

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



**EXTRACCIÓN DE COLORANTE A PARTIR DE LAS HOJAS DE
LA ESPINACA (*Spinacia oleracea*)**

TESIS

PRESENTADA POR:

ADELAYDA BEATRIZ HAÑARI ZAPANA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO QUÍMICO

PUNO – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA****ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA****EXTRACCIÓN DE COLORANTE A PARTIR DE LAS HOJAS DE LA
ESPINACA (*Spinacia oleracea*)****TESIS PRESENTADA POR:****ADELAYDA BEATRIZ HAÑARI ZAPANA****PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE: INGENIERO QUÍMICO****PRESIDENTE**

:

Dr. GREGORIO PALOMINO CUELA

PRIMER MIEMBRO: ... *Lidia Ensueño Romero*

Dra. LIDIA ENSUEÑO ROMERO IRURI

SEGUNDO MIEMBRO

:

Dr. TEOFÍLO DONAÍRES FLORES

DIRECTOR/ASESOR

:

M.Sc. CIRO HERNAN VERA ALATRISTA

Área : Procesos Industriales

Tema: Obtención de colorante natural

Línea: Tecnología de alimentos

Fecha de sustentación: 28 de Diciembre de 2018

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS.....	7
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
I. INTRODUCCIÓN	12
1.1. ANTECEDENTES	13
1.2. OBJETIVOS	16
1.2.1. Objetivo general	16
1.2.2. Objetivos específicos	16
II. REVISIÓN DE LITERATURA	17
2.1. MARCO CONCEPTUAL	17
2.1.1. ESPINACA (<i>Spinacia olerácea</i>).....	17
2.1.2. Centro de Origen y Dispersión del Cultivo	18
2.1.3. Clasificación Taxonómica	18
2.1.4. Descripción Morfológica	18
2.1.5. Composición fotoquímica	20
2.1.6. USOS Y APLICACIONES	21
2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS FIBRAS NATURALES.	22
2.3. COLORANTES	24
2.3.1. Color	24
2.3.2. Clasificación de los Colorantes	25
2.3.3. Colorantes artificiales	26
2.3.4. Colorantes naturales	27
2.3.5. Importancia de los colorantes naturales frente a los artificiales	28
2.3.6. Clorofila	29
2.3.7. Método extracción sólido - líquido	30
2.3.8. Lixiviación	31
2.3.9. Extracción con Equipo Soxhlet	33
2.3.10. Etanol.	35
2.3.11. Espectrometría	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1. LUGAR DE ESTUDIO	40
3.2. MATERIALES	40

3.2.1.	MATERIAL DE LABORATORIO, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	40
3.3.	MÉTODO EXPERIMENTAL.....	41
3.3.1.	Materia prima	41
3.3.2.	Selección y limpieza	41
3.3.3.	Acondicionamiento	42
3.3.4	Evaluación físicoquímica de la espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>).	42
3.4.	DESCRIPCIÓN DETALLADA POR OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3.4.1.	El proceso de extracción de colorante de la espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>), dando a conocer los parámetros óptimos de concentración del solvente, tiempo y cantidad de materia prima en la tecnología propuesta.....	42
3.4.2.	El modelo matemático para el proceso de extracción de colorante de las hojas de la espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>).....	46
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1.	RESULTADOS.....	49
4.1.1.	Los parámetros óptimos de concentración del solvente, tiempo y cantidad de materia prima de la tecnología propuesta.	49
4.1.1.1.	Efecto de la concentración del solvente.....	49
4.1.1.2.	Efecto del tiempo en la extracción sólido – líquido	50
4.1.1.3.	Efecto de la cantidad de materia prima	51
4.1.1.4.	Rendimiento de obtención de colorante (clorofila)	53
4.1.2.	Modelo matemático para el proceso de extracción de colorante de las hojas de la espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)	53
	DISCUSIÓN	56
	CONCLUSIONES	59
	RECOMENDACIONES.....	60
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
	ANEXOS	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.Composición química de la espinaca	20
Tabla 2.Valor nutricional con base en 100 g de parte	21
Tabla 3.Relación entre la absorción de luz y el color complementario	25
Tabla 4.Características generales del etanol.	36
Tabla 5.Datos de la curva de calibración para la clorofila.....	44
Tabla 6.Variables naturales-datos del diseño experimental	48
Tabla 7.Resultados de la evaluación de concentración del solvente en el proceso de obtención del colorante.....	49
Tabla 8.Resultados de la evaluación del tiempo en el proceso de obtención del colorante.	50
Tabla 9.Resultados de la evaluación de cantidad de materia prima en el proceso de obtención del clorofila	52
Tabla 10.Rendimiento del colorante (clorofila).....	53
Tabla 11.Variables naturales-datos del diseño experimental	54
Tabla 12.Matriz de diseño factorial $2^3 = 8$ Para el colorante.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de cultivo de espinaca	17
Figura 2.Cadena celobiósica de las fibras celulósicas	23
Figura 3.Cadena proteica	23
Figura 4.Extracción con Soxhlet en el momento en que se produce el sifonamiento del solvente.	34
Figura 5.Curva de calibración, línea de tendencia de la clorofila	45
Figura 6.Extracción con Etanol al 96 %	46
Figura 7.Esquematización del diseño factorial 2^3	47
Figura 8.Efecto de la concentración del solvente en el proceso de obtención de clorofila	50
Figura 9.Efecto del tiempo en el proceso de obtención del colorante natural.	51
Figura 10.Efecto de la cantidad de espinaca en el proceso de obtención de la clorofila	52
Figura 11.Pareto estandarizado para Y	67
Figura 12.Efectos principales para Y	68
Figura 13.Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada	68

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

GSFA	: Norma General del Codex Alimentarius
FDA	: Administración de Medicamentos y Alimentos
FEMA	: Asociación de Fabricantes de Extractos y Sabores
SIN	: Sistema Internacional de Numeración de Aditivos Alimentarios
COLOR INDEX:	Internacional del color
cm	: Centímetros
nm	: Nanómetros
L	: Litro
mL	: Mililitro
mg	: Miligramos
pH	: Potencial de hidrógeno
°C	: Grados centígrados
Abs	: Absorbancia

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi madre Paulina, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones.

A mi padre Celso, a pesar de nuestra distancia, siento que estás conmigo siempre y enseñarme el camino de la superación.

A mis hermanos Edith, Peter, Didier y Cesar a quien los quiero mucho, por compartir momentos significativos conmigo y ayudarme en cualquier momento.

A mis sobrinas y sobrino Maryelin, Avril, Danae, Colbie y Yobhan, por la alegría que llenan en mi vida.

A Denis por acompañarme y apoyarme en esta nueva etapa de mi vida. No hay mejor regalo que ese pequeñito amor que se hace esperar nueve meses.

Adelayda Beatriz Hañari Zapana

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar doy infinitamente gracias a Dios, por haberme dado fuerza y valor para culminar esta etapa de mi vida.

Agradezco también la confianza y el apoyo brindado por toda mi familia, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mis jurados Dr. Gregorio Palomino Cueva, Dra. Lidia Ensueño Iruri y al Dr. Teófilo Donaires Flores, por sus críticas y apreciaciones para lograr un buen trabajo.

Al Dr. German Quille Calizaya, por su apoyo incondicional en el transcurso de mi carrera universitaria y por toda la colaboración brindada, durante la elaboración de este proyecto.

Finalmente a mis compañeros de clase el grupo los chancones y a todas las personas que formaron parte de mi vida porque cada persona me llevo lo grato y valioso, fue aprender de cada uno de ellos, conseguir el esfuerzo y sacrificio dado.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación es extraer colorante a partir de las hojas de la espinaca (*Spinacia oleracea*), así mismo los objetivos específicos: Determinar el proceso de extracción de colorante de la espinaca, dando a conocer los parámetros óptimos de concentración del solvente, tiempo, cantidad de materia prima y determinar el modelo matemático para el proceso de extracción de colorante de las hojas de la espinaca. La metodología utilizada es el proceso de extracción sólido-líquido, por reflujo conveniente para la extracción de colorante, utilizando como solvente alcohol de 96 %. Los parámetros utilizados son el alcohol como solvente, siendo la concentración el 96 %. Los resultados indican la extracción de colorante que se obtuvo 12 mL como la clorofila, el tiempo adecuado de trabajo es de 60 minutos y el otro parámetro es la cantidad de hojas de espinaca utilizada, empleándose pesos de 2 a 10 g. El rendimiento del proceso de extracción de colorante por el método sólido-líquido es de 98,57. Las variables de operación que se modificaron en todo el proceso de extracción fueron la cantidad de materia prima de 2 a 10 g, el tiempo de 24 a 48 horas y la concentración del solvente de 20 a 98 %. Con objeto de establecer sus influencias en los procesos de ensayos, se extrajo 12 mL de colorante (clorofila) con un coeficiente de correlación al $R^2 = 83,78 \%$ con el objeto de establecer la influencia que ejercen los parámetros indicados. Se efectuó el modelo matemático por experimentación y estadística, según se observa en el anexo A, la cantidad de materia prima óptima es de 10 g para la extracción de 12 mL de colorante, con una concentración del solvente del 60 %, con un tiempo de 60 minutos, utilizando el rotavapor para una mayor concentración del colorante se trabajó a una temperatura de 40 °C y un tiempo de 60 minutos. Por lo tanto con el modelo matemático que se obtuvo $R^2 = 83,78 \%$ se concluye que la cantidad de materia prima es la variable más significativa en el proceso de extracción de colorante.

Palabras claves: colorante, espinaca, extracción, líquido, sólido, solvente.

ABSTRACT

The aim of the present investigation is to extract dye from the leaves of spinach (*Spinacia oleracea*), likewise the specific objectives were: To determine the process of dye extraction from spinach, making known the optimal parameters of solvent concentration, time, amount of raw material and to determine the mathematical model for the process of dye extraction from spinach leaves. The methodology used is the solid-liquid extraction process, by convenient reflux for dye extraction, using 96% alcohol as a solvent. The parameters used are alcohol as a solvent, the concentration being 96%. The results indicate the extraction of dye that were obtained 12 mL as chlorophyll, the appropriate working time is 60 minutes and the other parameter is the amount of spinach leaves used, using weights of 2 to 10 g. The production of the dye extraction process by the solid-liquid method is 98.57. The operating variables that were modified throughout the extraction process were the amount of raw material from 2 to 10 g, the time from 24 to 48 hours and the concentration of the solvent from 20 to 98%. In order to establish their influences on the test processes, 12 mL of dye (chlorophyll) with a correlation coefficient of $R^2 = 83.78\%$ was extracted, in order to establish the influence exerted by the indicated parameters. The mathematical model was carried out by experimentation and statistics, as shown in Annex A, the amount of optimal raw material is 10 g for the extraction of 12 mL of dye, with a solvent concentration of 60%, with 60 minutes of time, using the rotary evaporator for a higher dye concentration, it worked at a temperature of 40°C and a time of 60 minutes. Therefore, with the mathematical model that was obtained is $R^2 = 83.78\%$, it is concluded that the amount of raw material is the most significant variable in the dye extraction process.

Keywords: dye, spinach, extraction, liquid, solid, solvent.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de colorantes se remonta a tiempos inmemorables. Las razones de su continuado uso se debe a su potencial de teñir, especialmente en productos naturales que se vienen utilizando en alimentos con el objeto de mejorar su apariencia sin hacer daño a la salud, razón por la cual la obtención de colorantes naturales está siendo utilizada cada vez más en los alimentos, por lo que desarrollar el proceso de extracción de colorante de las hojas de la espinaca es de mucho interés para la sociedad.

Seguramente en los próximos años habrá una reducción considerable del uso de los colorantes sintéticos, debido a que algunos de estos presentan efectos nocivos para la salud (Sighthings, 2004). En su reemplazo, aparece un notable interés por el uso de colorantes naturales, que hasta ahora no requieren certificación alguna para su empleo y que se pueden obtener a partir de muchas plantas, bien sean de las hojas, de los frutos o de los tallos y raíces (FDA, 2004)

Es necesario realizar la investigación con el fin de desarrollar la posibilidad del aprovechamiento de las hojas de la espinaca (*Spinacia olerácea*) para la producción de colorante, ya que posee cualidades especiales y condiciones óptimas. La mejora del sector químico como ciencia aplicada debe buscar la satisfacción en sectores productivos, revalorar los productos de la región, facilitando condiciones y herramientas fáciles de utilizar.

En la región de Puno, cabe destacar que no se han realizado estudios para la extracción de colorante a partir de las hojas de espinaca (*Spinacia olerácea*), por lo que esta investigación contribuye en determinar las condiciones necesarias para este proceso.

Los colorantes orgánicos de mayor aplicación son el caroteno y la clorofila, obtenidos de las plantas verdes y frescas, teniendo numerosos usos. Las principales aplicaciones están dadas como elementos de aplicación en alimentos, jarabes, bebidas, pigmentos para plásticos, lacas, barnices, pinturas, tintes para impresión, tintes para el cabello, textiles y otros materiales con la finalidad de

impartir color, opacidad y otras propiedades atractivas.

