la concentración de metabolitos obtenida en función

del área registrada, a mayor área mayor concentración obtenida. En estos puede notarse que el equipo de cromatografía utilizado detecta tres principales metabolitos en común en todos los casos (tabla III), con un único caso particular de 4 metabolitos en el extracto de partícula gruesa a presión de 1350 PSI. Puede observarse también que el tiempo de retención es muy similar en todos los casos, sin embargo la detección en los extractos obtenidos de partícula fina inicia 0.1 minutos después que en los extractos de partícula gruesa.

En base al área total obtenida por HPLC para cada extracto, puede decirse que la mayor concentración de metabolitos totales se obtuvo en la muestra con partícula fina, entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ supercrítico a 1200Psi, ya que el área total detectada para este extracto es de 55621352.

La segunda mayor concentración o área total se obtuvo a partir de la misma muestra de partícula fina extraída a una presión de CO₂ de 1500Psi, con un área total de 50837620. Para los extractos obtenidos con CO₂ a 1350Psi el área total es muy similar, 31592189 para partícula fina y 319660092 para partícula gruesa, la pequeña diferencia entre ambas se debe a la diferencia en la cantidad de picos leídos. La menor cantidad de concentración de metabolitos o área total se presentó para los extractos obtenidos a partir de la muestra con partícula gruesa, entre tamiz 6 y 14, con CO₂ a 1500Psi con área total de 28468839 y a 1200Psi con un área total de 29625512.

Al realizar el análisis de varianza a los resultados obtenidos de la cuantificación por HPLC (tabla V y VI), se observa que el valor estadístico de la F, en este caso el valor de la F por las filas (tamaño de la partícula), es de 3.7617. Para saber si estos resultados son significativos (el valor de la F observado necesita ser al menos 18.51 (o sea el valor crítico de la F)). Debido a

que el valor de F observado es de 3.78, mucho menor que el valor crítico de la F 18.51, los resultados de las muestras no son significativas. El valor de la F para las columnas (presión supercrítica) es igual a 0.6893, esto tampoco es significativo, porque el valor de F crítico es de 19. Es decir, no existe una relación significativa en el tamaño de la partícula, y la presión supercrítica.

Por último, cabe mencionar que para la obtención de los extractos fue necesario agregar 25ml de etanol a cada carga de celda debido a la falta de un condensador que reciba el extracto en el equipo, por lo que en las primeras pruebas no se obtuvo suficiente extracto para análisis ya que la mayor parte del mismo se evaporó junto al CO₂. Por esta razón, no fue posible determinar el rendimiento por diferencia de peso sino únicamente por cuantificación de cantidad de metabolitos por HPLC. Se eligió esta solución de etanol al 95% de pureza debido a sus características polares y a su baja toxicidad para el ser humano.

CONCLUSIONES

1. Es posible extraer metabolitos a partir de la espinaca utilizando CO₂ a 1200, 1350 y 1500 PSI, para un mismo tamaño de partícula sin diferencia significativa estadística en el rendimiento.
2. Es posible extraer metabolitos a partir de la espinaca con un tamaño de partícula entre tamiz 6 y 14 y 14 y 22, con una misma presión de CO₂ sin diferencia significativa estadística en el rendimiento.
3. La detección de un grupo de metabolitos en función de la longitud de onda menor a 400nm, espectro no visible, es común en todos los extractos obtenidos de espinaca con CO₂ en condiciones supercríticas.
4. La detección del metabolito específico, clorofila, en todos los extractos se da por los picos formados en el barrido espectral en los rangos de 400 a 500nm y 640 a 680nm, al compararlo con el barrido espectral teórico de este metabolito.
5. La detección de tres grupos de metabolitos, en función del tiempo detectado por el equipo HPLC, es común en todos los extractos obtenidos de espinaca con CO₂ en condiciones supercríticas.
6. Se acepta la hipótesis nula, que indica la no existencia de diferencia significativa en el rendimiento de metabolitos si se utilizan tres presiones supercríticas y dos tamaños de partículas.

RECOMENDACIONES

1. Debido al tamaño de celda y la falta de un condensador en el equipo, debe utilizarse un co-solvente en la extracción para lograr retener suficientes volumen de extracto para análisis posterior.
2. Se debe aumentar la capacidad del equipo a fin de obtener mayores volúmenes de extracto final.
3. Se deben mantener los extractos en frascos color ámbar y/o aplicar algún antioxidante para evitar la oxidación de los mismos, por efecto de la luz. Se recomienda refrigerarlos si no se utilizan de inmediato.
4. Ampliar el estudio para determinar todos los tipos de metabolitos presentes en el extracto, principalmente los presentes en el espectro no visible, quienes presentan mayor concentración en el mismo.
5. Se debe trabajar con tamaños de partícula de material vegetal a extraer de tamaño mínimo, equivalente a partículas entre tamiz 14 y 22, ya que con partículas menores el equipo diseñado no logra operar.
6. Al instalarse un condensador en el equipo, puede evaluarse el efecto del co-solvente en concentración de metabolitos por extracto, así como el rendimiento real de volumen del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

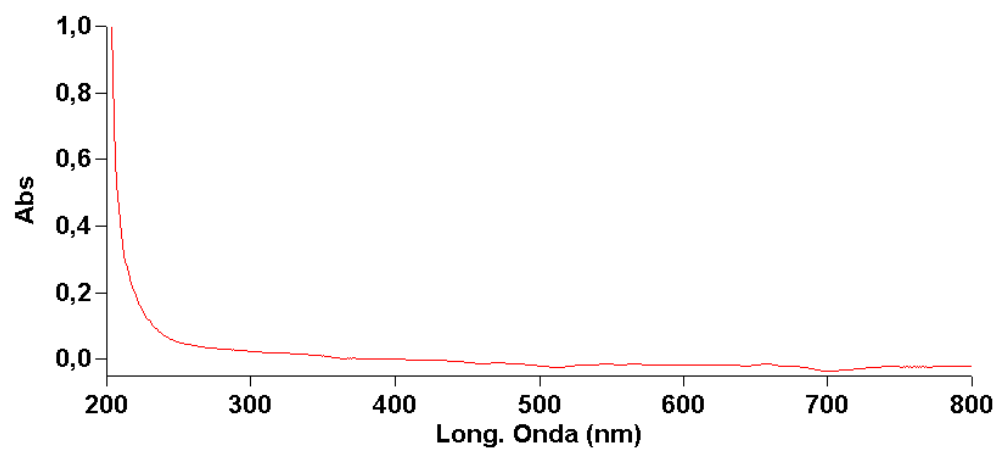
1. ABBOTT, David y ANDREWS, R.S. *Introducción a la cromatografía*. Primera edición. España: Editorial Alambra, 1970. 121pp.
2. ABRAHAM, Martín y AYDIN Sunol. *Supercritical Fluids*. Primera edición. Estados Unidos de América: ACS Symposium Series, 1997. 309pp.
3. BIDWELL, R.G.S. *Fisiología vegetal*. Primera edición. México, D.F.: A.G.T. editor, S.A., 1990. 784pp.
4. BRIGHT, Frank y MCNALLY, Mary Ellen. *Supercritical Fluid Technology*. Primera edición. Estados Unidos de America: ACS Symposium Series, 1992. 374pp.
5. CRONQUIST, Arthur. *Botánica Básica*. Primera edición. México, D.F.: Compañía Editorial Continental, S.A., 1987. 655pp.
6. FERNÁNDEZ, Diego y FERNÁNDEZ, Roberto. *Ciencia Hoy* [En línea]. Volumen 8 – N°43, Nov/Dic 1997. INQUIMAE. [Agosto 2007]. Disponible en web: <http://www.cienciahoy.org/hoy43/fluid3.htm>
7. ESAU, Katherine. *Anatomía vegetal*. Primera edición. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1959. 729pp.

8. Flucomp, 2003. [En línea]. [Agosto 2007]. Disponible en web:
<http://www.icmab.es/flucomp/fluidoscomprimidos.html>
9. GONZALEZ, Mario, SOTOLONGO, María, QUERT, Rolando *et al.* *Crema epitelizante de clorofila, carotenos y vitaminas aplicada en heridas abiertas experimentales*. Revista Cubana Medica Militar, [En línea]. Oct.-nov. 2001, vol.30, no.4, p.236-240. [Agosto 2007]. Disponible en web: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572001000400004&script=sci_arttext&tlng=es
10. KANG, Jit. *Supercritical Fluid Extraction of Natural Products*. [En línea]. [Agosto 2007]. Disponible en web:
<http://www.andrew.cmu.edu/user/jitkangl/SFE/Supercritical%20Fluid%20Extraction%20of%20Natural%20Product.htm>
11. KANG, Jit. *Supercritical Fluid Extraction*. [En línea]. [Agosto 2007]. Disponible en web:
<http://www.andrew.cmu.edu/user/jitkangl/SFE/National%20paper.pdf>
12. KENNEDY, John y NEVILLE, Adam. *Estadística para Ciencias e Ingeniería*. Segunda edición. México: Harper & Row Latinoamérica, 1982. 468pp.
13. ERDOGAN, Kiran y BRENNECKE, Joan. *Supercritical Fluid Engineering Science*. Primera edición. Estados Unidos de América: ACS Syposium Series, 1993.410pp.

14. LOAIZA SALGUERO, Edgar Saúl. *Extracción supercrítica con CO₂*. Guatemala, USAC, 1994. 75pp.
15. OROZCO, Rodolfo. Informe Final Proyecto FODECYT No. 49-2006 *Extracción supercrítica y cuantificación HPLC de Luteína y Beta Caroteno presentes en vegetales de consumo popular*. Guatemala: USAC, 2009. 68pp.
16. PERRY, Robert y CHILTON, Cecil. *Manual del Ingeniero Químico*, Volumen 1. Segunda edición. México: McGraw-Hill, 1982.
17. Sovereign Publications Limited, 2005. *FLAVEX Naturextrakte GmbH – A Pioneer in Supercritical Fluid Extraction*. [En línea]. [Agosto 2007]. Disponible en web: <http://www.foodtech-international.com/suppliers/flavex/flavex.htm>
18. Thermodynamics research laboratory, Department of chemical engineering, University of Illinois at Chicago, Estados Unidos. [En línea]. [Agosto 2007]. Disponible en web: <http://tigger.uic.edu/~mansoori/SCF.and.SFE.by.TRL.at.UIC.pdf>