Los objetivos de la presente investigación es determinar las características óptimas para la extracción de colorantes a partir de las hojas de la espinaca (*Spinacia oleracea*), por el método de extracción sólido-líquido, como el proceso de extracción de colorante de la espinaca (*Spinacia oleracea*), dando a conocer los parámetros óptimos de concentración del solvente, tiempo y cantidad de materia prima, determinando el modelo matemático para el proceso de extracción de colorante de las hojas de la espinaca (*Spinacia oleracea*)

1.1. ANTECEDENTES

Cevallos *et al* (2017). En el siguiente trabajo de titulación se basa en la extracción y caracterización de un colorante a partir de la borra del café, se recolecto la materia prima en la ciudad de Guayaquil de las instalaciones de una fábrica de café soluble. Realizaron el método del cuarteo para determinar cuál de las muestras era la más óptima para el trabajo, esta se la subdividió en ocho partes durante un periodo de 192 horas, se aplicó la operación unitaria de secado para obtener una humedad de 89%. Luego se lavó la muestra con etanol y cloroformo grado reactivo, se hizo una extracción sólido-líquido utilizando etanol al 96 % como solvente obteniendo un rendimiento de 10,15%. Se determinó por medio de cromatografía de capa fina la presencia de colorante café-marrón, Se realizó un barrido por medio de un espectrofotómetro uv-visible genesys 10 UV caracterizamos nuestro producto reportándonos absorbancias de 4.839 – 2.889 en las siguientes longitudes de onda 510 y 610 nm, demostrando que la intensidad de color es de 0,20.

Nayhua (2017). En su trabajo de investigación, se realizó con el objetivo de obtener un colorante natural (betalinas) por el método de extracción sólido-líquido partir de la cáscara de tuna para su aplicación en la industria de alimentos, en la evaluación fisicoquímica se trabajó con una representación promedio de las muestras donde se observa que la cáscara de tuna representa un 46,82% del peso del fruto entero, con un pH igual a 5,39 solidos solubles 5,02 °Brix y humedad de 85,17%. Se determinó los parámetros de concentración del solvente realizando

varias muestras a diferentes concentraciones de etanol en un rango de 30 - 90%, en un tiempo de 30-120 min y una cantidad de materia prima de 5-15 g se cuantifico la concentración de betalainas por el método de espectrofotómetro UV/VIS con un valor de 0,173 mg de betalainas.

Hernández (2016). Logró describir la extracción de antocianinas a partir del maíz morado (*Zea mays L.*), resumiendo el proceso en dos etapas: Separación de la coronta, molienda, secado en túnel, extracción hidroalcohólica ácida I y II, filtrado, evaporación, adición de encapsulante (CMC), atomización y envasado. Mediante el método de pH diferencial se determina la concentración total de antocianina. Los diferentes parámetros en el proceso de extracción de antocianinas son concentración del solvente, tiempo, temperatura, pH. Así como se detalla en cada una de las operaciones que conforman el diagrama de flujo. La importancia de la antocianina como colorante y antioxidante natural, es que representa un potencial en la Industria Alimentaria teniendo aplicaciones en la coloración de bebidas, productos lácteos, productos de panadería y pastelería, mermeladas, frutas en almíbar, etc.

Ordóñez, *et al* (2016). Determinaron mediante valoración sensorial al ser comparado con un producto de similares características encontrado en el mercado; y con la finalidad de definir el tiempo de vida de estante se analizaron propiedades como: color, olor, sabor, textura y pH durante un lapso de tiempo de 21 días. Con los resultados se estableció que el lote 1 (M1) de la salchicha tipo Viena correspondiente a la dosis de 1 mL de colorante de flor de Jamaica / 1,5 kg de masa y el lote 3m³ del yogur de mora correspondiente a 6 ml de colorante de la flor de Jamaica/ L de yogur fueron los productos de mayor aceptabilidad por parte de los encuestado.

Galarza (2013). Buscó obtener un colorante aprovechando las flores de Ataco o Sangorache (*Amaranthus sp.*), se utilizó esta parte porque estas forman inflorescencias cuya forma es glomerular y de un intenso color rojo-violeta. Se probaron dos solventes para la extracción del colorante, metanol y agua, que fue el solvente que dio mejores resultados, así mismo se probaron diferentes

relaciones materiales vegetal: volumen de solvente y tiempos de mezcla; para esta última se construyó una máquina de partes recicladas de diseño propio. Todas las extracciones fueron realizadas a temperatura ambiente del laboratorio, para evitar la desnaturalización de la sustancia que otorga el color. Se determinó que se necesita emplear una relación mv: volumen de solvente de 1:75, mezclar durante 60 minutos a la velocidad alta, que es de 396 rpm aprox., para obtener la mayor concentración de 9,75 mg/100 g de material vegetal del colorante. Los resultados indican que la mayor retención de pigmentos se obtiene cuando el colorante está a pH 5, en refrigeración y expuesto a la luz ambiental; que es la mejor forma de conservar el colorante. La espectrofotometría fue el método empleado para determinar las concentraciones del colorante, para lo cual se utilizó el buffer McIlvaine.

Rivera *et al* (2005), La clorofila -a presentó un promedio de 30,1 mg/m³ con el método fluorométrico y 66,2 mg/m³ con el método espectrofotométrico. De las 200 muestras incluidas en el análisis, el 76% presentaron registros más altos con el método espectrofotométrico. Los valores obtenidos con el método fluorométrico oscilaron entre 0,6 y 845,1 mg/m³ y con el método espectrofotométrico entre 0,9 y 4158,8 mg/m³. Al establecer la diferencia entre los datos hallados por espectrofotometría y fluorometría, se observaron promedios de la diferencia más bajos para el H. Llano Grande (1,8 mg/m³) y la L. Guatavita (2,6 mg/m³), mientras que en los otros humedales el promedio de la diferencia fue superior a 40 mg/m³. El porcentaje de diferencia absoluta con respecto al método fluorométrico fue de 66% en H. Siberia, 36% en H. Briceño, 27% en L. Guatavita y 22% en H. Llano Grande. Al calcular el porcentaje del número de muestras cuya medición de clorofila por el método espectrofotométrico presenta un valor más alto (sobrestimación) o más bajo (subestimación) que el obtenido por el método fluorométrico, se encontró que en el 100% de los datos espectrofotométricos de H. Llano Grande sobrestimaron el valor de clorofila. En L. Guatavita y H. Briceño el porcentaje de sobrestimación fue aproximadamente del 70%, mientras en H. Siberia el porcentaje de sobrestimación fue igual al de subestimación (50%).

Paredes (2002). En su trabajo de la obtención del colorante se lo realiza mediante la maceración con etanol 96%, durante 48 horas para evitar la descomposición de los principios activos, y se obtiene una concentración del 88%. Para realizar la tintura con el colorante obtenido de la *Baccharis latifolia* (chilca), se necesita de mordientes que cumplen la función de fijadores del colorante en la fibra. Al utilizar los diferentes mordientes y sus mezclas, se obtiene una variedad de colores y tonos, tanto en la lana como en el nylon, que van desde el amarillo al café y los verdes. Luego de los ensayos realizados se determinó que es un colorante que presenta afinidad con la lana y con el nylon, más no con el poliéster, algodón ni acrílico, ya que es un colorante de carácter ácido.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Determinar las condiciones óptimas para la extracción de colorantes a partir de las hojas de la espinaca (*Spinacia oleracea*), por el método de extracción sólido-líquido.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar el proceso de extracción de colorante de la espinaca (*Spinacia oleracea*), dando a conocer los parámetros óptimos de concentración del solvente, tiempo y cantidad de materia prima.
- Determinar el modelo matemático para el proceso de extracción de colorante de las hojas de la espinaca (*Spinacia oleracea*)

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MARCO CONCEPTUAL

2.1.1. ESPINACA (*Spinacia oleracea*)

Según Valades (1999), La espinaca es una hortaliza de hojas que se consume en forma cosida, pero también se puede industrializar o enlatar. En México es la que tiene mayor importancia económica, la espinaca es muy rica en vitamina A y ácido ascórbico. (p.127).



Figura 1. Área de cultivo de espinaca

Fuente: <http://propiedades.hortalizas.es/propiedades-usos-de-la-espinaca.html>

Según Giaconi y Escaff (1998), la palabra espinaca no tiene que ver con el vocablo latino spina (astilla, espina). La planta no posee espinas y su nombre tuvo su origen en Persia, uno de sus lugares de origen, donde se le nombraba como aspanach y luego pasó al árabe con el nombre isfinaj que fue adoptado por el latín vulgar como Spinacia. La espinaca es una planta hortícola herbácea, de hojas comestibles, además de ser muy apetecida por sus cualidades dietéticas y por poseer un sabor característico que se destaca sobre todo por presentar un alto contenido de vitaminas como la A, C y E, todas ellas de acción antioxidante. Así mismo, es muy buena fuente de vitaminas del grupo B, rica en calcio, hierro,

magnesio, potasio, sodio y además presenta también buenas cantidades de fósforo y yodo (Eroski, 1999).

La espinaca está considerada como una de las hortalizas con más alto índice de elementos nutritivos. De hecho, contiene casi todas las vitaminas, sales minerales y, además, es rica en proteínas. Su contenido en vitaminas A y C es especialmente alto, así como el hierro, hasta el punto que los médicos aconsejan su consumo a personas con déficit de nutrición (Leñano, 1973).

2.1.2. Centro de Origen y Dispersión del Cultivo

La forma original o silvestre del cultivo de la espinaca no es conocida; sin embargo, existe consenso en que la especie es originaria de la región del Cáucaso, cerca de Irán, Afganistán y Turkestán (Krarup y Moreira, 1998). Su origen está centrado en el sudoeste asiático fue introducido en España por los árabes en el siglo XI y posteriormente en Europa, siendo citado sus semillas en el siglo XIII por Alberto Magno (Borrego, 1995). Giacconi y Escaff (1998), señalan que en Persia ya se conocía varios años antes de la Era Cristiana. Sin embargo su cultivo en Europa habría comenzado hace unos mil años, con introducciones de los cruzados o los moros. En los siglos XVI y XVII su cultivo se generalizó a toda Europa y desde allí habría sido traída a América (Krarup y Moreira, 1998).

2.1.3. Clasificación Taxonómica

Según Borrego (1995), describe y verifican taxonómicamente a la espinaca de la siguiente manera:

- Familia: Chenopodiaceae
- Género: Spinaceae
- Especie: Oleracea
- Nombre Científico: Spinacea oleracea.
- Nombre vulgar: espinaca.

2.1.4. Descripción Morfológica

Gorini (1999), citado por INFOAGRO (2005), describe las principales

características morfológicas del cultivo de espinaca de la siguiente manera: -Raíz. Típica Pivotante, poco ramificada y de desarrollo radicular superficial. -Tallo. Erecto de 5 cm a 10 cm de longitud, en el que se sitúan las flores.

Hoja.

Son caulíferas, alternas, pecioladas, acorazonadas, otras variedades se presentan con hojas anchas y carnosas de color verde claro y con nervaduras prominentes. Forma una roseta de hojas pecioladas con limbo que puede ser más o menos sagitado, triangular ovalado o triangular acuminado de márgenes enteros o sinuosos y de aspecto blando rizado, liso o abollado. En esta fase de roseta de hojas, la planta puede alcanzar entre 15 a 25 cm de largo, la parte comestible.

Flor e inflorescencia.

Forma un escapo floral que puede alcanzar un porte superior a los 30 cm, las flores son verdosas, imprescindible señalar que se trata de una especie dioica. Las flores masculinas, agrupadas en número de 6 - 12 en las espigas terminales o axilares, presentan color verde y están formadas por un periantio con 4 - 5 pétalos y 4 estambres. Las flores femeninas se reúnen en glomérulos axilares y están formadas por un periantio bi o tetra dentado, con ovarios uni ovulares, estilo único y estigma dividido en 3 - 5 segmentos.

Fruto y Semilla.

Las semillas, lenticulares, son restos de las flores, de aspecto coriáceo, lisos en algunas variedades o espinosas en otras, de color gris rojizo (lo que generalmente se vende como semilla es en realidad el fruto: aquenio). Las semillas mantienen su poder germinativo de 3 a 5 años, 1g de semilla puede contener entre 90 y 115 semillas (Serrano, 1976). La espinaca es una planta anual, dioica y monoica.

Serrano C. Z. 1976. Cultivo de la Espinaca. Publicaciones de Extensión Agraria. Bravo Murillo, Madrid. pp 1-19.

2.1.5. Composición fotoquímica

La espinaca (*Spinacia oleracea*) es una verdura, que aporta apenas 22 calorías por 100 gramos y además tiene una composición nutricional muy privilegiada, su contenido de proteínas es 2,86%, mientras que carbohidratos y grasas apenas se encuentran un 0,8% y 0,35%, respectivamente y dado la cantidad de fibra que es de 2,7%, la convierte en un vegetal ideal para dietas saludables.

La calidad nutricional de la espinaca (*Spinacia oleracea*) también reside en la riqueza mineral y vitamínica que brinda por cada 100 gramos, por eso se aconseja a deportistas y adolescentes en fase de crecimiento. Entre los minerales y vitaminas más importantes están:

- Aporta 672 *ug* de los 1000 *ug*. diarios de vitamina A que requiere el organismo.
- Con 200 *ug* excede las necesidades de ácido fólico diarias de 194 *ug*.
- Contribuye con 28,1 mg de vitamina C de los 60 mg diarios, requeridos.
- De los 350 mg de magnesio que se necesita aporta 79 mg diarios.
- Y 2,71 mg de hierro de los 10 mg que se precisa, provienen de la espinaca.

Tabla 1. Composición química de la espinaca

Agua	89%
Hidratos de carbono	2, 6% (fibra 2, 2%)
Proteínas	1, 2%
Lípidos	0, 3%
Potasio	500 mg/100 g
Sodio	60 mg/100 g
Calcio	90 mg/100 g
Hierro	4 mg/100 g
Fósforo	45 mg/100 g
Vitamina C	30 mg/100 g
Vitamina A	1 mg/100 g
Vitamina B1	0, 1 mg/100 g
Vitamina B2	0, 2 mg/100 g

Fuente: <http://fichas.infojardin.com/hortalizas-verduras/espinaca-Espinacas-espinafre.htm>

Tabla 2. Valor nutricional con base en 100 g de parte comestible de espinaca (hojas)

Agua	90,7%
Proteínas	3,6 g
Carbohidratos	0,8 g
Ca	107,7 mg
P	66,0 mg
Fe	3,0 mg
Na	71,0 mg
K	470 mg
Ácido ascórbico	59,0 mg
Vitamina A	9420 U.I.

Fuente: Producción de Hortalizas Valadez 1999

2.1.6. USOS Y APLICACIONES

2.1.6.1. Tecnológico

Extracción de colorante natural Clorofila de las hojas verdes

2.1.6.2. Medicinal

- En la tabla 1 se detalla los principales constituyentes de la espinaca (*Spinacia olerácea*), está compuesta mayormente por agua. La cantidad de grasas e hidratos de carbono son muy bajos, pero es uno de los vegetales que más proteínas contiene. Rica en nutrientes, se usa para tratar y prevenir la ocurrencia de distintos tipos de cáncer (tumores), incluyendo los de la vejiga, próstata, hígado y pulmones.

Es un alimento especial para curar la anemia y la arterioesclerosis. Posee suficientes vitaminas, ácido fólico y magnesio para reducir la incidencia de enfermedades cardíacas. Se cree que sus componentes tienen una función inmunizadora y se piensa que ayuda a prevenir la osteoporosis en las mujeres postmenopáusicas. (Atehortua 2002).

- La espinaca (*Spinacia olerácea*) posee compuestos que cumplen múltiples funciones como la reducción del riesgo de padecer degradación macular que conlleva a una disminución de la visibilidad gracias a que la espinaca contiene

luteína y zeaxantina, dos carotenoides implicados en la prevención de esta degeneración. (Pamplona 2004).

- También contiene vitamina C que ayuda a la asimilación del hierro que se encuentra en esta verdura en una cantidad igual a 2,71 mg. por cada 100 g proporción mayor a la de la carne y es por ello que el zumo de espinaca se recomienda en la anemia ferropenia. Pamplona (2004).
- Mediante estudios en animales de experimentación se ha constatado la efectividad de las proteínas presentes en la espinaca en casos de hipercolesterolemia al dificultar la absorción de colesterol y ácidos biliares. (Pamplona 2004).
- Es recomendable su consumo para madres embarazadas porque contiene ácido fólico, imprescindible para imposibilitar malformaciones genéticas en el feto. También se aconseja a deportistas y adolescentes en fase de crecimiento. (Pamplona 2004).

2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS FIBRAS NATURALES.

El soporte de la constitución química de todas las fibras vegetales es la celulosa, la cual entra en proporciones más o menos grandes y adulteradas con otros compuestos, dando lugar a una serie de fibras que se extienden desde su forma más simple en el algodón, hasta los compuestos de rayón viscosa, cupromoniacal, etc., pasando por las denominadas fibras bastas. Toda esta clase de fibras pueden quedar encuadradas en el mismo grupo en cuanto a su conducta tintórea se refiere, existiendo como es natural diferencias en su comportamiento, que no alteren en modo alguno la base general de la conducta tintórea del conjunto.

La celulosa está formada por una cadena celobiósica y la lana por cadenas proteicas representadas de la siguiente forma.

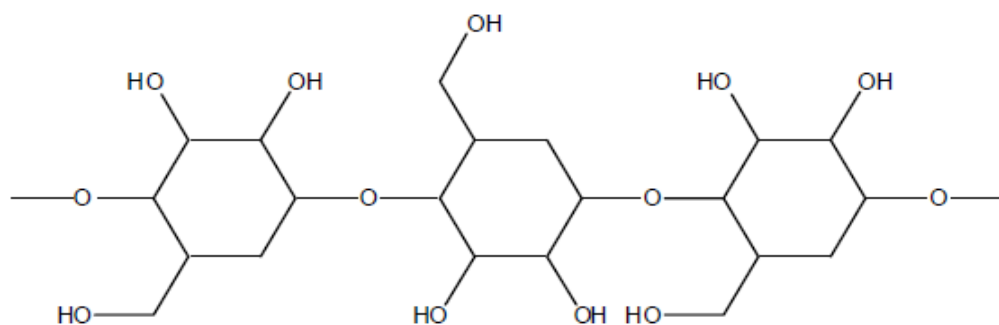


Figura 2. Cadena celobiósica de las fibras celulósicas

Fuente: (Cegarra 1991).

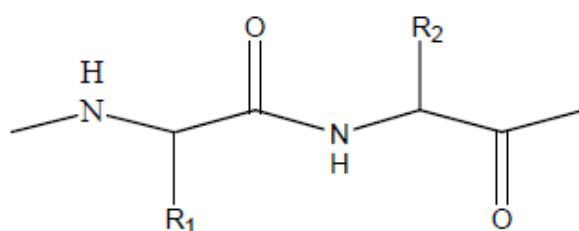


Figura 3. Cadena proteica

Fuente: (Cegarra 1991).

Se puede apreciar que en esta cadena cada grupo posicional, se va repitiendo cada dos unidades. En la estructuración cristalográfica de la celulosa, la distancia entre cada dos grupos aislados es de 10^3 °A, distancia que, tal como se mencionara adelante, influye sobre la afinidad de los colorantes capaces de teñir la celulosa. De la estructura química de la celulosa puede deducirse que es un compuesto hidrofílico, siendo estas características las sobresalientes para dictaminar el comportamiento de los colorantes directos sobre esta fibra.

El comportamiento de los colorantes directos para con la celulosa, viene medido por la denominada afinidad del colorante por la fibra, que es la propiedad que presentan los colorantes de ser adsorbidos por la celulosa y su resistencia a la desorción, cuando la fibra teñida se somete a lavados ulteriores. Cuanto más fácilmente sea adsorbido un colorante directo por la celulosa y mayor resistencia tenga la fibra teñida a eliminar parte del colorante adsorbido en la tintura, mediante un lavado posterior, mayor afinidad presentará el colorante por la fibra. Es natural que ocupando los colorantes directos sobre las fibras celulósicas un

lugar preeminente en la tintura de estas fibras, fuese objeto de preocupación, él porque compuestos de la misma familia química, presentaban en alto grado dicha afinidad y en otros, ésta era mediana o nula. El problema se presentaba pues en el sentido de saber qué condiciones debían reunir las moléculas de los colorantes para que éstos tuviesen una marcada afinidad por la celulosa (Cegarra 1991).

2.3. COLORANTES

Los colorantes para alimentos son un tipo de aditivos que proporcionan color a los alimentos (en su mayoría bebidas). En la actualidad la industria alimentaria emplea los colorantes alimentarios con el objeto de modificar las preferencias del consumidor. (Parra 2004).

2.3.1. Color

Es la parte de energía radiante que percibe el humano a través de las sensaciones visuales generadas por la estimulación de la retina del ojo y que corresponde al intervalo de 400 a 800 nm de longitud de onda. El ojo humano es sensible solo a una pequeña porción del espectro electromagnético, región visible que está comprendida entre los 4000 y 8000 °Å (400 y 800 nm). Cuando la luz blanca está comprendida de todas estas longitudes de onda combinadas cae sobre una superficie que refleja prácticamente toda la luz al ojo, esta sustancia aparecerá blanca. Si la sustancia absorbe prácticamente todas las longitudes de onda de la luz visible, aparecerá negra. Si las longitudes de onda de la luz absorbida por una sustancia caen fuera del campo visible mencionado y si prácticamente ninguna parte de la luz visible se refleja o absorbe, entonces se dice que esa sustancia es incolora. (Klages 1998).

La relación entre el color absorbido y el color complementario se resume en la tabla 3.

Tabla 3. Relación entre la absorción de luz y el color complementario

Longitud de onda	Color Absorbido	Color complementario
400-435	Violeta	Amarillo-verde
435-480	Azul	Amarillo
480-490	Azul-verde	Naranja
490-500	Verde-Azul	Rojo
500-560	Verde	Purpura
560-580	Amarillo-Verde	Violeta
580-595	Amarillo	Azul
595-605	Naranja	Verde-Azul
605-750	Rojo	Azul-verde

Fuente: Klages 1998

2.3.2. Clasificación de los Colorantes**Por su origen:**

- Colorantes orgánicos: procedentes de plantas y animales, tales como la clorofila, carotenos, riboflavina, etc., estos colorantes son extraídos por diversos métodos (fermentación, tostado, etc.).
- Colorantes minerales: tales como lacas, sulfato de cobre, cromato de plomo, etc., que actualmente no son utilizados en alimentación por llevar iones metálicos.
- Colorantes artificiales.

Por su composición:

- Derivados isoprénicos (carotenoides).
- Derivados tetrapirólics (clorofilas).
- Derivados de benzopirano (antocianos y otros flavonoides).

Por su solubilidad:

- Hidrosolubles (solubles en agua).
- Liposolubles (solubles en la grasa).
- Insolubles.

Los colorantes pueden clasificarse atendiendo a sus aplicaciones o por su estructura química. La clasificación química suele determinarse por el núcleo del compuesto. Entre los grupos más importantes de colorantes están los azocolorantes, que incluyen el amarillo mantequilla y el rojo congo; los trifenilmetanos, que incluyen el color magenta y el violeta metilo; las ftaleínas; las azinas, que incluyen el color malva, y las antraquinonas, que incluyen la alizarina.

El índigo es un colorante de tina que se da en la naturaleza en un glucósido cristalino llamado indicán. Otro grupo importante lo constituyen las ftalocianinas, de color azul o verde, con una estructura química semejante a la clorofila. Los azocolorantes son los más empleados.

Una de las clasificaciones más utilizadas es la que los divide en dos grandes grupos según su procedencia:

- Sintéticos o Artificiales.
- Naturales.

2.3.3. Colorantes artificiales

Son colorantes elaborados por el hombre a través de procesos de síntesis química y que no existen por si mismos en la naturaleza. (Secco, 1994).

Dentro de este grupo se encuentra los llamados, “Aditivos colorantes certificables o certificados”, y poseen las características de que cada lote debe ser analizado tanto por el fabricante como por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA). Este proceso de aprobación, conocido como certificación de aditivos

colorantes, resguarda la seguridad, calidad, consistencia y fuerza del aditivo colorante previo a su uso en alimentos. (Estados Unidos, administración de comidas y bebidas, 1993).

Los colorantes artificiales son ampliamente usados debido a que su poder colorante es más intenso que el de los naturales, se requiere cantidades menores para lograr el mismo efecto de color. Además, estos colorantes son más estables, proveen mejor uniformidad de color y se mezclan más fácilmente, resultando en una amplia gama de tonalidades. (Estados Unidos, administración de comidas y bebidas, 1993).

Actualmente estos colorantes tienen como característica el que se absorben muy poco en el intestino, siendo destruidos por la flora bacteriana intestinal. Los restos de colorantes que no son asimilados se eliminan por vía urinaria. A estos compuestos se les acusa de ser capaces de producir reacciones de sensibilidad en las personas alérgicas a la aspirina, aunque esto se ha demostrado solo en algunos casos para tartrazina. (Chile, instituto de estudios salud natural, 2001)

2.3.4. Colorantes naturales

a. Colorantes vegetales

Los colorantes naturales son pigmentos extraídos de fuentes naturales tales como vegetales, minerales, o animales. Según la FDA, “aditivos colorantes exentos de certificación o no certificados”. (Estados Unidos, administración de comidas y bebidas, 1993).

Actualmente, hay un fuerte interés por los colorantes de origen natural. Esto en parte debido a la necesidad de aumentar la gama de colores y debido a que el hecho de ser naturales, son seguros de consumir. (Soukap & Maing, 1997).

Sin embargo, es importante mencionar que ya sea que se defina como natural o artificial, esto no asegura su inocuidad. Ambos tipos de colorante están sujetos a

rígidos procesos de análisis para determinar su seguridad antes de su aprobación para uso en alimentos. (Parra 2004).

b. Pigmentos

Un pigmento es un material que cambia el color de la luz que refleja, como resultado de la absorción selectiva del color. Este proceso físico es diferente a la fluorescencia, la fosforescencia y otras formas de luminiscencia, en las cuales el propio material emite luz. Muchos materiales selectivamente absorben ciertas ondas de luz, dependiendo de su longitud de onda. Los materiales que los seres humanos han elegido y producido para ser utilizados como pigmentos por lo general tienen propiedades especiales que los vuelven ideales para colorear otros materiales. (Martín 2005).

Un pigmento debe tener una alta fuerza teñidora relativa a los materiales que colorea. Además debe ser estable en forma sólida a temperatura ambiente.

Los pigmentos son utilizados para teñir pintura, tinta, plástico, textiles, cosméticos, alimentos y otros productos. Los pigmentos han sido utilizados desde tiempos prehistóricos, y han sido fundamentales en las artes visuales a lo largo de la Historia. Los principales pigmentos naturales utilizados son de origen mineral o biológico. La necesidad de conseguir pigmentos menos costosos dada la escasez de algunos colores, como el azul, propició la aparición de los pigmentos sintéticos.

Los tintes y pigmentos orgánicos más importantes, en orden aproximadamente decrecientes de importancia, pertenecen a las familias químicas azo (- N=N-), carbonilo (-C=O-) incluyendo las antraquinonas, ftalocianina, ion arilcarbonio (Incluyendo los trifenilmetinos), sulfuros, polimetino y nitro.