APÉNDICE

Barrido Espectral completo muestra etanol con 95% de pureza



Informe Barrido completo muestra etanol con 95% de pureza

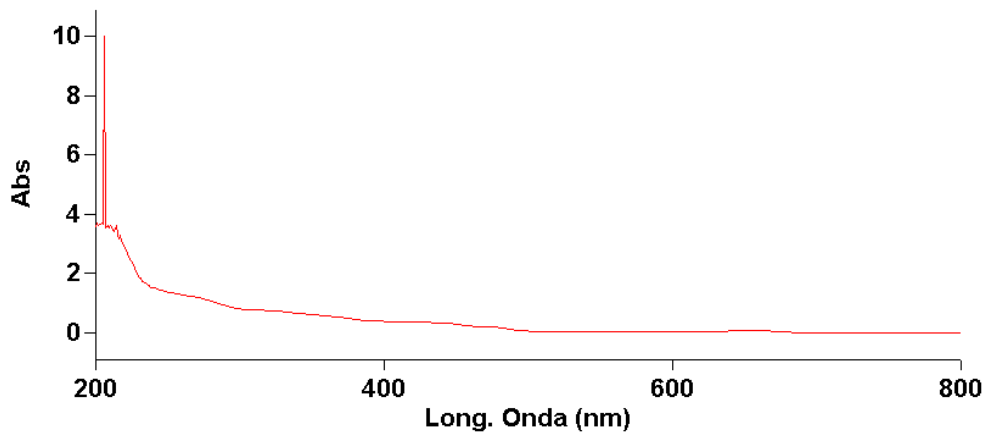
Long. Onda (nm)	Abs
-----------------	-----

657,0	-0,014
-------	--------

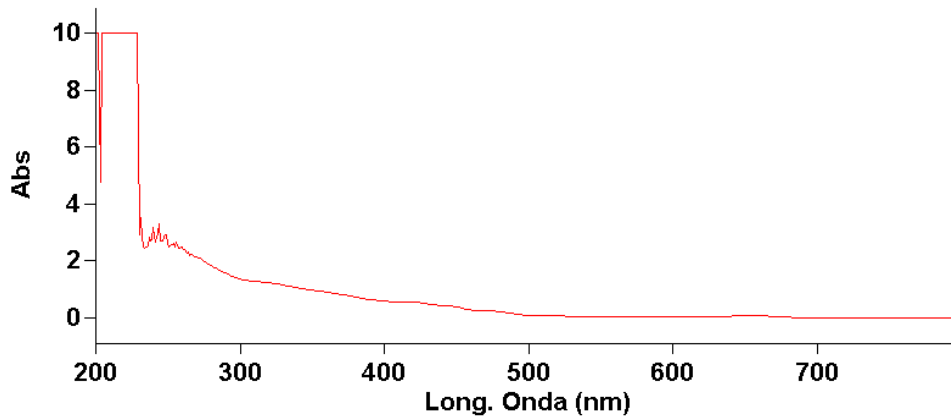
Absorción vs. Longitud onda

ANÁLISIS INDIVIDUAL

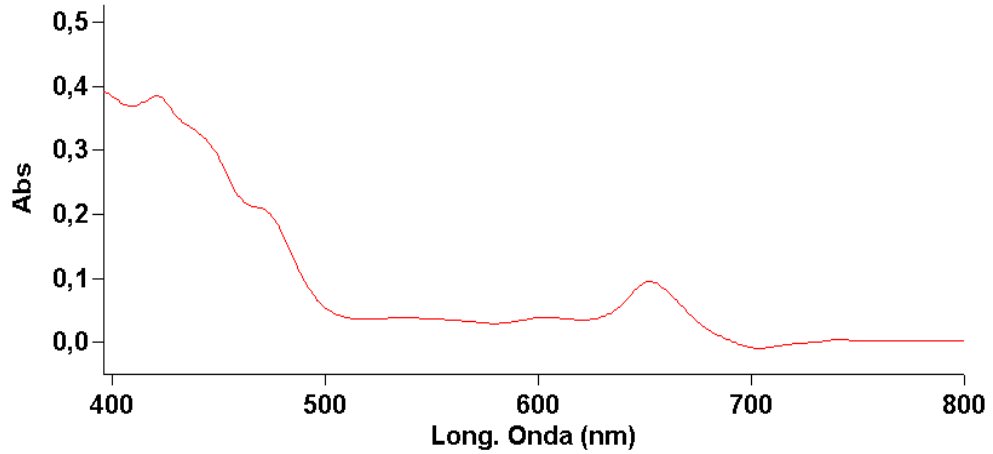
Barrido espectral completo del primer extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1200 PSI



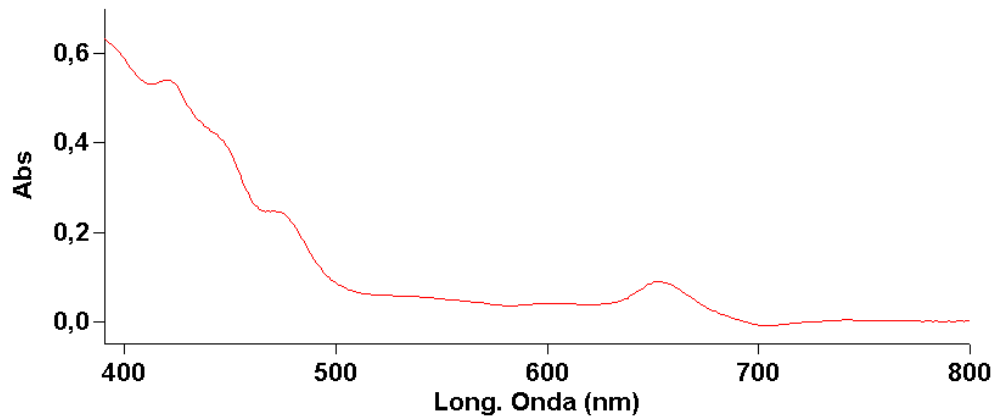
Barrido espectral completo del segundo extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1200 PSI



Barrido espectral ampliado del primer extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1200 PSI



Barrido espectral ampliado del segundo extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1200 PSI



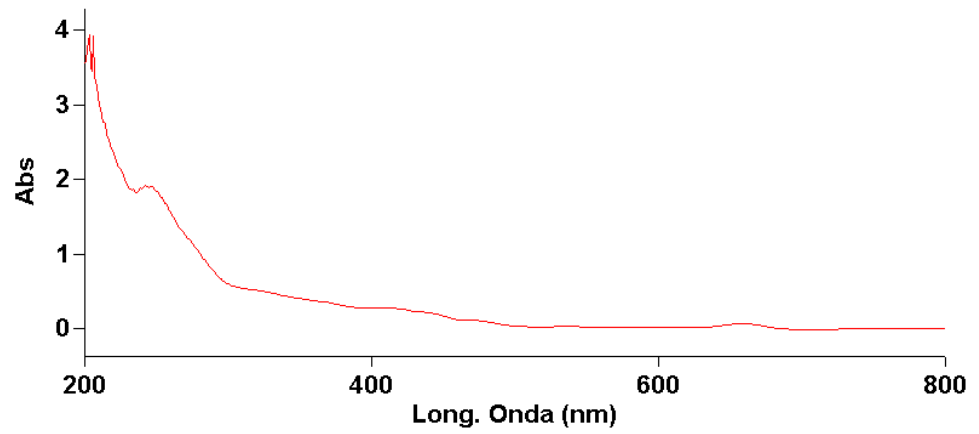
**Informe barrido espectral completo del primer extracto de espinaca,
partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1200 PSI**

Long. Onda (nm)	Abs
652,0	0,095
420,0	0,385
231,0	1,860
217,1	3,269
213,9	3,609
210,0	3,599
208,0	3,605
206,1	10,000
204,0	3,683

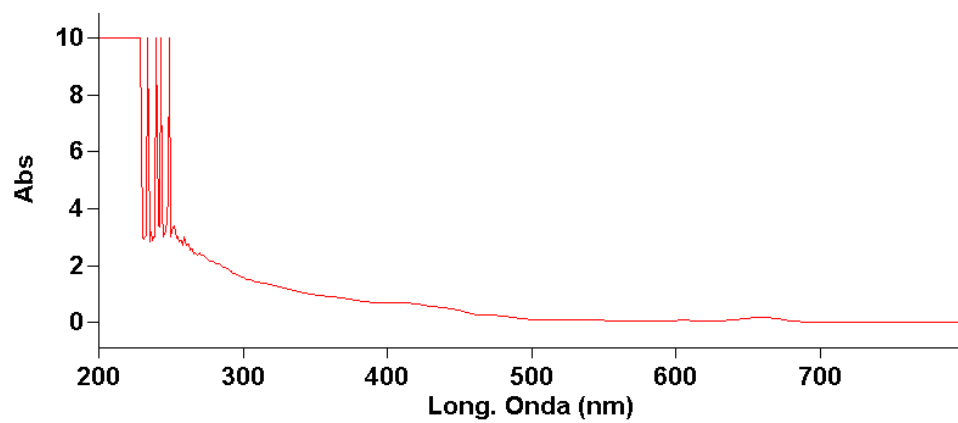
**Informe barrido espectral completo del segundo extracto de espinaca,
partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1200 PSI**

Long. Onda (nm)	Abs
652,9	0,089
276,1	1,985
266,9	2,218
259,1	2,492
254,0	2,627
249,0	2,929
240,1	3,156
231,0	3,499
229,1	10,000

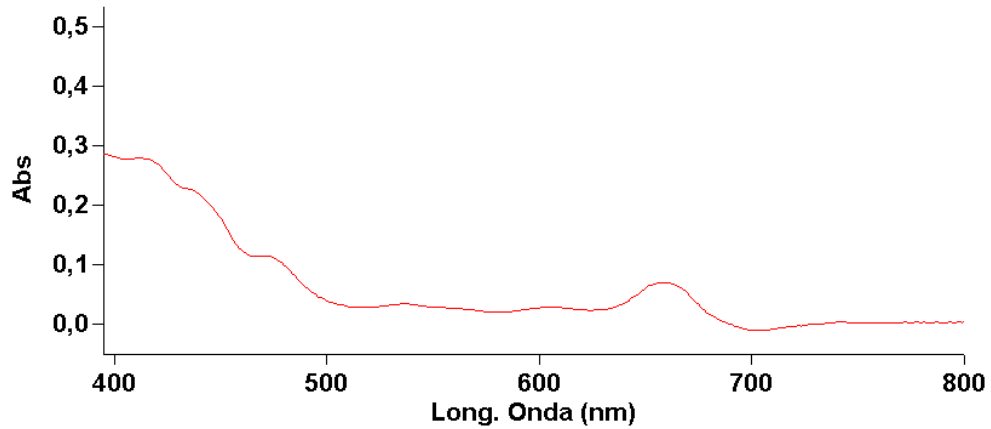
Barrido espectral completo del primer extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1350 PSI



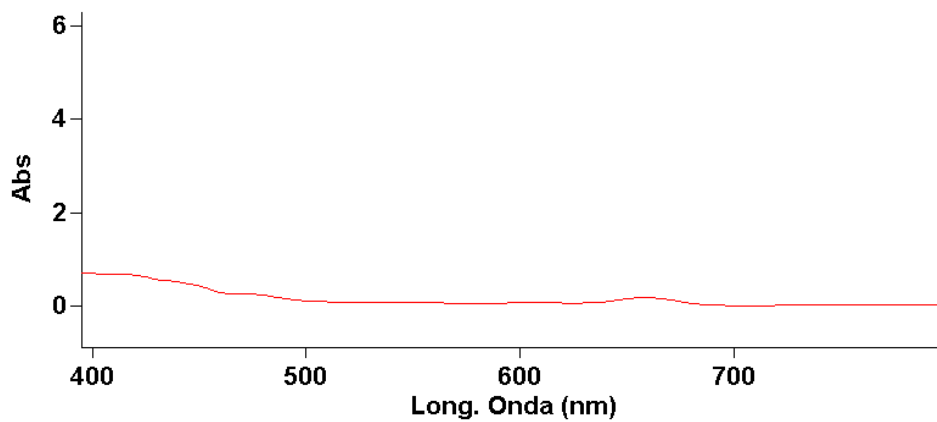
Barrido espectral completo del segundo extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1350 PSI



Barrido espectral ampliado del primer extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1350 PSI



Barrido espectral ampliado del segundo extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1350 PSI



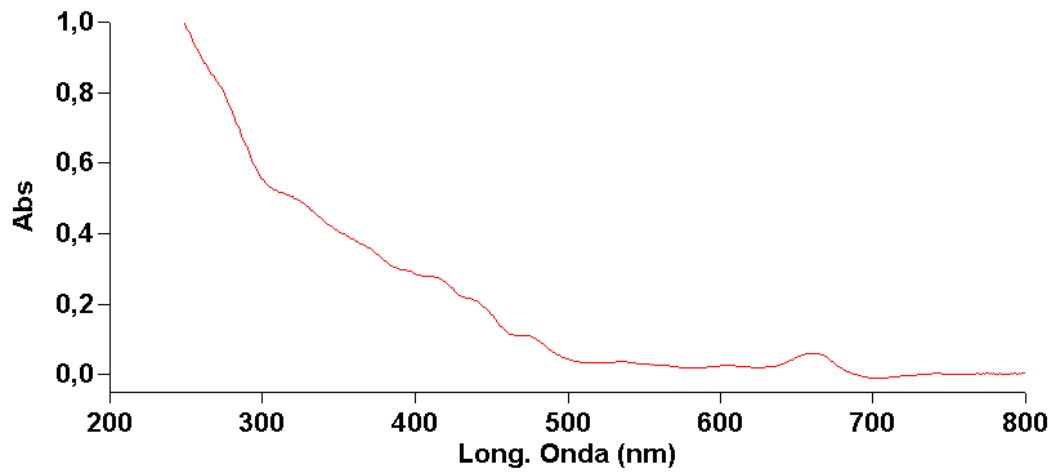
**Informe barrido espectral completo del primer extracto de espinaca,
partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1350 PSI**

Long. Onda (nm)	Abs
659,0	0,071
247,0	1,903
242,0	1,918
239,0	1,885
234,0	1,877
206,1	3,915
202,9	3,937

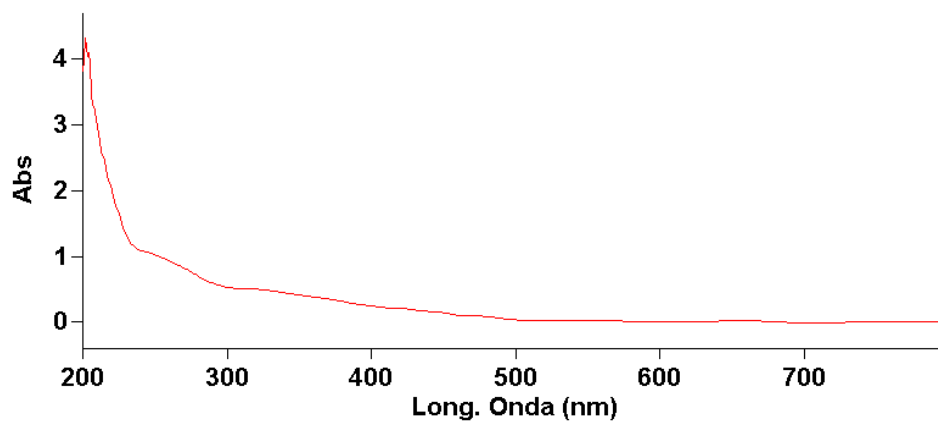
**Informe barrido espectral ampliado del segundo extracto de espinaca,
partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1350 PSI**

Long. Onda (nm)	Abs
658,9	0,079
606,0	0,076
269,9	2,464
265,1	2,575
259,1	3,021
255,0	3,012
252,0	3,380
249,0	10,000
240,1	10,000
236,0	3,164
233,9	10,000

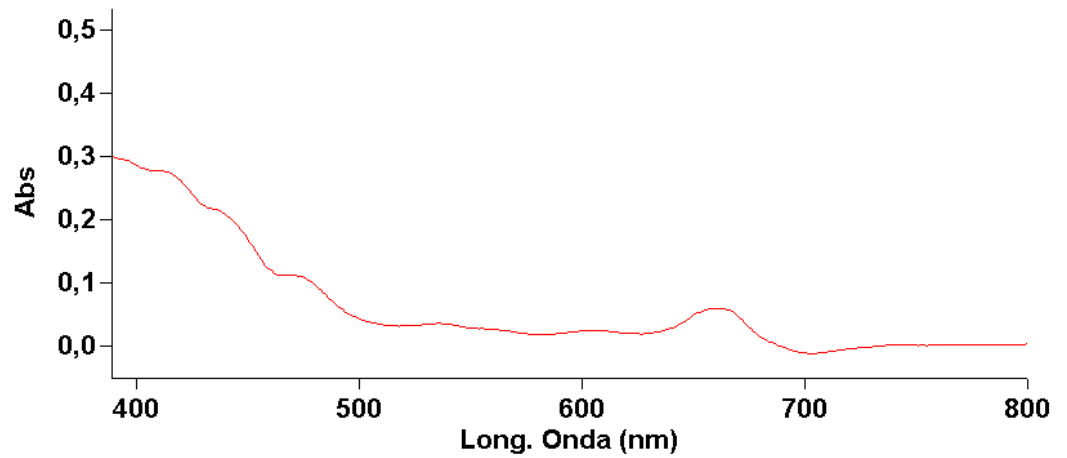
Barrido espectral completo del primer extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1500 PSI



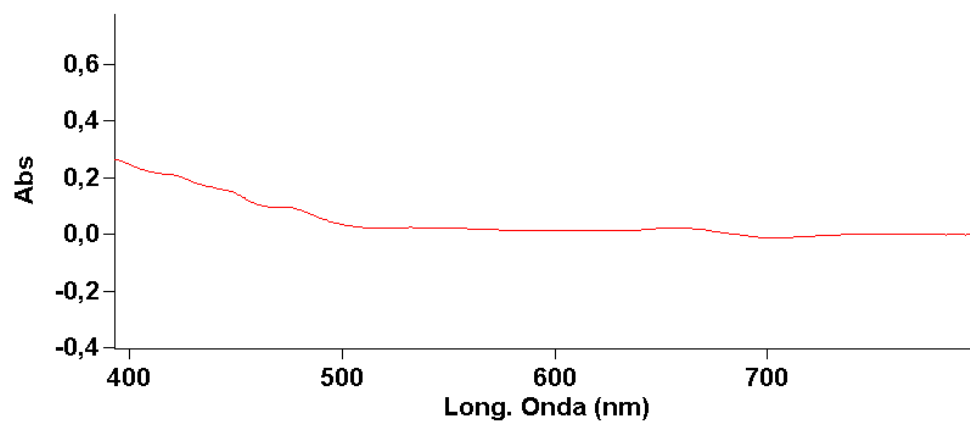
Barrido espectral completo del segundo extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1500 PSI



Barrido espectral ampliado del primer extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1500 PSI



Barrido espectral ampliado del segundo extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1500 PSI



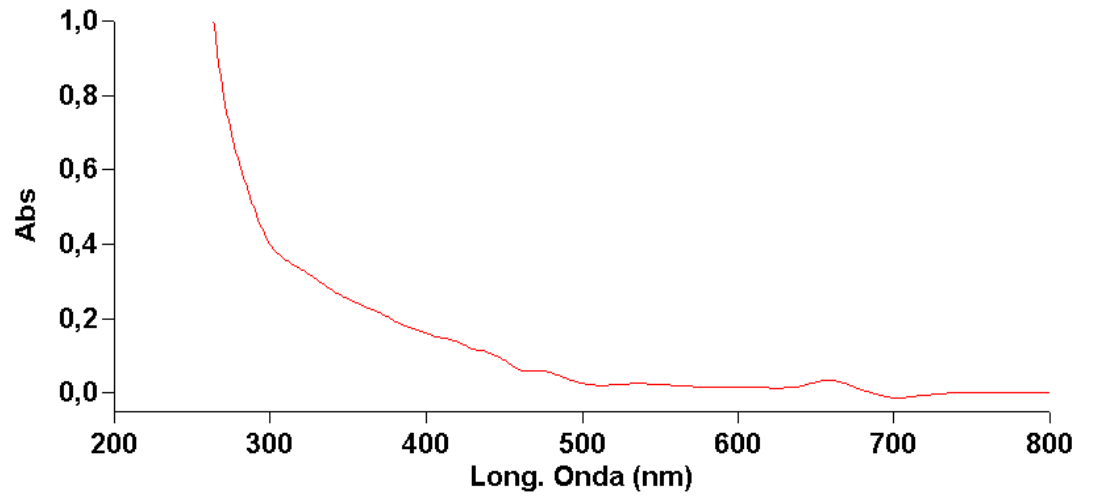
**Informe barrido espectral completo del primer extracto de espinaca,
partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1500 PSI**

Long. Onda (nm)	Abs
660,0	0,061
206,1	3,561
201,0	3,498

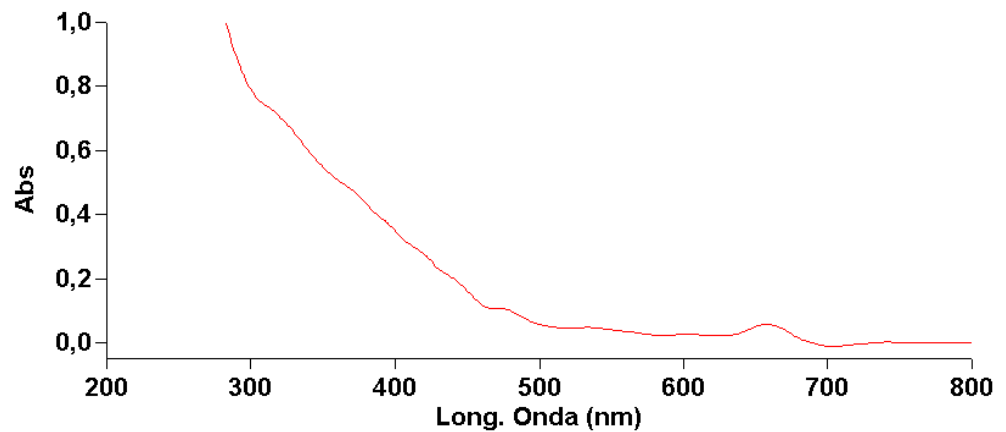
**Informe barrido espectral completo del segundo extracto de espinaca,
partícula entre tamiz 14 y 22, extraído con CO₂ a 1500 PSI**