2.3.5. Importancia de los colorantes naturales frente a los artificiales

Las tendencias actuales indican que la búsqueda de nuevos colorantes va encaminada a la aplicación de pigmentos de origen natural, ya que cada vez más el consumidor se fija en la composición de aquello que forma parte de su alimentación y reclama productos naturales. Existe una tendencia clara de sustituir

los colorantes sintéticos por los de origen natural, pero sin perder las cualidades tecnológicas de los primeros. Por tanto, se tiende hacia una estabilización de los pigmentos naturales por diferentes métodos como pueden ser: tecnología de la suspensión Emulsión Microencapsulación Aglomeración Pero también se pueden controlar los cambios de color de la sustancia colorante si se conoce en profundidad el diagrama de flujo del producto alimentario que se elabora en la industria. Así, se pueden detectar aquellos puntos en los que el pigmento es dañado o alterado y actuar sobre él sabiendo que las principales causas de alteración son la temperatura, la luz, el pH. Las tendencias de aplicación de colorantes de pueden resumir en: conseguir las ventajas que ofrecen los colorantes sintéticos utilizando colorantes naturales, mediante modificaciones de los últimos, y así conseguir: mayor estabilidad, homogeneidad, intensidad de coloración, facilidades de manejo, aprovechando la mayor aceptación de los colorantes que se encuentran en la naturaleza. Una nueva tendencia hacia productos con tonalidades de coloreado más suaves, para una percepción del consumidor como alimentos más naturales. Aplicación de nuevos métodos de búsqueda de colorantes a partir de sustratos naturales como pueden ser hongos o extractos de plantas, vegetales o frutos con gran cantidad de pigmentos vegetales como: antocianos, beta carotenos, betalainas, etc. (Cubero et al., 2002).

2.3.6. Clorofila

La clorofila fue descubierta en 1817 por los químicos franceses Pelletier (1788-1842) y Caventou (1795-1877), que consiguieron aislarla de las hojas de las plantas. Pelletier introdujo los métodos, basados en la utilización de disolventes suaves, que permitieron por primera vez aislar no solo la clorofila, sino sustancias de gran importancia farmacológica como la cafeína, la colchicina o la quinina. (Larkum 2005).

Las clorofilas son un grupo de pigmentos que se encuentran en aquellos organismos eucariontes que poseen cloroplastos (plantas, algas) y en algunos procariontes: bacterias que no poseen cloroplastos (cianobacterias, bacterias verdes y púrpuras), y cuyos pigmentos se encuentran en sistemas de membrana internos: (vesículas, lamelas, cromatóforos), pertenecientes a los

dominios Eubacteria y Eucarya. La estructura de las moléculas de clorofila tiene dos partes: un anillo de porfirina que contiene magnesio y cuya función es absorber luz, y una cadena hidrófoba de fitol cuya función es mantener la clorofila integrada en la membrana fotosintética. Las clorofilas se encuentran en las membranas de los tilacoides, que en las cianobacterias son invaginaciones de la membrana plasmática, y en los plastos de las células eucarióticas son vesículas distribuidas por su interior. Las clorofilas aparecen insertas en la membrana, a las que se anclan por la cadena lateral constituida por un resto de fitol, asociadas a proteínas y otros pigmentos, con los que forman los fotosistemas. (Larkum 2005).

Cada fotosistema contiene alrededor de 200 moléculas de clorofila, además de pigmentos auxiliares, con los que constituye la llamada antena. La antena está formada por conjuntos ordenados de moléculas de clorofila, otros pigmentos y proteínas, que se llaman complejos colectores de la luz. Sólo una molécula de clorofila *a* en cada fotosistema convierte propiamente la energía radiante (luz) en energía química, cuando recibe un fotón con energía suficiente desde las moléculas de la antena, que se la van pasando. Las clorofilas tienen típicamente dos tipos de absorción en el espectro visible, uno en el entorno de la luz azul (400-500 nm de longitud de onda), y otro en la zona roja del espectro (600-700 nm); sin embargo reflejan la parte media del espectro, la más nutrida y correspondiente al color verde (500-600 nm). Esta es la razón por la que las clorofilas tienen color verde y se lo confieren a los organismos, o a aquellos tejidos, que tienen cloroplastos activos en sus células, así como a los paisajes que forman. (Larkum 2005).

La fórmula química de la clorofila es: $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$

2.3.7. Método extracción sólido - líquido

Los métodos en esta categoría son adsorción- desorción, secado y lixiviación. La adsorción comprende el contacto de sólidos con líquidos o gases y la transferencia de masa en la dirección fluido a sólido. La transferencia de masa se efectúa en dirección opuesta con respecto a su operación compañera, la desorción; la combinación es análoga a la absorción-desorción de gases. El secado abarca el contacto gas-sólido, la lixiviación el contacto liquido-sólido; en cada caso, ocurre

la transferencia de masa en la dirección sólido a fluido; por tanto se trata de casos especiales de la deserción.

2.3.8. Lixiviación

La extracción sólido líquido o Lixiviación es una operación de transferencia de masa, donde un disolvente o mezcla de éstos, extraen selectivamente uno o varios solutos que se hallan dentro de una matriz sólida. El proceso completo de extracción suele comprender la recuperación por separado del solvente y del soluto.

Al igual que en la destilación, existen una serie de parámetros físico - químicos, tales como la viscosidad del disolvente, los coeficientes de solubilidad de los solutos, las temperaturas de ebullición, etc. que son de importancia fundamental para el diseño del equipo y el éxito del proceso de extracción.

La extracción sólido-líquido tiene gran importancia en un gran número de procesos industriales, en metalurgia en la extracción de: cobre con ácido sulfúrico, oro con cianuro, entre otros. Muchos productos orgánicos naturales se separan de sus estructuras originales mediante Lixiviación. Por ejemplo el azúcar se separa por Lixiviación de la remolacha con agua caliente; los aceites vegetales se recuperan a partir de semillas, como las de soya y algodón mediante Lixiviación con disolventes orgánicos. El té y el café se preparan mediante técnicas y equipo muy similares a los utilizados en las verdaderas operaciones de Lixiviación. Además, los precipitados químicos con frecuencia se lavan de sus aguas madres adheridas mediante técnicas y equipo muy similares a los utilizados en las verdaderas operaciones de Lixiviación, como en el lavado de licor de sosa cáustica del carbonato de calcio precipitado después de la reacción entre óxido de calcio y carbonato de sodio. (Treybal, Operaciones de Transferencia de Masa, 1988).

2.3.8.1. Lixiviación discontinua

La separación de una mezcla de compuestos sólidos se puede llevar a cabo aprovechando diferencias de solubilidad de los mismos en un determinado disolvente. En el caso favorable de una mezcla de sólidos en la cual uno de los compuestos es soluble en un determinado disolvente (normalmente un disolvente orgánico), mientras que los otros son insolubles, podemos hacer una extracción consistente en añadir este disolvente a la mezcla contenida en un vaso de precipitados o un matraz, en frío o en caliente, agitar o triturar y macerar de ser necesario para finalmente separar por filtración la disolución que contiene el producto extraído y la fracción insoluble que contiene las impurezas.

2.3.8.2. Lixiviación Continua

La extracción sólido-líquido suele ser mucho más eficiente cuando se hace de manera continua con el disolvente de extracción caliente en un sistema cerrado, utilizando una metodología similar a la basada en la maceración con disolvente orgánico, previamente vaporizado en un matraz y condensado en un refrigerante, de la mezcla sólida a extraer contenida dentro de un cartucho o bolsa de celulosa que se coloca en la cámara de extracción. El paso del disolvente orgánico con parte del producto extraído al matraz inicial, permite que el mismo disolvente orgánico vuelva a ser vaporizado, repitiendo un nuevo ciclo de extracción, mientras que el producto extraído, no volátil, se va concentrando en el matraz.

2.3.8.3. Preparación del sólido

El éxito de una lixiviación y la técnica que se va a utilizar dependen con mucha frecuencia de cualquier tratamiento anterior que se le pueda dar al sólido. La trituración y molienda de estos sólidos acelerará bastante la acción de lixiviación, porque las porciones solubles son entonces más accesibles al disolvente.

Los cuerpos vegetales y animales tienen una estructura celular, los productos naturales que se van a lixiviar a partir de estos materiales se encuentran generalmente dentro de las células. Si las paredes celulares permanecen intactas

después de la exposición a un disolvente adecuado, entonces en la acción de lixiviación interviene la ósmosis del soluto a través de las paredes celulares. Éste puede ser un proceso lento. Sin embargo, moler el material lo suficientemente pequeño como para liberar el contenido de las células es poco práctico y algunas veces indeseable.

2.3.9. Extracción con Equipo Soxhlet

El equipo Soxhlet es uno de los más utilizados para la extracción, se aplica a analitos que no se pueden separar por volatilización (en fase gas) pero sí son extraíbles empleando un disolvente orgánico adecuado.

La gran ventaja del Soxhlet es la eficacia en el proceso de remojo de la fase sólida. (Nuñez, 2008).

El esquema del instrumento es sencillo: 1. Un matraz de base redonda que contendrá el disolvente orgánico volátil. 2. Un contenedor intermedio de vidrio en el cual se coloca la muestra dentro de un cartucho que está abierto en su parte superior siendo poroso al disolvente y a la posterior disolución del analito. 3. Refrigerante. El matraz es calentado con una manta calefactora hasta que el disolvente orgánico se evapora, el vapor de disolvente atraviesa el cartucho que contiene la muestra ascendiendo por el contenedor hasta el refrigerante. Cuando el vapor de disolvente llega al refrigerante este condensa y cae en forma líquida de nuevo en dirección al matraz pero, en su camino, este golpea con la muestra disolviéndola (para que esto ocurra la muestra debe estar perfectamente seca y finamente dividida).

El analito disuelto en disolvente orgánico pasa por un sifón el cual, al llenarse y desbordar, descarga sobre el matraz redondo. Cuando el proceso de disolución se da por finalizado se añade una última etapa: la evaporación. El disolvente se evapora por calentamiento concentrando la muestra. (Nuñez, 2008).

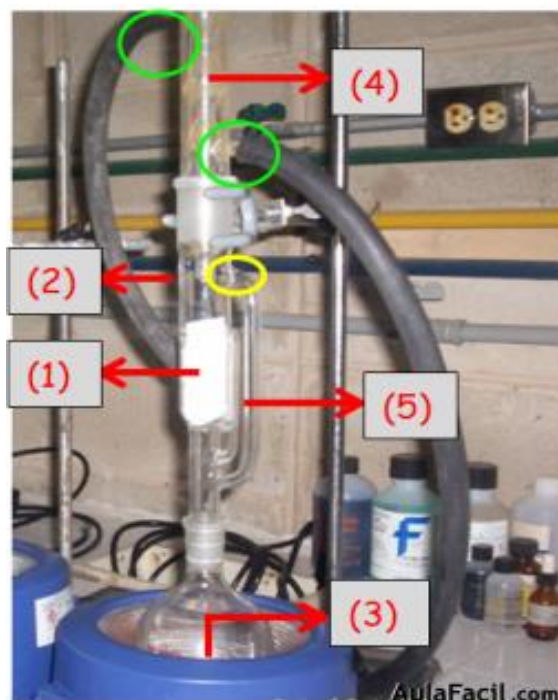


Figura 4. Extracción con Soxhlet en el momento en que se produce el sifonamiento del solvente.

1. Cartucho poroso
2. Soporte Soxhlet
3. Balón de destilación
4. Refrigerante
5. Sifón

2.3.9.1. Ventajas del uso del Extractor Soxhlet

- El disolvente y la muestra están en contacto íntimo y repetido. De manera que se mejora muchísimo la extracción porque siempre se emplea un disolvente limpio.
- El disolvente proviene de una condensación y está caliente. Favoreciendo de manera la solubilidad del analito.
- No se requiere filtración posterior. El disolvente orgánico se evapora quedando sólo analito.
- Gran capacidad de recuperación.
- Instrumentación simple.

2.3.9.2. Desventajas del uso del Extractor Soxhlet.

- Es un proceso extremadamente lento e imposible de acelerar.
- Se requiere gran cantidad de disolvente.
- Inaplicable a analitos termolábiles, que se descompongan con el calor o reaccionen.
- Necesidad de etapa final de evaporación.
- El método no depende de la matriz sólida.

2.3.10. Etanol.

Es un líquido incoloro, fácilmente inflamable, arde con llama azulada pálida. Su solubilidad en el agua es en todas las proporciones, siendo además soluble en diversas sustancias orgánicas e inorgánicas cuando se mezcla en estado anhidro.

El etanol es obtenido mediante la destilación y rectificación de productos provenientes de sustancias fermentables permitidas. La materia prima de la que proviene tiene sabor y olor imperceptible, es por ello que predomina el olor y sabor ardiente característico.

La graduación alcohólica alcanzada durante su destilación no debe ser menor de 96% v/v a 20°C. Presentando un máximo de cogenéricos del orden de 10 miligramos/100 mililitros de alcohol anhidro. (Marín 2012)

En la tabla 4 se puede observar las características generales del etanol.

Tabla 4. Características generales del etanol.

Grado alcohólico a 20°C	96 °
Gravedad específica a 20/20°C	0,8089
Ácidos totales, como ácido acético en m/g - 100 mL/s.	1,80
Aldehídos, como acetaldehídos, en m/g -100 mL/s.	1,00
Esteres, como acetato de etilo, en m/g -100 mL/s.	6,50
Residuo no volátil, en m/g	0,10
Peso molecular	46,0
Punto de ebullición	78,32 °C
Punto de inflamación	12,00 °C
Punto de congelación	- 130, 0 °C
Tensión de vapor a 20°C	44 mmhg
Calor específico a 20°C	0,615 kg-cal.
Calor latente	209,0 kg-cal.

Fuente: Extracción de colorante a partir de la flor de Jamaica (Marín 2012).

2.3.11. Espectrometría

La espectroscopia surgió con el estudio de la interacción entre la radiación y la materia como función de la longitud de onda (λ). La espectrometría es la técnica espectroscópica para tasar la concentración o la cantidad de especies determinadas. En estos casos, el instrumento que realiza tales medidas es un espectrómetro o espectrógrafo.