Long. Onda (nm)	Abs
652,9	0,023
203,9	4,101
202,0	4,326

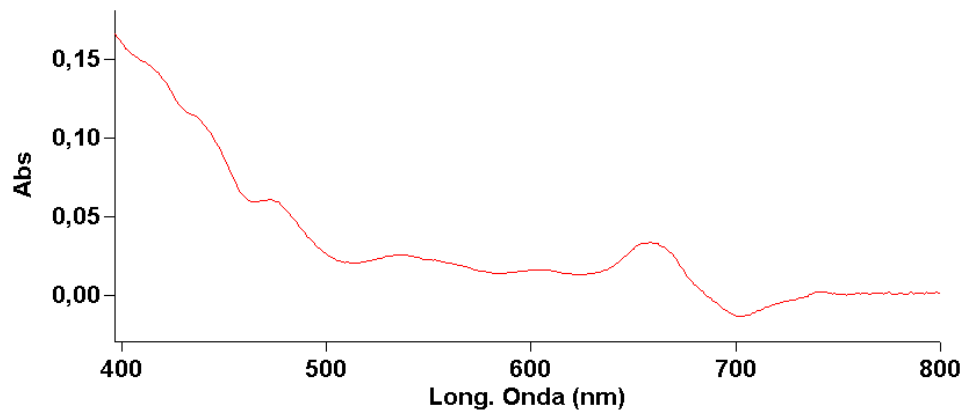
**Barrido espectral completo del primer extracto de espinaca, partícula
entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1200 PSI**



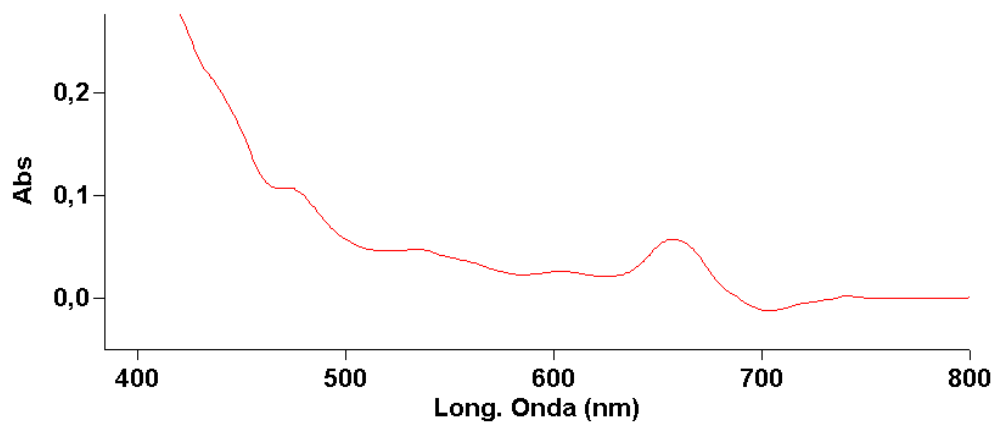
**Barrido espectral completo del segundo extracto de espinaca, partícula
entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1200 PSI**



Barrido espectral ampliado del primer extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1200 PSI



Barrido espectral ampliado del segundo extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1200 PSI



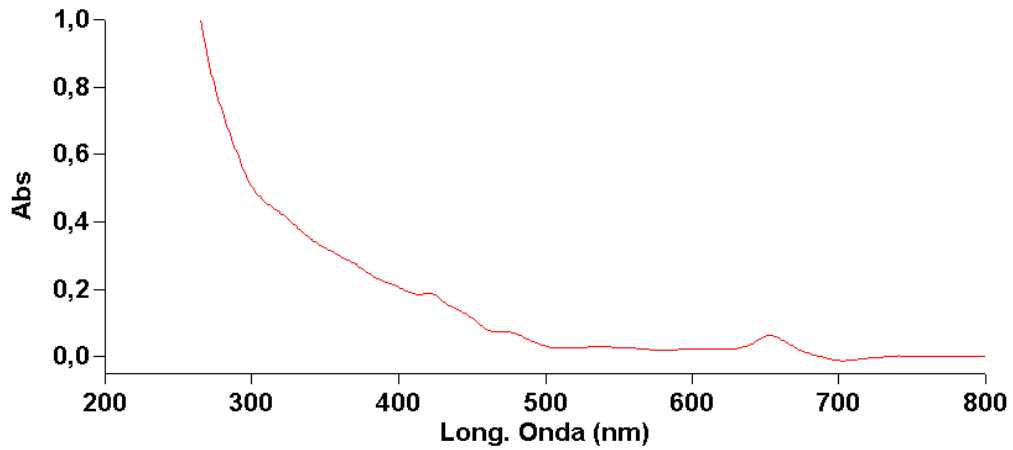
**Informe barrido espectral completo del primer extracto de espinaca,
partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1200 PSI**

Long. Onda (nm)	Abs
658,0	0,034
242,0	1,729
232,0	1,606

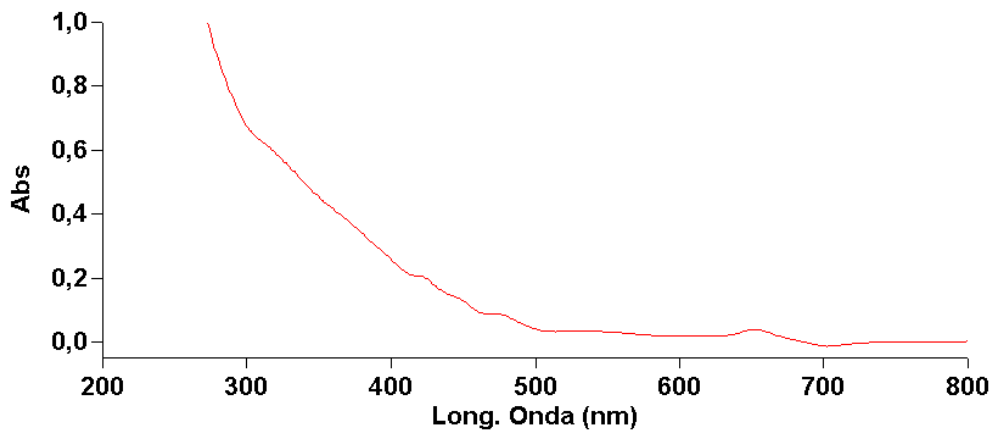
**Informe barrido espectral completo del segundo extracto de espinaca,
partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1200 PSI**

Long. Onda (nm)	Abs
657,0	0,057
243,0	1,889
235,0	1,910
218,1	3,113
214,9	10,000
210,1	4,826
207,1	10,000

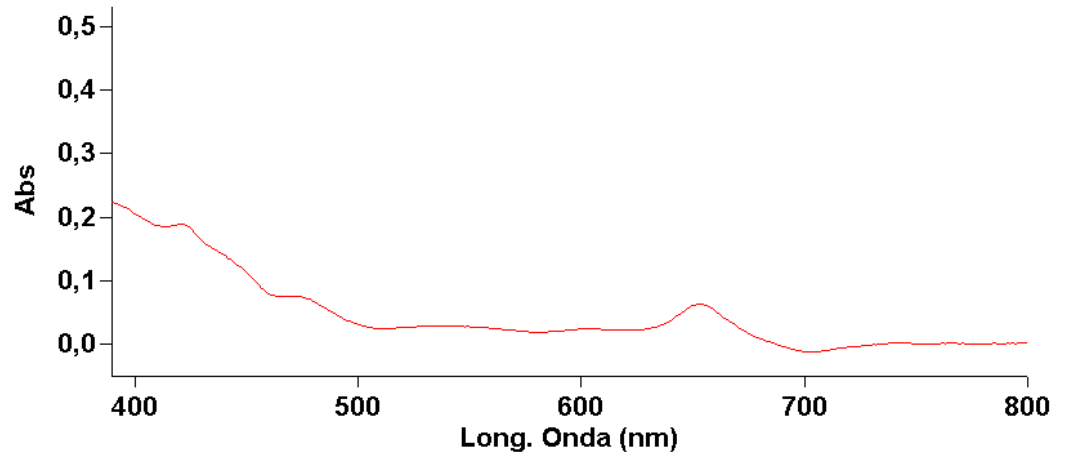
Barrido espectral completo del primer extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1350 PSI



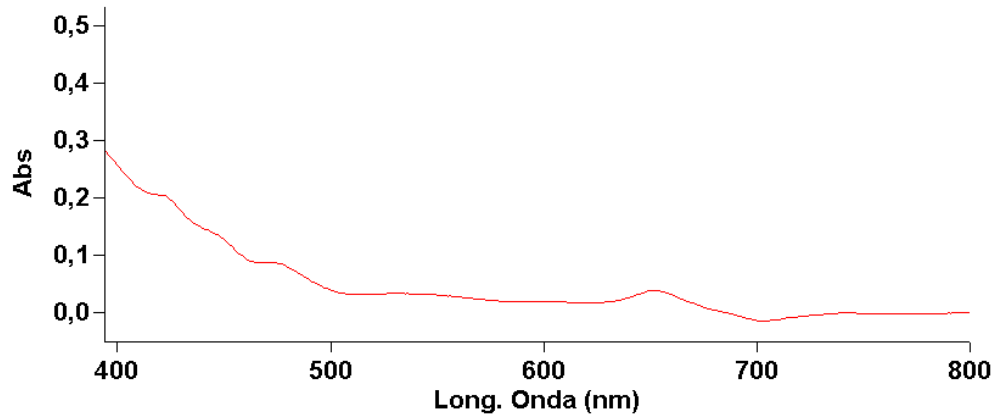
Barrido espectral completo del segundo extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1350 PSI



Barrido espectral ampliado del primer extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1350 PSI



Barrido espectral ampliado del segundo extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1350 PSI



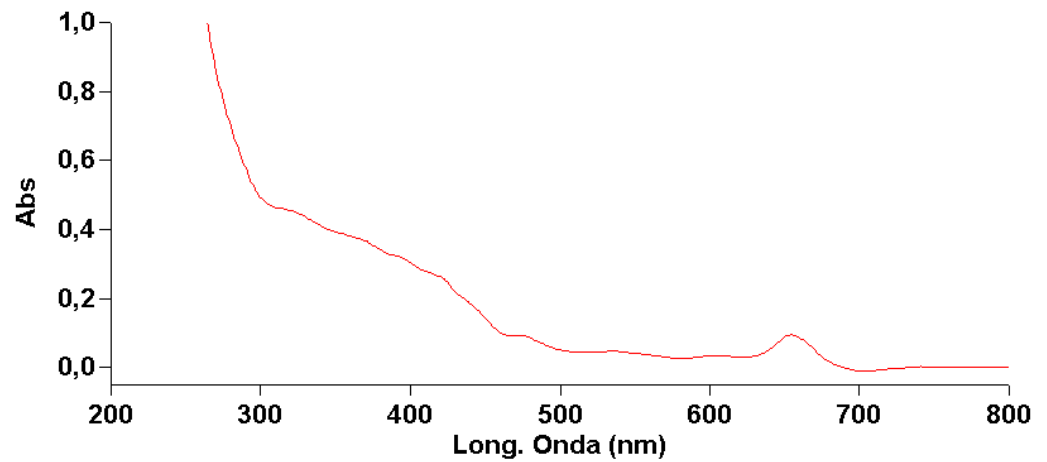
**Informe barrido espectral completo del primer extracto de espinaca,
partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1350 PSI**

Long. Onda (nm)	Abs
653,0	0,063
243,0	1,717
236,1	1,683
234,0	1,672

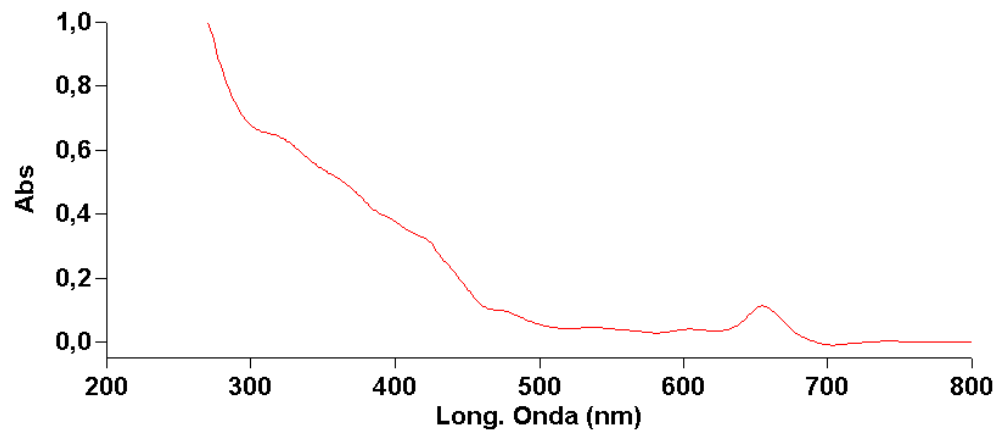
**Informe barrido espectral completo del segundo extracto de espinaca,
partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1350 PSI**

Long. Onda (nm)	Abs
651,0	0,039
241,0	1,566
236,0	1,597
214,9	2,880
205,0	10,000

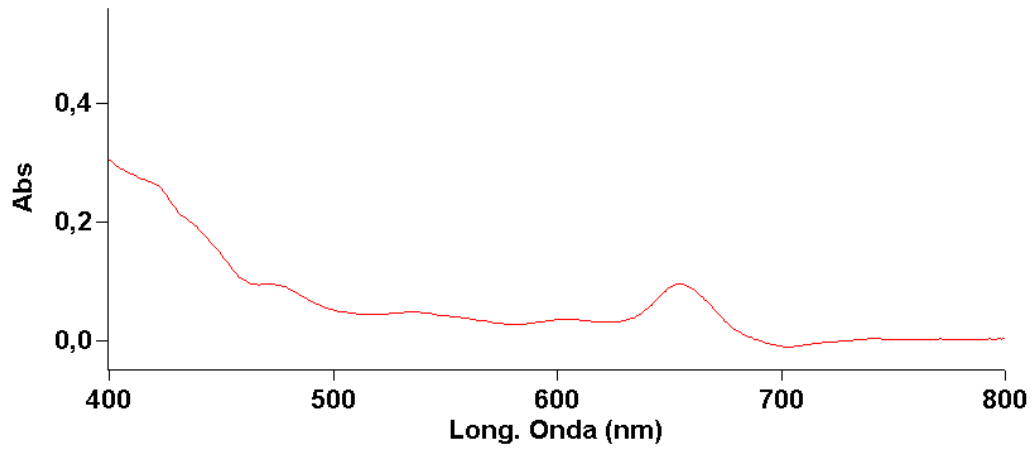
Barrido espectral completo del primer extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1500 PSI



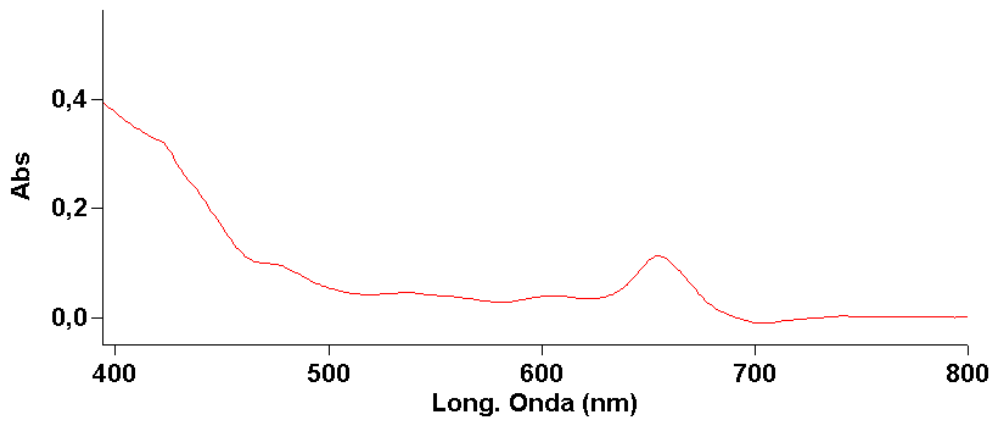
Barrido espectral completo del segundo extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1500 PSI



Barrido espectral ampliado del primer extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1500 PSI



Barrido espectral ampliado del segundo extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1500 PSI



**Informe barrido espectral completo del primer extracto de espinaca,
partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1500 PSI**

Long. Onda (nm)	Abs
654,1	0,095
243,0	1,665
236,1	1,633
231,0	1,642
206,1	3,597
201,0	4,053

**Informe barrido espectral completo del segundo extracto de espinaca,
partícula entre tamiz 6 y 14, extraído con CO₂ a 1500 PSI**

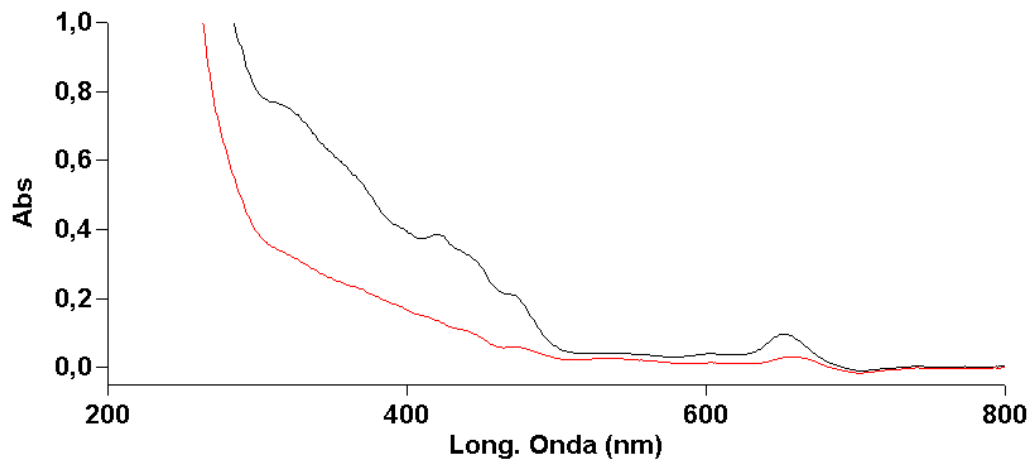
Long. Onda (nm)	Abs
655,0	0,112
214,9	3,106
209,0	4,024
206,0	4,797

BARRIDO ESPECTRAL COMPARATIVO POR MESH

Barrido espectral traslapado completo de ambos tamaños de partícula de extracto de espinaca extraído con CO₂ a 1200 PSI

Línea negra A entre tamiz 14 y 22

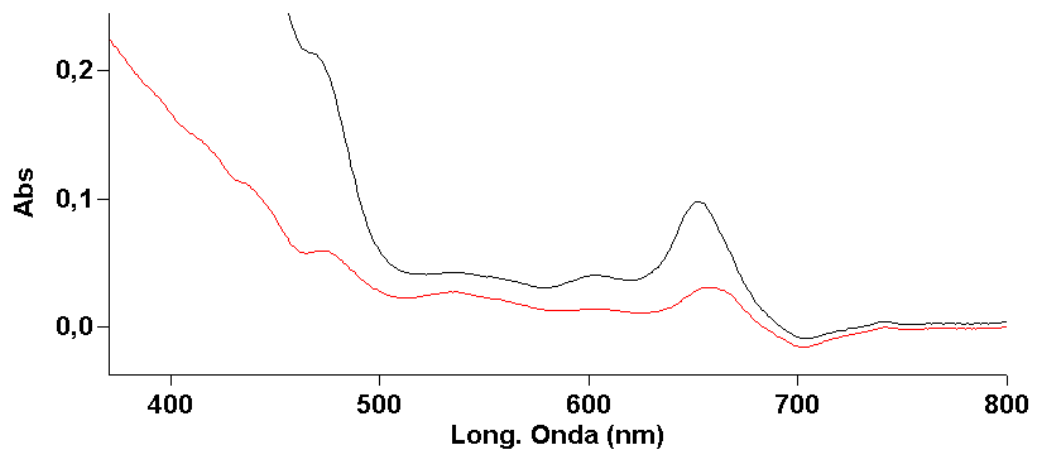
Línea roja B entre tamiz 6 y 14



Barrido espectral traslapado ampliado de ambos tamaños de partícula de extracto de espinaca extraído con CO₂ a 1200 PSI

Línea negra A entre tamiz 14 y 22

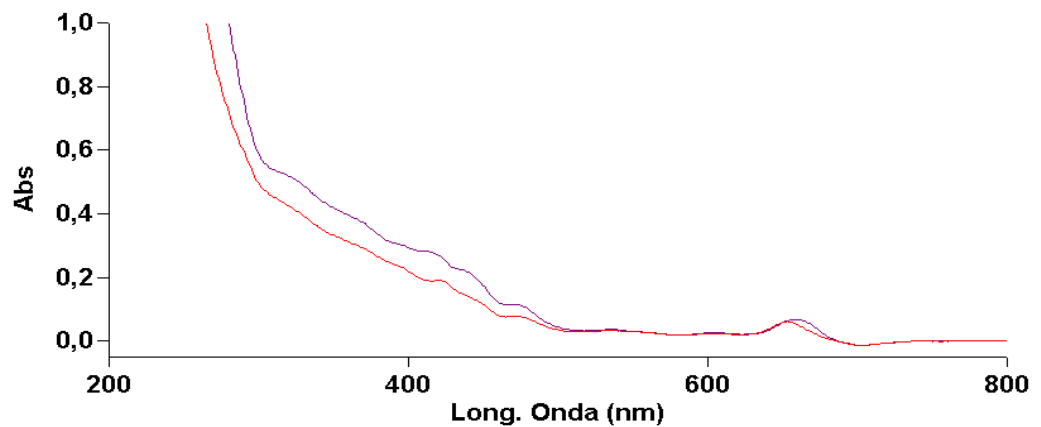
Línea roja B entre tamiz 6 y 14



Barrido espectral traslapado completo de ambos tamaños de partícula de extracto de espinaca extraído con CO₂ a 1350 PSI