La espectrometría a menudo se usa en física y química analítica para la identificación de sustancias mediante el espectro emitido o absorbido por las mismas. (<http://www.espectrometria.com/espectrometra-ultravioleta-visible>)

2.3.11.1. Espectrometría ultravioleta-visible

La espectrometría ultravioleta-visible o espectrofotometría UV-Vis implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible. Utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes (el ultravioleta (UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano).

En esta región del espectro electromagnético, las moléculas se someten a transiciones electrónicas.

Esta técnica es complementaria de la espectrometría de fluorescencia, que trata con transiciones desde el estado excitado al estado basal, mientras que la espectrometría de absorción mide transiciones desde el estado basal al estado excitado.

(http://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible)

2.3.11.2. Aplicaciones

La espectrometría UV/Vis se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos muy conjugados.

1. Soluciones de iones metálicos de transición: Las soluciones de iones metálicos de transición pueden ser coloreadas (es decir, absorben la luz visible) debido a que los electrones en los átomos de metal se pueden excitar desde un estado electrónico a otro. El color de las soluciones de iones metálicos se ve muy afectado por la presencia de otras especies, como algunos aniones o ligandos.

2. Compuestos orgánicos: Los compuestos orgánicos, especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, también absorben luz en las regiones del espectro electromagnético visible o ultravioleta. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua para los compuestos solubles en agua, o el etanol para compuestos orgánicos solubles. Los disolventes orgánicos pueden tener una significativa absorción de UV, por lo que no todos los disolventes son adecuados para su uso en espectrometría UV. El etanol absorbe muy débilmente en la mayoría de longitudes de onda. La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar la absorción del espectro de un compuesto orgánico.

Aunque los complejos de transferencia de carga también dan lugar a colores, éstos son a menudo demasiado intensos para ser usados en mediciones cuantitativas.

La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto, la espectrometría UV/VIS puede usarse para determinar la concentración de una solución.

(http://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible)

2.3.11.3. Espectrofotómetro ultravioleta-visible

El instrumento utilizado en la espectrometría ultravioleta-visible se llama espectrofotómetro UV-Vis. Mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra (I), y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra (I₀). La relación I / I₀ se llama transmitancia, y se expresa habitualmente como un porcentaje (%T). La absorbancia (A) se basa en la transmisión:

(http://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible)

$$A = - \log (\%T)$$

Las partes básicas de un espectrofotómetro son una fuente de luz (a menudo una bombilla incandescente para las longitudes de onda visibles, o una lámpara de arco de deuterio en el ultravioleta), un soporte para la muestra, una rejilla de difracción o monocromador para separar las diferentes longitudes de onda de la luz, y un detector.

2.3.11.4. Espectro ultravioleta-visible

Un espectro ultravioleta-visible es esencialmente un gráfico de absorbancia de luz frente a una longitud de onda en el rango del ultravioleta o la luz visible. Este espectro puede ser producido directamente con los espectrofotómetros más sofisticados, o bien pueden registrarse los datos de una sola longitud de onda con los instrumentos más simples. La longitud de onda se representa con el símbolo λ .

Del mismo modo, para una determinada sustancia, puede hacerse un gráfico estándar del coeficiente de extinción (ϵ) frente a la longitud de onda (λ). Este

gráfico estándar sería efectivamente "la concentración corregida" y, por tanto, independiente de la concentración. Para una sustancia determinada, la longitud de onda en la cual se produce el máximo de absorbancia en el espectro se llama λ max, y se pronuncia "lambda-max".

Las reglas de Woodward-Fieser son un conjunto de observaciones empíricas que pueden utilizarse para predecir λ max, la longitud de onda de la absorción UV-Vis, para compuestos orgánicos conjugados como dienos y cetonas.

(http://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

Se ejecutó el presente trabajo de investigación en el Laboratorio de Control de Calidad de Aguas de la Facultad de Ingeniería Química de la UNA – Puno. Está a 3814 m.s.n.m. y la temperatura ambiental aproximada está en 13 a 15 °C respectivamente.

- Las muestras de espinaca (*Spinacia oleracea*) se colectaron del mercado Unión Dignidad de la ciudad de Puno.
- La parte experimental por el método de proceso de extracción sólido-líquido, se realizaron en el laboratorio de Control y Calidad de Aguas de la Facultad de Ingeniería Química – UNA - Puno.

Ubicación:

Provincia : Puno

Departamento : Puno

Dirección : Av. Sesquicentenario N° 1150

3.2. MATERIALES

3.2.1. MATERIAL DE LABORATORIO, EQUIPOS Y REACTIVOS

a) Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitados 250mL, 500mL
- Matraz Erlenmeyer 250mL y 300mL.
- Probetas 100 mL
- Pipetas 5mL
- Papel filtro Whatman N°42
- Tubo de ensayos 5mL
- Luna de reloj
- Embudo de vidrio

b) Equipos

- Balanza analítica (METTLER TOLEDO)
- Espectrofotómetro UV/VIS (UNICO / SQ2802E)
- Potenciómetro (METRO HM /914 PH- contudtimeter)
- Rotavapor (BUCHI / R-3HB)

c) Reactivos e insumos

- Etanol 96 %
- Agua destilada

3.3. MÉTODO EXPERIMENTAL

La investigación fue desarrollada en el laboratorio de control de calidad de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano.

3.3.1. Materia prima

La materia prima que se utilizó en la investigación son las hojas de la espinaca (*Spinacia oleracea*), la cantidad de muestra seleccionada fue de 1 kg, llevándose a cabo 5 pruebas.

3.3.2. Selección y limpieza

La espinaca (*Spinacia oleracea*) fue seleccionada teniendo las siguientes consideraciones, considerando la madurez y que sean de color verde intenso y libre de daños. Esta etapa es de importancia ya que si están marchitos o estén en estado de descomposición pueden afectar en el proceso de obtención del colorante (clorofila).

3.3.3. Acondicionamiento

La espinaca (*Spinacia oleracea*) fue cortada a mano en pequeños pedazos para una mejor área de contacto con el solvente, luego se pesó para cada prueba 10 g y se dejó reposar en alcohol durante 24 horas y 48 horas.

3.3.4 Evaluación físicoquímica de la espinaca (*Spinacia oleracea*).

- Color
- Olor
- Sabor
- Peso

3.4. DESCRIPCIÓN DETALLADA POR OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.4.1. El proceso de extracción de colorante de la espinaca (*Spinacia oleracea*), dando a conocer los parámetros óptimos de concentración del solvente, tiempo y cantidad de materia prima en la tecnología propuesta.

a. Preparación del solvente a diferentes concentraciones.

El solvente empleado para la obtención de la clorofila es el etanol al 96% se preparó soluciones a diferentes concentraciones etanol/agua para determinar la mejor concentración de solvente (anexo A).

b. Pesado de muestra

Se pesan 10 g de espinaca con el fin de evaluar la cantidad de materia prima que se usará en el proceso, luego se trató con 300 mL de alcohol en un vaso de precipitado durante 24 horas (maceración) para extraer la clorofila (ANEXO B).

c. Características organolépticas

Aspecto : Sólido

Color : Verde

Olor : Inodoro

Sabor : Insípido

d. Filtración

Se filtró el extracto obtenido con un papel filtro whatman N°42 y embudo de vidrio. El porcentaje de pigmento retenido (%P.R.) en el papel filtro fue calculado con la siguiente ecuación (Lugo, 1998):

$$\% P. R = \frac{C.P.T_0 - C.P.T_f}{C.P.T_0} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Dónde:

% *P.R.* = porcentaje de pigmento retenido.

C.P.T₀ = concentración del pigmento antes de pasar por el filtro (mg/g).

C.P.T_f = concentración del pigmento después de pasar por el filtro (mg/g).

e. Cuantificación del colorante (clorofila)

Se realizó en un espectrofotómetro UV/VIS (UNICO / SQ2802E), la cuantificación de clorofila (mg/g) con celdas de cuarzo de un centímetro de paso óptico, rangos fotométricos 0,0 – 0,4 absorbancia y longitud de onda 350 a 700nm. La conversión de las unidades de absorbancia en unidades de concentración se utilizó la ecuación descrita por Castellanos & Yahia (2008):

$$B \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{A * Fd * PM * V * 1000}{\epsilon * P * L} \quad \text{Ec. 2}$$

Dónde:

B = Contenido de clorofila.

A = Absorbancia

FD = Factor de dilución.

PM = Peso molecular.

V = Volumen del extracto (L)

ε = Coeficiente de extinción molar 60000 (mol.L/cm) para clorofila

L = Anchura de la cubeta del espectrofotómetro (1cm)

f. Concentración de colorante (clorofila)

Considerando los parámetros óptimos evaluados, se realizó el proceso de extracción de colorante (clorofila) determinando la concentración inicial del colorante por espectrofotometría, posteriormente se puso a concentrar el pigmento en el equipo Rotavapor (BUCHI / R-3HB) con temperatura de ebullición del etanol a 78 °C por 120 min.

Tabla 5. Datos de la curva de calibración para la clorofila

N°	Tiempo (horas)	Peso de muestra (g)	Volumen de solvente (mL)	Concentración del clorofila (mg/mL)	Absorbancia
Blanco				0	0
1	24	10	300	0,1	0,035
2	24	10	300	0,2	0,054
3	24	10	300	0,4	0,082
4	24	10	300	0,8	0,128
5	24	10	300	1,2	0,162

FUENTE: elaboración propia

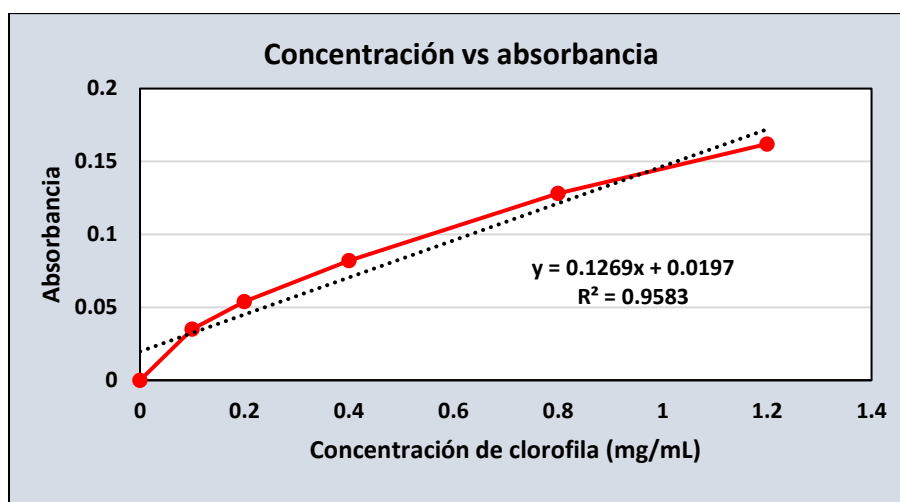


Figura 5. Curva de calibración, línea de tendencia de la clorofila

En la figura 5, se observa la concentración versus absorbancia, donde la curva de color rojo corresponde a la curva de calibración y se ha efectuado la línea de tendencia con el objeto de visualizar la ecuación lineal y el valor del coeficiente de regresión lineal que corresponde a 95,79 %, lo que indica que el proceso de obtención de clorofila es buena.

g. Rendimiento de obtención de colorante (clorofila)

El porcentaje de rendimiento se determinó aplicando la relación siguiente:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left[\frac{W_1 - W_2}{W_1} \right] \times 100$$

Donde:

%R = Rendimiento de extracción de colorante

W_1 = Volumen inicial de la muestra

W_2 = Volumen del colorante extraído

Al final del proceso se obtuvo los porcentajes promedio de la clorofila.

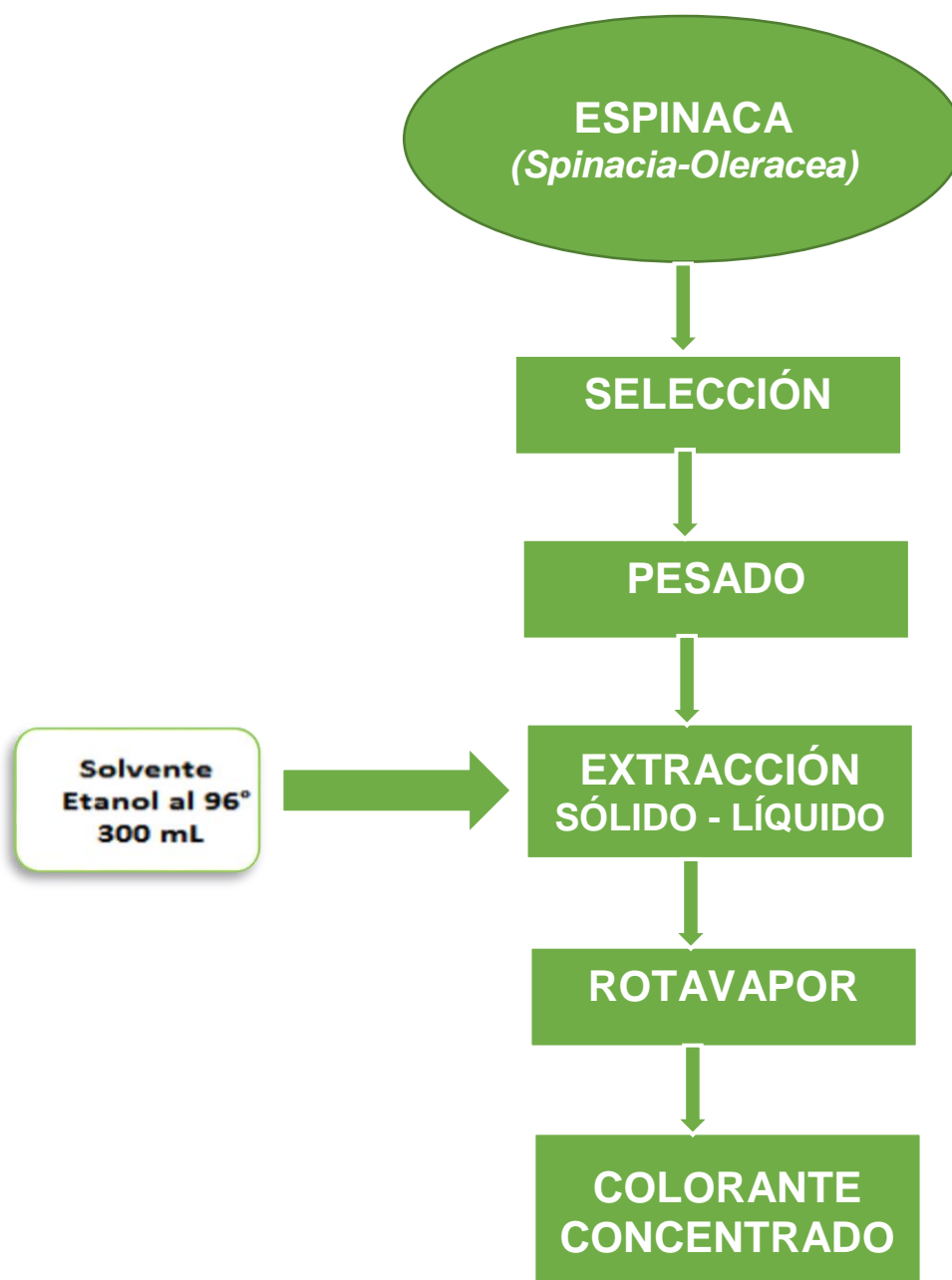


Figura 6.Extracción con Etanol al 96 %

Fuente: elaboración propia

3.4.2. El modelo matemático para el proceso de extracción de colorante de las hojas de la espinaca (*Spinacia olerácea*)

El modelo matemático es una técnica estadística que asume cierta linealidad y permite planificar eficientemente la experimentación de modo que con un número mínimo de ensayos se logre determinar la significancia de cada una de las

variables independientes evaluadas, el efecto de sus interacciones y se obtiene un modelo matemático empírico, que constituye la base para un proceso posterior de optimización.

Para el desarrollo matemático experimental se ha utilizado el programa Statgraphics Centurión XVI.

Para nuestro caso los factores serán optimizados en experimentos factoriales generales, tomándose en cuenta tres factores con dos niveles.

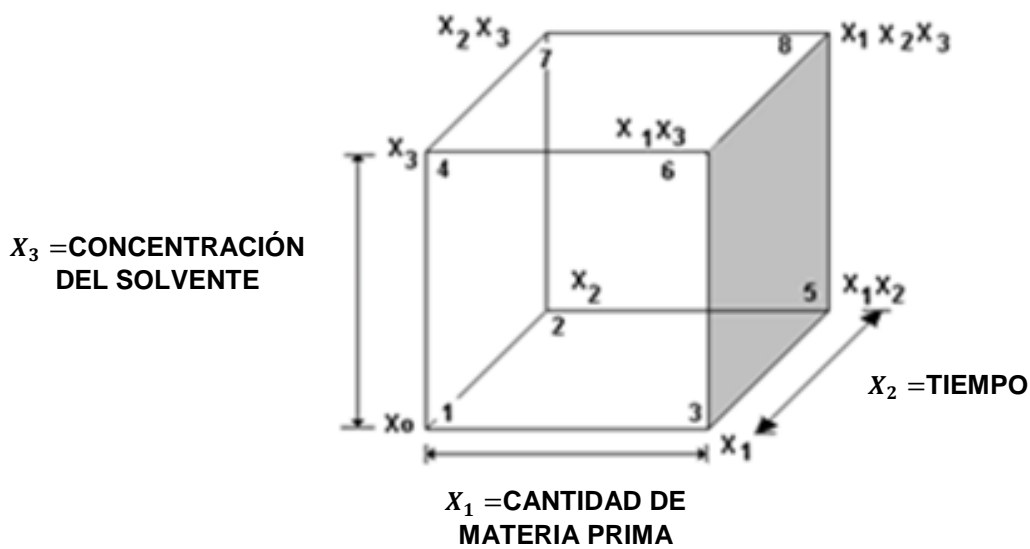


Figura 7. Esquemización del diseño factorial 2^3

Para la determinación de la muestra o número de experimentos, en un diseño factorial completa se da la siguiente ecuación:

$$N = 2^k \quad \text{Ec. = Diseño factorial}$$

Donde:

N = Número total de experimentos

k = Número de variables

En nuestro caso, como hemos mencionado, se realiza un experimento que depende de tres factores y se plantea dos niveles, por lo que se requerirán:

Número de experimentos = $N^k = 2^3 = 8$ experimentos

El modelo factorial asume cierta linealidad y debe predecir adecuadamente todos los puntos de diseño. Por lo que elegimos 3 variables que según muestras pruebas exploratorias intervienen y mejoran la extracción del colorante. Estas variables son: cantidad de materia prima, tiempo y concentración del solvente.

Puesto que se desea determinar el efecto de las tres variables sobre el rendimiento de la extracción de colorante, para ello experimentalmente se realizaron pruebas preliminares para determinar los niveles de cada variable, las que se indican en la siguiente tabla.

Identificación de las variables de trabajo

Se ha efectuado la optimización eficaz del proceso, encontrando los rangos de trabajo más óptimos de dicho proceso, se trabajó en función a los factores y niveles establecidos en la tabla 6:

Tabla 6. Variables naturales-datos del diseño experimental

FACTOR	SÍMBOLO	UNIDAD	NIVEL (-) INFERIOR	NIVEL (+) SUPERIOR
Cantidad de materia prima	X ₁	g	2	10
Tiempo	X ₂	horas	24	48
Concentración del solvente (%)	X ₃	mL	20	96

Fuente: elaboración propia de datos experimentales

La variable respuesta o de salida es la que depende de las variables independientes.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Los parámetros óptimos de concentración del solvente, tiempo y cantidad de materia prima de la tecnología propuesta.

Dando a conocer los resultados obtenidos del colorante a través de tablas y figuras, la interpretación de los mismos basada en el marco teórico y en los antecedentes.

4.1.1.1. Efecto de la concentración del solvente

El solvente utilizado para la extracción de colorante clorofila de la espinaca fue el etanol al 96 %. Con el objeto de evaluar el efecto de la concentración del solvente, se dispuso soluciones de etanol/agua a diferentes concentraciones.

En un vaso de precipitado de 500 mL se colocó 300 mL de solvente, luego se agregó 10 g de espinaca (*Spinacia oleracea*), se agito a 140 rpm y se dejó reposar por 24 horas. Luego se filtra quedando todo el precipitado como residuo en el papel filtro obteniendo la clorofila como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 7. Resultados de la evaluación de concentración del solvente en el proceso de obtención del colorante

N°	Tiempo (h)	Peso de muestra (g)	Volumen de solvente (mL)	Concentración del solvente (%)	Colorante obtenido (mL)
1	24	10	300	20	8
2	24	10	300	40	10
3	24	10	300	60	12
4	24	10	300	80	10
5	24	10	300	96	7

Fuente: elaboración propia

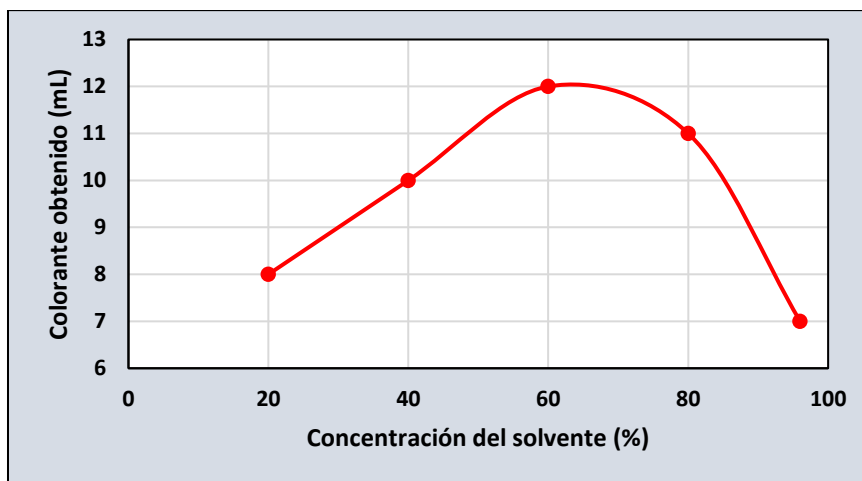


Figura 8. Efecto de la concentración del solvente en el proceso de obtención de clorofila

La figura 8 nos muestra el comportamiento de la concentración del solvente (alcohol), para la obtención de clorofila a partir de la espinaca (*Spinacia oleracea*), obteniéndose un mejor rendimiento con una concentración del 60 %, porque la clorofila es hidrosoluble y al 96 % cambia y se hace menos hidrosoluble.

4.1.1.2. Efecto del tiempo en la extracción sólido – líquido

Tabla 8. Resultados de la evaluación del tiempo en el proceso de obtención del colorante.

N°	Peso de muestra (g)	Volumen de solvente (mL)	Concentración del solvente (%)	Tiempo de extracción (min)	Colorante obtenido (mL)
1	10	300	60	120	8
2	10	300	60	120	10
3	10	300	60	60	12
4	10	300	60	50	10
5	10	300	60	50	7

Fuente: elaboración propia

Se determinó el tiempo de extracción para establecer el tiempo óptimo de contacto. En un vaso de precipitación se puso 10 g de espinaca (*Spinacia oleracea*) con 300 mL de solvente (alcohol de 96 %), posteriormente se colocó en un equipo de agitación constante a 140 rpm.

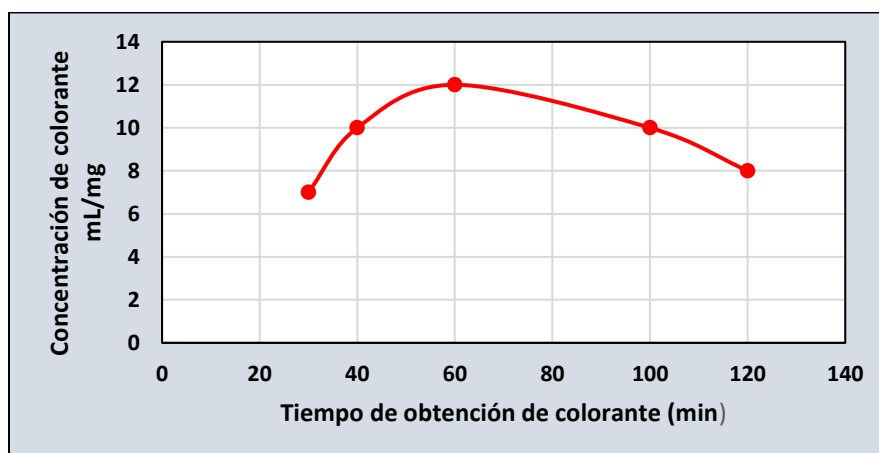


Figura 9. Efecto del tiempo en el proceso de obtención del colorante natural.

La figura 9 nos muestra el efecto de obtención del colorante (clorofila) con el tiempo, se observa que a medida que se incrementa el tiempo se incrementa la cantidad de clorofila hasta los 60 minutos, para luego decrecer en su obtención.

4.1.1.3. Efecto de la cantidad de materia prima

Es una de las variables principales consideradas en esta investigación para la obtención de colorante (clorofila), consiste en la proporción del solvente con relación a la materia prima (espinaca). Para dicho experimento se ha variado la cantidad de muestra y se ha mantenido constante la cantidad de solvente.

Para la determinación de la cantidad de materia prima que se utilizó, se pesó de 2 a 10 g de las hojas de la espinaca (*Spinacia oleracea*), con 300 mL de alcohol al 96% por 24 horas. Colocando en agitación constante a 140 rpm, donde se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados de evaluación de cantidad de materia prima durante el proceso de obtención del clorofila

N°	Tiempo (h)	Volumen de solvente (mL)	Concentración del solvente (%)	Peso de muestra (g)	Colorante obtenido (mL)
1	24	300	60	2	4,3
2	24	300	60	3	6,4
3	24	300	60	4	8,5
4	24	300	60	5	10,1
5	24	300	60	6	11,5
6	24	300	60	7	11,6
7	24	300	60	8	11,8
8	24	300	60	10	12

Fuente: elaboración propia

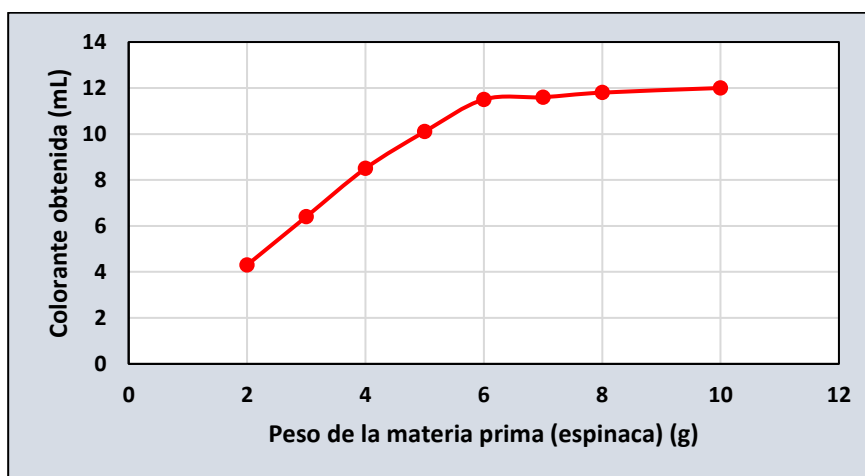


Figura 10. Efecto de la cantidad de espinaca en el proceso de obtención de clorofila

La figura 10 nos muestra la variación del peso de la materia prima (espinaca), que al emplear pesos de 2 a 10 g, hay una variación en la obtención de colorante (clorofila), donde llega a su máxima obtención a los 6g, posteriormente a mayores cantidades la concentración se mantiene constante.