Línea negra A entre tamiz 14 y 22

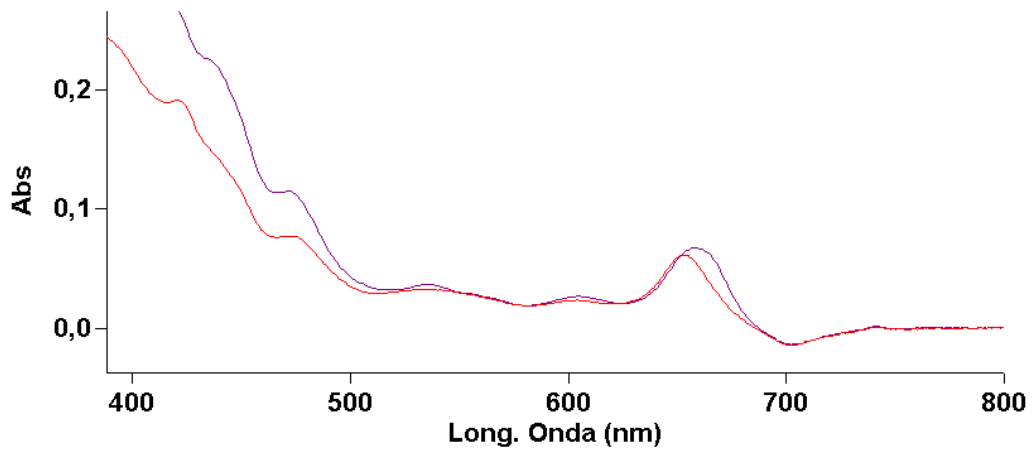
Línea roja B entre tamiz 6 y 14



Barrido espectral traslapado ampliado de ambos tamaños de partícula de extracto de espinaca extraído con CO₂ a 1350 PSI

Línea negra A entre tamiz 14 y 22

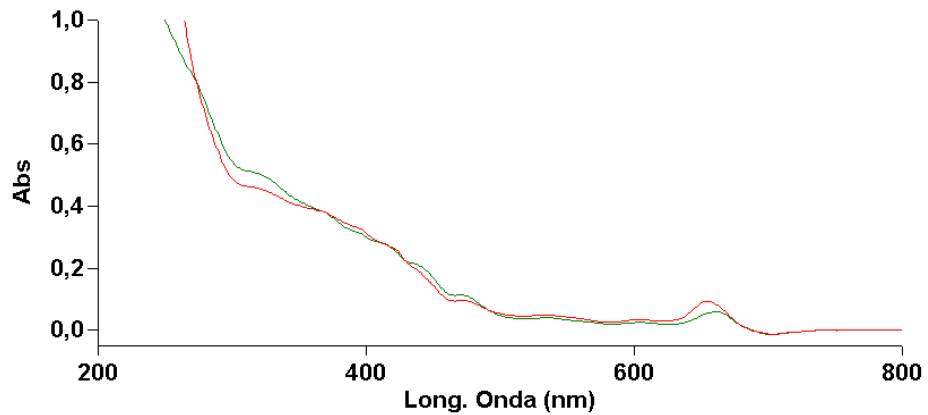
Línea roja B entre tamiz 6 y 14



Barrido espectral traslapado completo de ambos tamaños de partícula de extracto de espinaca extraído con CO₂ a 1500 PSI

Línea negra A entre tamiz 14 y 22

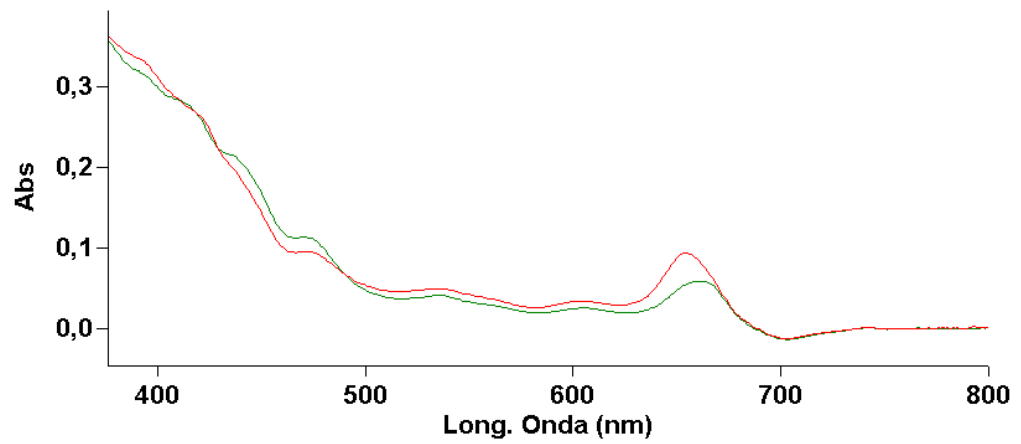
Línea roja B entre tamiz 6 y 14



Barrido espectral traslapado ampliado de ambos tamaños de partícula de extracto de espinaca extraído con CO₂ a 1500 PSI

Línea negra A entre tamiz 14 y 22

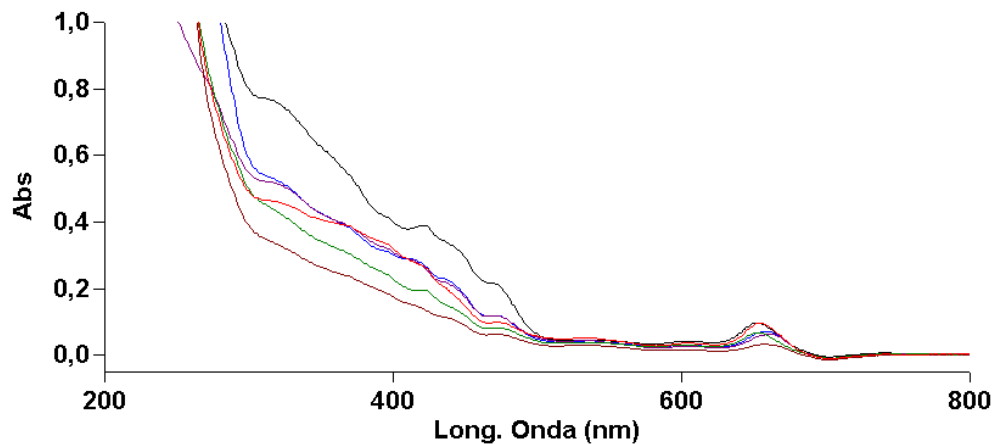
Línea roja B entre tamiz 6 y 14



BARRIDO ESPECTRAL COMPARATIVO TOTAL

Barrido espectral traslapado completo de ambos tamaños de partícula de extracto de espinaca extraído con CO₂ a las tres distintas presiones

- Negra: Partícula entre tamiz 14 y 22 extraído con CO₂ a 1200Psi
- Azul: Partícula entre tamiz 14 y 22 extraído con CO₂ a 1350Psi
- Violeta: Partícula entre tamiz 14 y 22 extraído con CO₂ a 1500Psi
- Marrón: Partícula entre tamiz 6 y 14 extraído con CO₂ a 1200Psi
- Verde: Partícula entre tamiz 6 y 14 extraído con CO₂ a 1350Psi
- Roja: Partícula entre tamiz 6 y 14 extraído con CO₂ a 1500Psi



Barrido espectral traslapado de ambos tamaños de partícula de extracto de espinaca extraído con CO₂ a las tres distintas presiones, ampliado de 400 a 800 nm

Negra: Partícula entre tamiz 14 y 22 extraído con CO₂ a 1200Psi

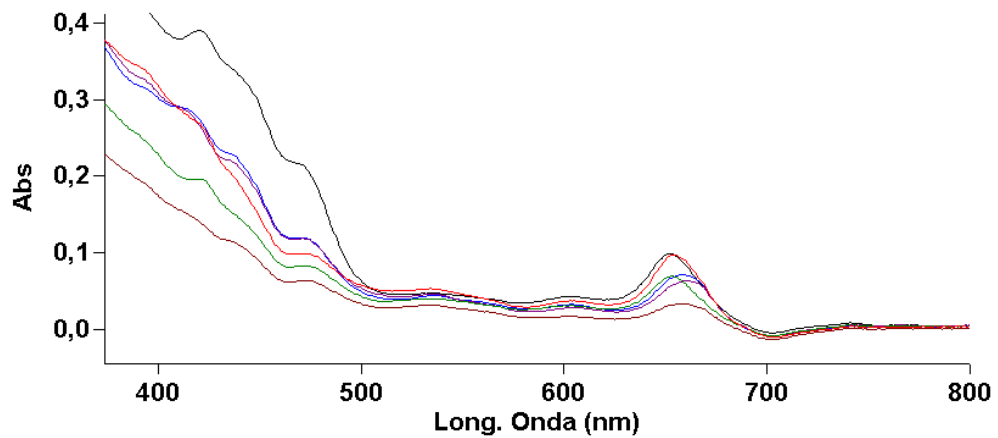
Azul: Partícula entre tamiz 14 y 22 extraído con CO₂ a 1350Psi

Violeta: Partícula entre tamiz 14 y 22 extraído con CO₂ a 1500Psi

Marrón: Partícula entre tamiz 6 y 14 extraído con CO₂ a 1200Psi

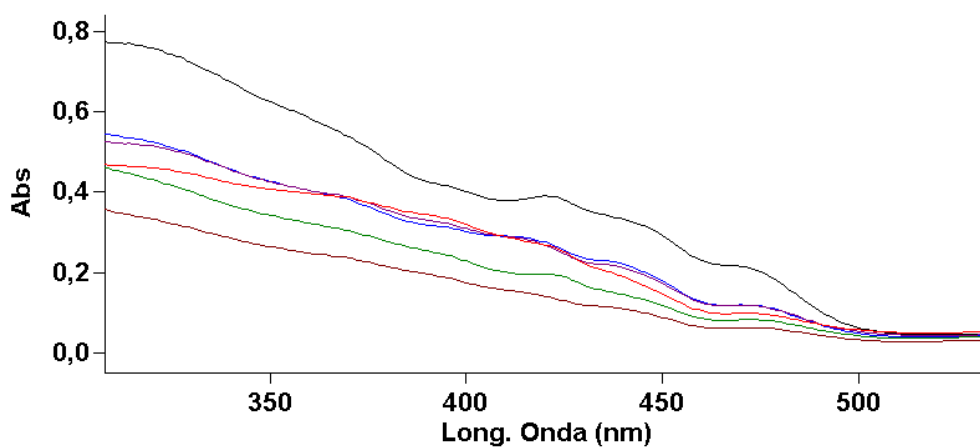
Verde: Partícula entre tamiz 6 y 14 extraído con CO₂ a 1350Psi

Roja: Partícula entre tamiz 6 y 14 extraído con CO₂ a 1500Psi



Barrido espectral traslapado de ambos tamaños de partícula de extracto de espinaca extraído con CO₂ a las tres distintas presiones, ampliado de 300 a 550 nm

- Negra: Partícula entre tamiz 14 y 22 extraído con CO₂ a 1200Psi
- Azul: Partícula entre tamiz 14 y 22 extraído con CO₂ a 1350Psi
- Violeta: Partícula entre tamiz 14 y 22 extraído con CO₂ a 1500Psi
- Marrón: Partícula entre tamiz 6 y 14 extraído con CO₂ a 1200Psi
- Verde: Partícula entre tamiz 6 y 14 extraído con CO₂ a 1350Psi
- Roja: Partícula entre tamiz 6 y 14 extraído con CO₂ a 1500Psi