4.1.1.4. Rendimiento de obtención de colorante (clorofila)

Tabla 10. Rendimiento del colorante (clorofila)

No. de prueba	Volumen del colorante obtenido (mL)	% de colorante (Y)	Rendimiento del colorante
1	4,3	1,43	98,57
2	6,4	2,13	97,87
3	8,5	2,83	97,17
4	10,1	3,36	96,64
5	11,5	3,83	96,17
6	11,6	3,86	96,14
7	11,8	3,93	96,07
8	12,0	4,00	96,00

Fuente: elaboración propia

4.1.2. Modelo matemático para el proceso de extracción de colorante de las hojas de la espinaca (*Spinacia oleracea*)

El modelo factorial asume cierta linealidad y debe predecir adecuadamente todos los puntos de diseño, incluyendo el central. Por lo que elegimos 3 variables que según muestras pruebas exploratorias intervienen y mejoran la obtención del colorante obtenido. Estas variables son: cantidad de materia prima, tiempo y Concentración del solvente (%).

Puesto que se desea determinar el efecto de las tres variables sobre el rendimiento de la obtención de colorante (Y), para ello experimentalmente se realizaron pruebas preliminares para determinar los niveles de cada variable, las que se indican en el siguiente cuadro.

Tabla 11. Variables naturales-datos del diseño experimental

SIMBOLO	Variables independientes	Unidad	NIVEL (-) INFERIOR	NIVEL (+) SUPERIOR
X ₁	Cantidad de materia prima	g	2,0	10,0
X ₂	Tiempo	h	24	48
X ₃	Concentración del solvente	%	20	96
	Variable dependiente	Unidad		
Y	Colorante	mL/g		

Fuente: elaboración propia.

Tabla 12. Matriz de diseño factorial 2³ = 8 Para el colorante

N° DE PRUEBA	DISEÑO	COMBINACION DE NIVELES			(RENDIMIENTO %) "Y"
		X₁	X₂	X₃	
1	[1]	2	24	20	1,43
2	a	10	24	20	2,13
3	b	2	48	20	2,83
4	ab	10	48	20	3,36
5	c	2	24	96	3,83
6	ac	10	24	96	3,86
7	bc	2	48	96	3,93
8	abc	10	48	96	4,00

Fuente: elaboración propia.

Determinamos con lo anterior el número de pruebas experimentales a realizar (combinando los valores máximo y mínimo de tres factores establecidos). Para un diseño 2^3 se tiene 8 pruebas experimentales. (Montgomery-1996).

Así se tiene las siguientes combinaciones en el siguiente cuadro

- **Determinación del modelo matemático**

La obtención del colorante se realizó considerando los parámetros óptimos determinados anteriormente por el diseño experimental utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurión XVI, donde se realizó una extracción de las hojas de la espinaca (*Spinacia oleracea*) para 10 g, con un tiempo de 60 minutos y concentración del solvente (alcohol) 60 %, obteniéndose 12 mL de colorante (clorofila), con un rendimiento del 83,78 %.

La concentración del solvente con el tiempo, son los factores que más influyen de cuantos intervienen en el proceso de extracción de colorante.

Con objeto de establecer la influencia que la concentración del solvente ejerce en el proceso de extracción del colorante de las hojas de la espinaca, se efectuó el modelo matemático por experimentación y estadística, Según se observa en el anexo A, la concentración del solvente 60 % conlleva a una mayor obtención de colorante (12 mL) a un tiempo de 60 min y rendimiento de 83,78 %.

La ecuación de regresión generada representa a los datos experimentales que le dieron origen y describe el sistema bajo estudio.

La validez del modelo de regresión matemático queda demostrada por la similitud de los valores hallados por el modelo matemático y los resultados experimentales.

El coeficiente de correlación obtenido fue de $R^2 = 83.7811$ %, nos indica que el proceso de extracción de colorante de la espinaca es correcta y adecuada.

La validez del modelo de regresión matemático queda demostrada por la similitud de los valores hallados por el modelo matemático y los resultados experimentales, los cuales se detallan en los anexos A.

Por consiguiente se concluye que la concentración del solvente, es la variable más significativa en el proceso de extracción de colorante.

La ecuación de regresión generada representa a los datos experimentales que le dieron origen y describe el sistema bajo estudio.

$$Y = 96.7318 - 0.0753125 * \text{Cantidad de materia prima} + 0.0403125 * \text{Tiempo} - 0.0155592 * \text{Concentración del solvente}$$

DISCUSIÓN

Cevallos *et al* (2017). Realizaron el método del cuarteo para determinar cuál de las muestras era la más óptima para el trabajo, esta lo subdividieron en ocho partes durante un periodo de 192 horas, aplicaron la operación unitaria de secado para obtener una humedad de 89%. Luego lavaron la muestra con etanol y cloroformo grado reactivo, donde hicieron una extracción sólido-líquido utilizando etanol al 96% como solvente obteniendo un rendimiento de 10,15%.

Nayhua (2017). En su investigación realizó la evaluación del solvente adecuado para la extracción empleando como disolventes metanol/ agua y etanol/agua, concluyendo que las betalainas tienen mayor solubilidad en metanol. El pigmento lo extrajo de la pulpa del fruto, considero tres variables para su sistema de evaluación concentración del disolvente, temperatura, y tiempo.

Donde su evaluación fisicoquímica que trabajó con una representación promedio de las muestras donde se observó que la cáscara de tuna representa un 46,82% del peso del fruto entero, con un pH igual a 5,39 sólidos solubles 5,02 °Brix y humedad de 85,17%.

Hernández (2016), logró describir la extracción de antocianinas a partir del maíz morado (*Zea mays L.*), resumiendo el proceso en dos etapas:

- Separación de la coronta, molienda, secado en túnel, extracción hidroalcohólica ácida I y II, filtrado, evaporación, adición de encapsulante (CMC), atomización y envasado.
- Mediante el método de pH diferencial determino la concentración total de antocianina.

La importancia de la antocianina como colorante y antioxidante natural, es que representa un potencial en la Industria Alimentaria teniendo aplicaciones en la coloración de bebidas, productos lácteos, productos de panadería y pastelería, mermeladas, frutas en almíbar, etc.

Ordóñez, *et al* (2016). Determinaron mediante valoración sensorial al ser comparado con un producto de similares características encontrado en el mercado; y con la finalidad de definir el tiempo de vida de estante se analizaron propiedades como: color, olor, sabor, textura y pH durante un lapso de tiempo de 21 días. Con los resultados establecieron que el lote 1 (M1) de la salchicha tipo Viena correspondiente a la dosis de 1 ml de colorante de flor de Jamaica / 1,5 kg de masa y el lote 3 (M3) del yogur de mora correspondiente a 6 ml de colorante de la flor de Jamaica/ L de yogur fueron los productos de mayor aceptabilidad por parte de los encuestado.

Galarza (2013). Buscó obtener un colorante aprovechando las flores de Ataco o Sangorache (*Amaranthus sp.*), se utilizó esta parte porque estas forman inflorescencias cuya forma es glomerular y de un intenso color rojo-violeta.

Se probaron dos solventes para la extracción del colorante, metanol y agua, que fue el solvente que dio mejores resultados

Todas las extracciones fueron realizadas a temperatura ambiente del laboratorio, para evitar la desnaturalización de la sustancia que otorga el color.

Los resultados indican que la mayor retención de pigmentos se obtiene cuando el colorante está a pH 5, en refrigeración y expuesto a la luz ambiental; que es la mejor forma de conservar el colorante.

La espectrofotometría fue el método empleado para determinar las concentraciones del colorante

Rivera *et al* (2005). Los valores que obtuvieron con el método fluorométrico oscilaron entre 0,6 y 845,1 mg/m³ y con el método espectrofotométrico entre 0,9 y 4158,8 mg/m³ donde la clorofila presentó un promedio de 30,1 mg/m³ con el método fluorométrico y 66,2 mg/m³ con el método espectrofotométrico. De las 200 muestras incluidas en el análisis, el 76% presentaron registros más altos con el método espectrofotométrico.

Al calcular el porcentaje del número de muestras cuya medición de clorofila por el método espectrofotométrico presenta un valor más alto (sobreestimación) o más bajo (subestimación) que el obtenido por el método fluorométrico.

Paredes (2002). La obtención del colorante se lo realiza mediante la maceración con etanol 96%, durante 48 horas para evitar la descomposición de los principios activos, y se obtiene una concentración del 88%. Es un colorante de carácter ácido.

CONCLUSIONES

- Durante el proceso de extracción de colorante de la espinaca (*Spinacia oleracea*), se utilizó las siguientes variables independientes, concentración del solvente al 96%, tiempo 24 h y materia prima 10 g. Finalmente con ayuda del programa estadístico Statgraphics Centurión XVI se determinó los parámetros óptimos de extracción. En la evaluación del efecto de las variables más influyentes del proceso de extracción de colorante de la espinaca (*Spinacia oleracea*), se logró establecer las siguientes condiciones de trabajo: concentración del solvente 60%, tiempo de extracción sólido- líquido 60 min y 10 g de materia prima. Con estos resultados se concluye que el colorante se encuentra en su rango de estabilidad. El análisis cuantitativo del colorante (clorofila) se realizó con un espectrofotómetro UV/VIS a las longitudes de onda 673 nm. Lográndose determinar la concentración máxima de 12 mL de clorofila en 10 g de hojas de espinaca, con un rendimiento de extracción de $R^2 = 83,78 \%$, con estos resultados se concluye que la clorofila se encuentran en su rango de estabilidad.
- El modelo matemático del coeficiente de correlación obtenido fue de $R^2 = 83,78 \%$, lo cual nos indica que el proceso de extracción de colorante de la espinaca (*Spinacia oleracea*) es correcta y la más adecuada, obteniéndose el siguiente modelo matemático.

$$Y = 96,7318 - 0,0753125 * \text{Cantidad de materia prima} + 0,0403125 * \text{Tiempo} - 0,0155592 * \text{Concentración del solvente}$$

RECOMENDACIONES

- Durante el proceso de concentración del colorante espinaca (*Spinacia oleracea*) extraído, es importante procurar guardar en frascos de vidrio de color caramelo y protegerse de la luz, porque con él, se decoloran y fácilmente se oxidan debido a su carácter fuertemente no saturado, pero esta oxidación disminuye cuando el colorante se encuentra en solución oleosa. También es recomendable una agitación frecuente con la finalidad de obtener mayor tiempo de contacto entre la materia orgánica y el solvente de extracción del pigmento colorante, durante la recolección y transporte de la materia orgánica debe evitarse que se dañen las hojas, lo cual provocaría la alteración y deterioro del pigmento clorofila presente.
- Se recomienda realizar experimentaciones con modelos matemáticos de extracción sólido – líquido en proceso continuo de otros pigmentos colorantes naturales en función al análisis numérico y práctico que se da alcance en este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atehortua, L.; Jaramillo, J. (2002) El Poder de los vegetales., Bogotá –Colombia. Produmedios. 60 p

Borrego, M. (1995). Horticultura Herbácea Especial. Segunda Edición. Mundi Prensa. Madrid España. pp. 255-258.

Cevallos S.J y Guerrero C. J. (2017), “*Extracción y caracterización de colorante natural a partir de la borra de café*”. (Tesis pregrado) Universidad de Guayaquil, Ecuador.

Cubero N., Monferrer, A. Y Villalta, J. (2002) Aditivos Alimentarios. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. 21-23, 48-49.

Elias S. J. y Gamero C. D. (1988). “*Obtención de colorante a partir del maíz morado*”. (Tesis pregrado). Universidad Nacional de Ingenierías, Lima-Perú.

Eroski. (1999). Espinaca, Guía de Hortalizas y verduras. (En línea). Disponible en: <http://www.consumer.es>

Galarza Medina, Carolina H. (2013). Obtención de un colorante a partir de las flores de ataco o sangorache (*amaranthus sp.*), para la obtención del título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Giacconi, V y Escaff, M. (1998). Cultivo de Hortalizas. 15a ed. Santiago. Editorial Universitaria. p. 336.

Gorini, F. (1999). El cultivo de la espinaca. Zaragoza, ES. Acribia. pp. 12 -14; 41-42; 51-53

Hernández Linares, Vilmer M. (2016), Extracción de antocianina a partir de maíz Morado (*Zea mays L.*) Para ser utilizado como Antioxidante y colorante en la

industria Alimentaria, Tesis para optar título profesional de ingeniero en industrias alimentarias. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Klages F. (1998). Tratado de química orgánica. Tomo III. Ed. Reverte S.A. Barcelona.

Krarup, C. y Moreira, I. (1998). Hortalizas de estación fría. Biología y diversidad cultural. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Santiago. pp. 130–133.

Larkum, Anthony WD, and Michael Köhl. (2005). Chlorophyll d: the puzzle resolved. Trends in plant science 10.8: 355-357.

Marín Castillo S. Mejía Castillo C. (2012). Trabajo de diploma para optar al título de: Ingeniero Químico. Managua, Nicaragua

Nayhua Yana C.M (2017). “*obtención de colorante natural a partir de la cáscara de tuna púrpura (opuntia ficus-indica) por el método de extracción sólido-líquido para su aplicación en la industria de alimentos, fruto proveniente del distrito de San Cristóbal-Moquegua*”. (Tesis pregrado). Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú.

Ordóñez Z. I. B. y Saavedra R. R. B. (2016). “*Extracción y uso del colorante natural de la flor de jamaica (hibiscus sabdariffa) como alternativa para la elaboración de salchicha y yogur*” (Tesis pregrado). Universidad de Cuenca, Ecuador.