Barrido espectral traslapado de ambos tamaños de partícula de extracto de espinaca extraído con CO₂ a las tres distintas presiones, ampliado de 600 a 700 nm

Negra: Partícula entre tamiz 14 y 22 extraído con CO₂ a 1200Psi

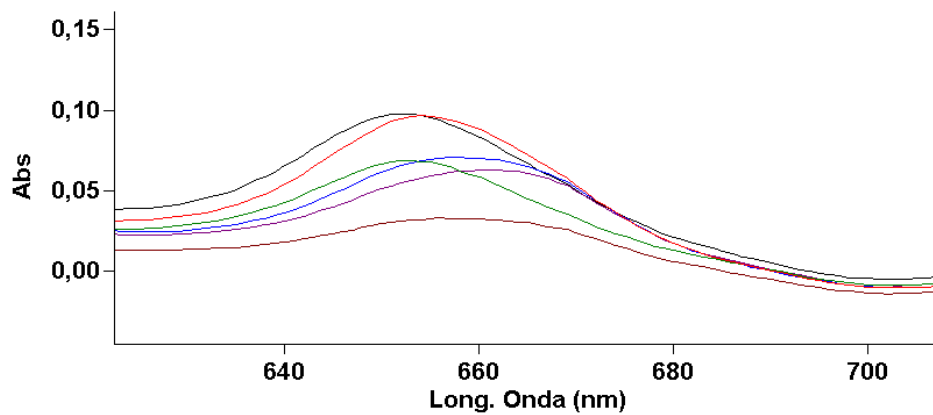
Azul: Partícula entre tamiz 14 y 22 extraído con CO₂ a 1350Psi

Violeta: Partícula entre tamiz 14 y 22 extraído con CO₂ a 1500Psi

Marrón: Partícula entre tamiz 6 y 14 extraído con CO₂ a 1200Psi

Verde: Partícula entre tamiz 6 y 14 extraído con CO₂ a 1350Psi

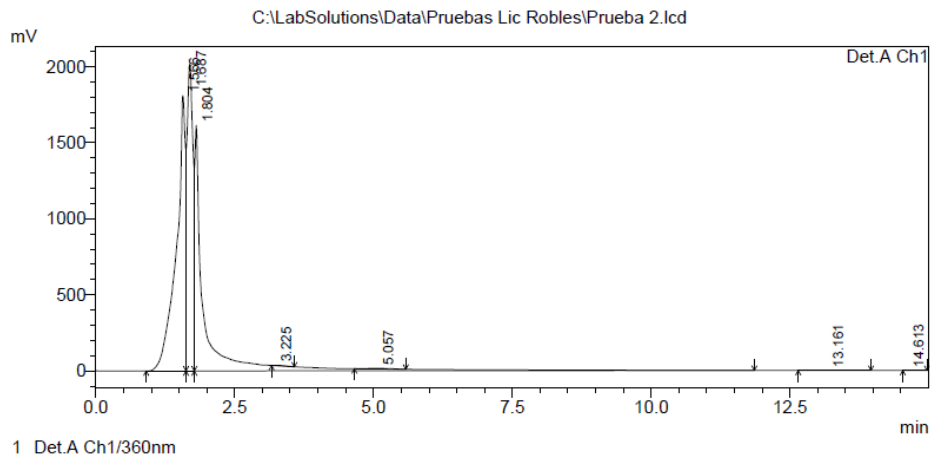
Roja: Partícula entre tamiz 6 y 14 extraído con CO₂ a 1500Psi



Análisis extractos en hplc

**Cromatograma de extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22,
extraído con CO₂ a 1200 PSI**

<Chromatogram>



**Cromatograma de extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22,
extraído con CO₂ a 1200 PSI**

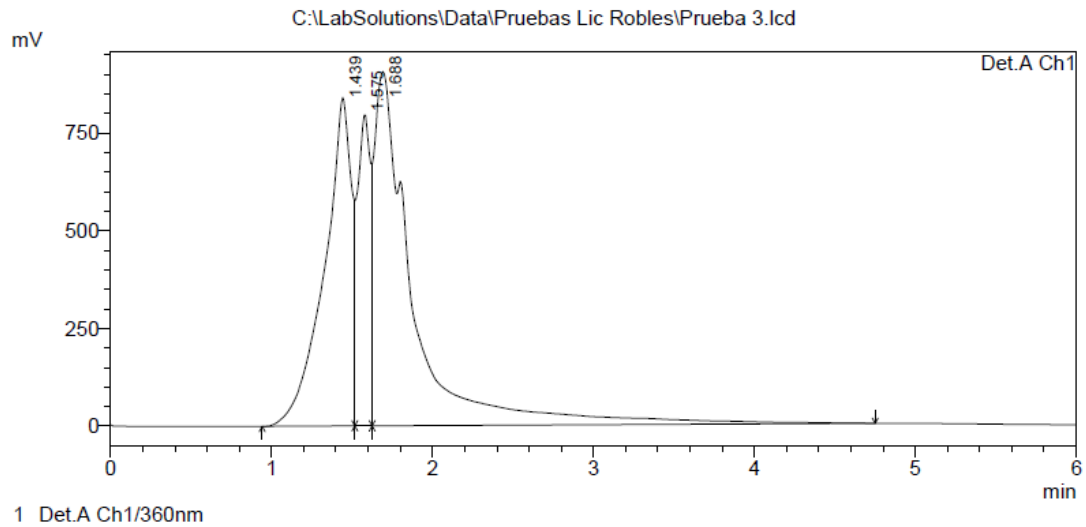
PeakTable

Detector A Ch1 360nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.566	20937640	1809033	37.643	33.208
2	1.687	15281799	2018279	27.475	37.049
3	1.804	19221283	1613853	34.557	29.625
4	3.225	35331	1433	0.064	0.026
5	5.057	136072	4807	0.245	0.088
6	13.161	7717	161	0.014	0.003
7	14.613	1511	74	0.003	0.001
Total		55621352	5447641	100.000	100.000

**Cromatograma de extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14,
extraído con CO₂ a 1200 PSI**

<Chromatogram>



**Cromatograma de extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14,
extraído con CO₂ a 1200 PSI**

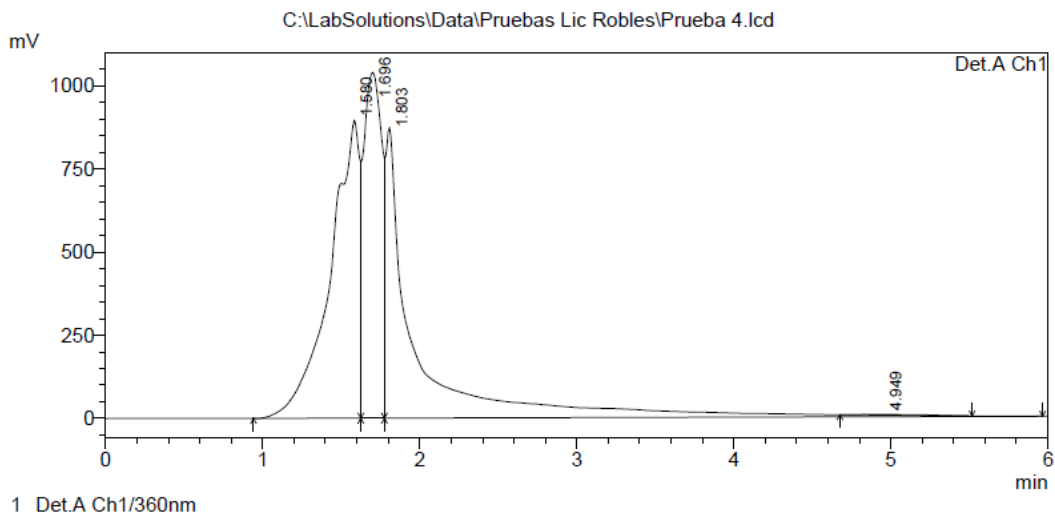
PeakTable

Detector A Ch1 360nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.439	9935467	840788	33.537	33.077
2	1.575	4542928	794947	15.335	31.273
3	1.688	15147116	906202	51.129	35.650
Total		29625512	2541936	100.000	100.000

**Cromatograma de extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22,
extraído con CO₂ a 1350 PSI**

<Chromatogram>



**Cromatograma de extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22,
extraído con CO₂ a 1350 PSI**

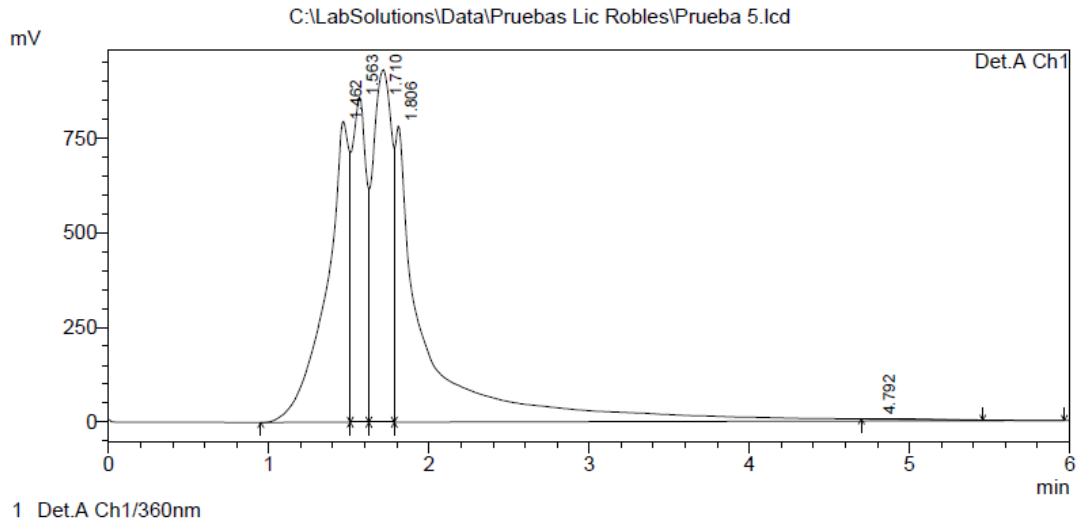
PeakTable

Detector A Ch1 360nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.580	11710604	896156	37.068	31.869
2	1.696	8302337	1039555	26.280	36.968
3	1.803	11527863	874563	36.490	31.101
4	4.949	51384	1751	0.163	0.062
Total		31592189	2812026	100.000	100.000

**Cromatograma de extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14,
extraído con CO₂ a 1350 PSI**

<Chromatogram>



**Cromatograma de extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14,
extraído con CO₂ a 1350 PSI**

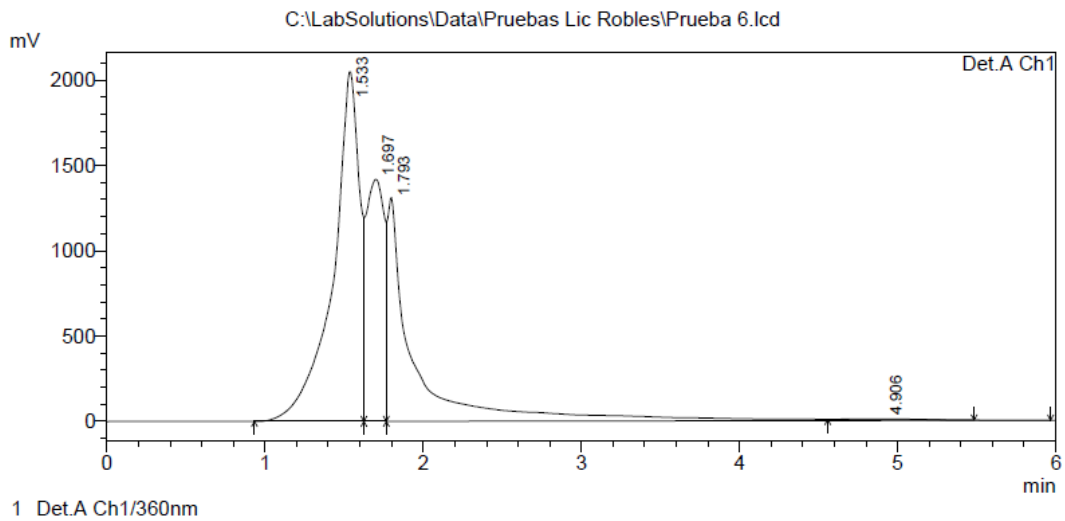
PeakTable

Detector A Ch1 360nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.462	7978164	795289	24.958	23.616
2	1.563	5280857	859254	16.520	25.515
3	1.710	7725109	930330	24.167	27.626
4	1.806	10954839	782316	34.270	23.231
5	4.792	27124	434	0.085	0.013
Total		31966092	3367623	100.000	100.000

**Cromatograma de extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22,
extraído con CO₂ a 1500 PSI**

<Chromatogram>



**Cromatograma de extracto de espinaca, partícula entre tamiz 14 y 22,
extraído con CO₂ a 1500 PSI**

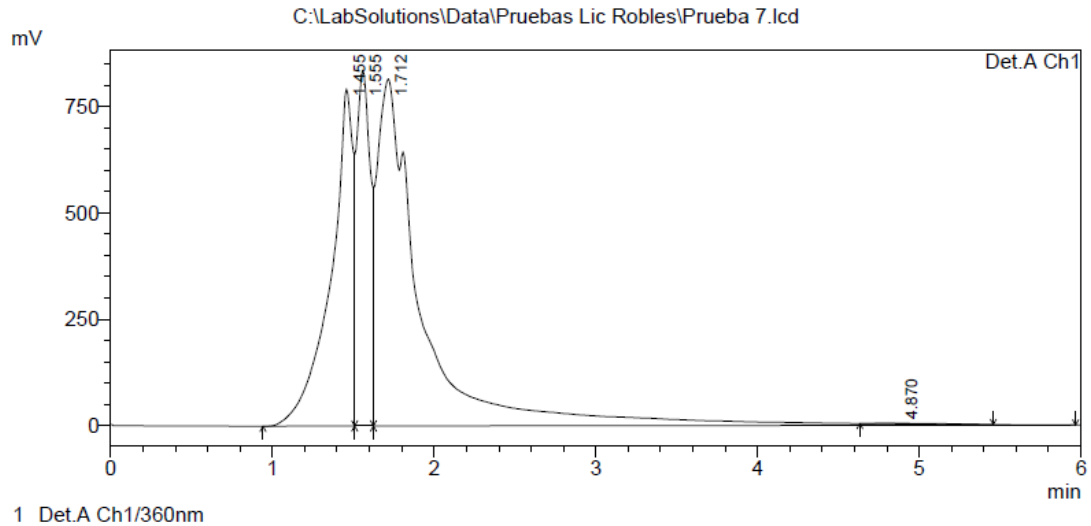
PeakTable

Detector A Ch1 360nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.533	23960231	2047636	47.131	42.810
2	1.697	11135108	1419475	21.903	29.677
3	1.793	15656337	1312901	30.797	27.449
4	4.906	85944	3058	0.169	0.064
Total		50837620	4783070	100.000	100.000

**Cromatograma de extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14,
extraído con CO₂ a 1500 PSI**

<Chromatogram>



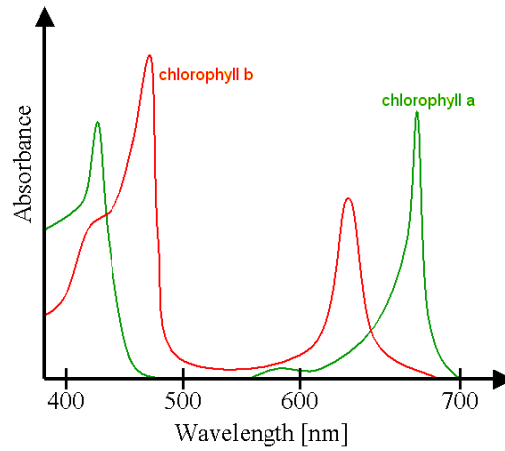
**Cromatograma de extracto de espinaca, partícula entre tamiz 6 y 14,
extraído con CO₂ a 1500 PSI**

PeakTable

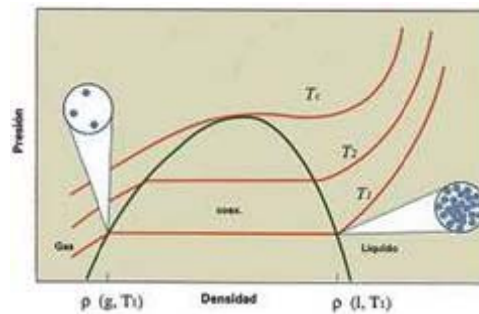
Detector A Ch1 360nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.455	7698889	792617	27.043	32.406
2	1.555	4951111	836361	17.391	34.195
3	1.712	15790454	815940	55.466	33.360
4	4.870	28386	947	0.100	0.039
Total		28468839	2445865	100.000	100.000

Barrido espectral teórico de clorofila



Isotermas de un fluido



Isotermas para un fluido que indican cómo varía su densidad con la presión. Vemos que por encima del punto crítico existe una sola fase, y que para densidades altas (lado derecho) la curva se mantiene muy plana, lo que implica grandes variaciones de densidad para pequeños incrementos de presión.

Fuente: <http://www.cienciahoy.org/hoy43/fluid4.htm>

Spinacia Oleracea fresca en campo



Spinacia Oleracea seca y molida



Equipo de extracción supercrítica



Equipo de extracción supercrítica – Celda extracción



Equipo de extracción supercrítica – Tanque CO2 2000psi



Equipo de extracción supercrítica – Válvula paso ingreso



Equipo de extracción supercrítica – Válvula de descompresión



Equipo de extracción supercrítica – Manómetros reguladores de presión



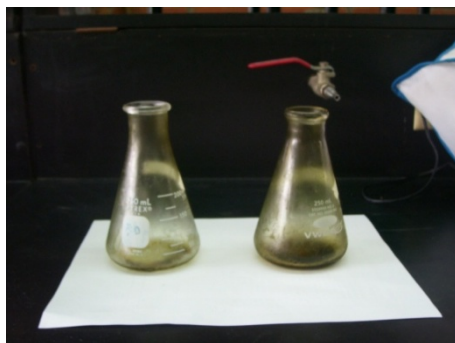
Extractos obtenidos primera corrida



Extractos obtenidos segunda corrida



Extracto recibido en earlenmeyer luego de descompresión del sistema



Extracto recibido en earlenmeyer luego de descompresión del sistema



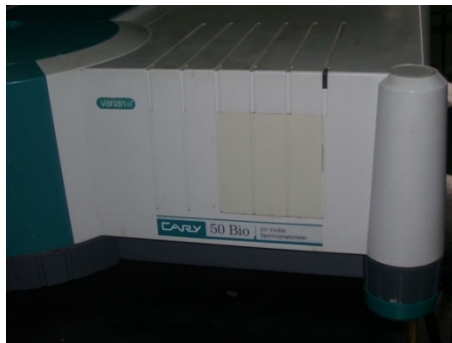
Equipo de HPLC



Equipo de Espectrofotometría Completo



Equipo de Espectrofotometría

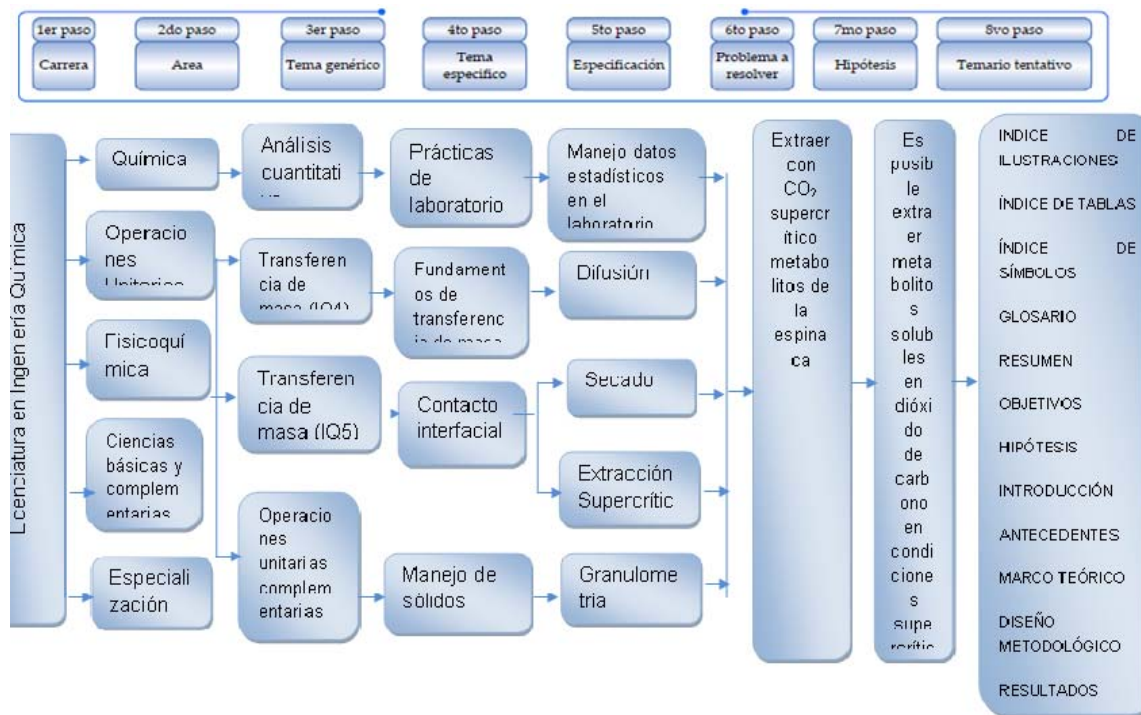


ANEXOS

Anexo 1. Tabla de requisitos académicos

Extracción de metabolitos solubles en dióxido de carbono en condiciones supercríticas a partir de espinaca (*Spinacia oleracea*)

Procedimiento para iniciar la tesis en la carrera de Ingeniería Química



Anexo 2. Árbol de problemas

Diagrama de causa – efecto del problema para punto de tesis