Paredes Martínez, Benigna Irene (2002). Análisis y obtención de colorante natural a partir de la Chilca (*Baccharis latifolia*), Tesis para la obtención del Título de Ingeniero Textil. Universidad Técnica del Norte. Ecuador.

Pamplona, Jorge. (2004). El poder medicinal de los alimentos., Buenos Aires – Argentina. ACES. 264 – 267.

Pamplona, Jorge. (2004) Placer y salud en su mesa., Buenos Aires – Argentina.
ACES. 46 – 47

Parra Ortega, (2004) estudio comparativo del uso de colorantes naturales y sintéticos, desde el punto de vista funcional y toxicológico.

Rivera C. Zapata A. Pinilla G. Donato J. Chaparro B. Jiménez P. (2005),
Comparación de la estimación de la clorofila-a mediante los métodos
espectrofotométrico y fluorométrico. Colombia

Secco, A. (1994). Colorantes Sintéticos y Naturales para Uso en Alimentos.
Alimentos.

Sighthings. (2004). EU prepares to ban clothes: Dyes Due To Cancer Risk

Soukap & Maing (1997). Aspectos de comidas coloreadas.

Valadez López Artemio (1999). Producción de Hortalizas, Noriega Editores
Editorial Limusa, pg. 19- 134.

ANEXOS

ANEXO A: Análisis estadístico para la investigación

ANEXO B: Panel fotográfico del proceso de obtención del colorante

ANEXO C: Certificado de laboratorio, constancia y memorandu

ANEXO A: Análisis estadístico para la investigación

Efectos estimados para Y

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	96,8287	0,180654	
A:Cantidad de materia prima	-0,6025	0,361308	1,0
B:Tiempo	0,9675	0,361308	1,0
C:Concentración del solvente	-1,1825	0,361308	1,0

Errores estándar basados en el error total

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1.0.

Análisis de Varianza para Y

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Cantidad de materia prima	0,726012	1	0,726012	2,78	0,1707
B:Tiempo	1,87211	1	1,87211	7,17	0,0554
C:Concentración del solvente	2,79661	1	2,79661	10,71	0,0307
Error total	1,04435	4	0,261088		
Total (corr.)	6,43909	7			

R-cuadrada = 83,7811 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 71,6169 porciento

Error estándar del est. = 0,510967

Error absoluto medio = 0,31625

Estadístico Durbin-Watson = 2,15596 (P=0,5143)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,110086

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Y en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 1 efectos tienen un valor-P menor que 0,05 indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 83,7811% de la variabilidad en Y. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 71,6169%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0,510967. El error medio absoluto (MAE) de 0,31625 es el valor promedio de los residuos.

Coefficiente de regresión para Y

Coefficiente	Estimado
constante	96,7318
A:Cantidad de materia prima	-0,0753125
B:Tiempo	0,0403125
C:Concentración del solvente	-0,0155592

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es:

$$Y = 96,7318 - 0,0753125 * \text{Cantidad de materia prima} + 0,0403125 * \text{Tiempo} - 0,0155592 * \text{Concentración del solvente}$$

Resultados Estimados para Y

	Observados	Ajustados	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
<i>Fila</i>	<i>Valores</i>	<i>Valores</i>	<i>para Media</i>	<i>para Media</i>
1	97,17	97,2375	96,2343	98,2407
2	96,07	96,635	95,6318	97,6382
3	98,57	98,205	97,2018	99,2082
4	97,87	97,6025	96,5993	98,6057
5	96,14	96,055	95,0518	97,0582
6	96,0	95,4525	94,4493	96,4557
7	96,64	97,0225	96,0193	98,0257
8	96,17	96,42	95,4168	97, 232

Esta tabla contiene información acerca de los valores de Y generados usando el modelo ajustado. La tabla incluye:

- (1) los valores observados de Y (si alguno)
- (2) el valor predicho de Y usando el modelo ajustado
- (3) intervalos de confianza del 95,0% para la respuesta media

Cada ítem corresponde a los valores de los factores experimentales en una fila específica de su archivo de datos. Para generar pronósticos para las combinaciones adiciones de los factores, agregue filas al final su archivo de datos. En cada nueva fila, introduzca valores para los factores experimentales pero deje vacía la celda para la respuesta. Cuando regrese a esta ventana, se habrán agregado pronósticos a la tabla para las nuevas filas pero el modelo no se verá afectado.

Camino de Máximo Ascenso para Y

			Predicción para Y
Cantidad de materia prima	Tiempo	Concentración del solvente	
6,0	36,0	58,0	96,8287
7,0	31,1826	76,6452	96, 691
8,0	26,3651	95,2905	95,7095
9,0	21,5477	113,936	95,1499
10,0	16,7303	132,581	94,5903
11,0	11,9129	151,226	94,0306

Esta ventana despliega el trayecto de máximo ascenso (o descenso). Este es el trayecto, desde el centro de la región experimental actual, a través del cual la respuesta estimada

cambia más rápidamente con un cambio menor en los factores experimentales. Indica buenas características para ejecutar

Optimizar Respuesta

Meta: maximizar Y

Valor óptimo = 98,205

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Cantidad de materia prima	2,0	10,0	2,0
Tiempo	24,0	48,0	48,0
Concentración del solvente	20,0	96,0	20,0

Esta tabla muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza Y sobre la región indicada.

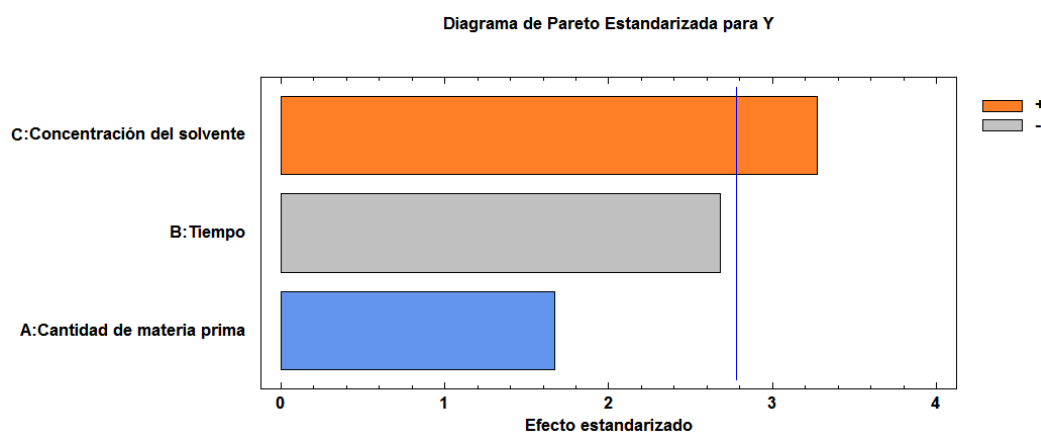


Figura 11. Pareto estandarizado para Y

Esta figura ha sido elaborada en base a los datos de la tabla 14, la cual muestra cada uno de los efectos estimados e interacciones, entre las variables, concentración del solvente, tiempo y cantidad de materia prima, la más significativa para la variables respuesta es la concentración del solvente, cualquier cambio en ésta afecta a la variable respuesta Y en mayor grado.

La línea azul indica el margen sobre el que varía el sistema

Los colores indican cuan representativos son las variables y sus combinaciones.

No hay indicios de correlación de serie en los residuos

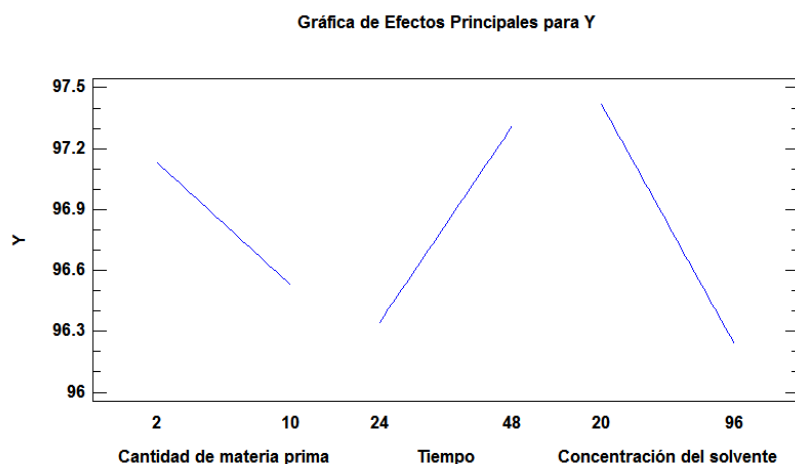


Figura 12. Efectos principales para Y

En la figura 13 se puede visualizar que no existe interacción entre los factores, por lo que estas variables son independientes lo que corresponde a la superficie respuesta, nos indica que la pendiente correspondiente a las variables que son negativas corresponde a la cantidad de materia prima y concentración del solvente, en cambio el tiempo su pendiente es positiva.

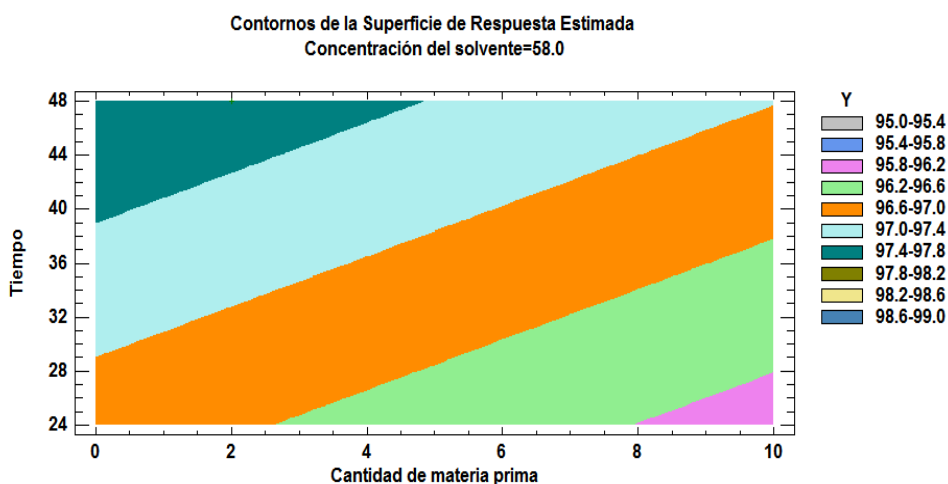


Figura 13. Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada

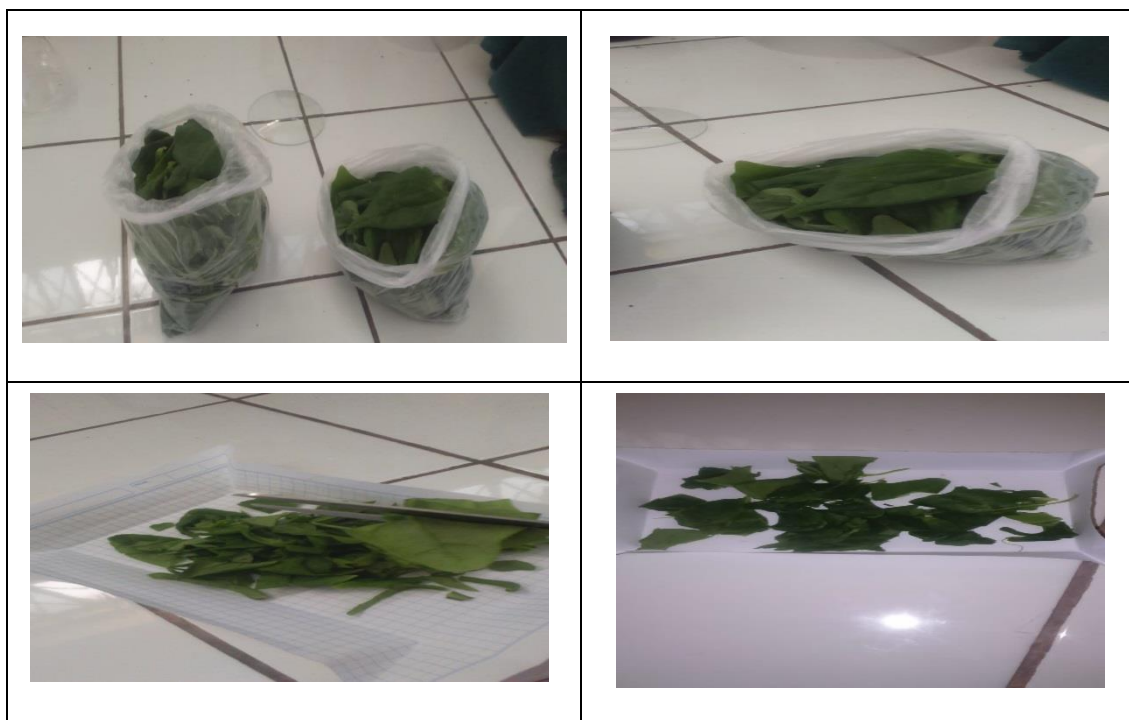
Visualizando el grafico (isolineas), podemos interpretar lo siguiente: El valor óptimo para la concentración del solvente es 58 y que está a un tiempo de 48 h y la cantidad de materia prima 2 g.

Esta ventana muestra la ruta ascendente. Este Indica localizaciones buenas para ejecutar experimentos adicionales si su objetivo es aumentar o disminuir el Rendimiento.

Como en el caso de la obtención de colorante, la mejor respuesta o rendimiento está indicado con el color plomo con valores de 98,6-99 %.

ANEXO B: Panel fotográfico del proceso de obtención del colorante

SELECCIÓN DE MATERIA PRIMA



PESADO DE LA MUESTRA





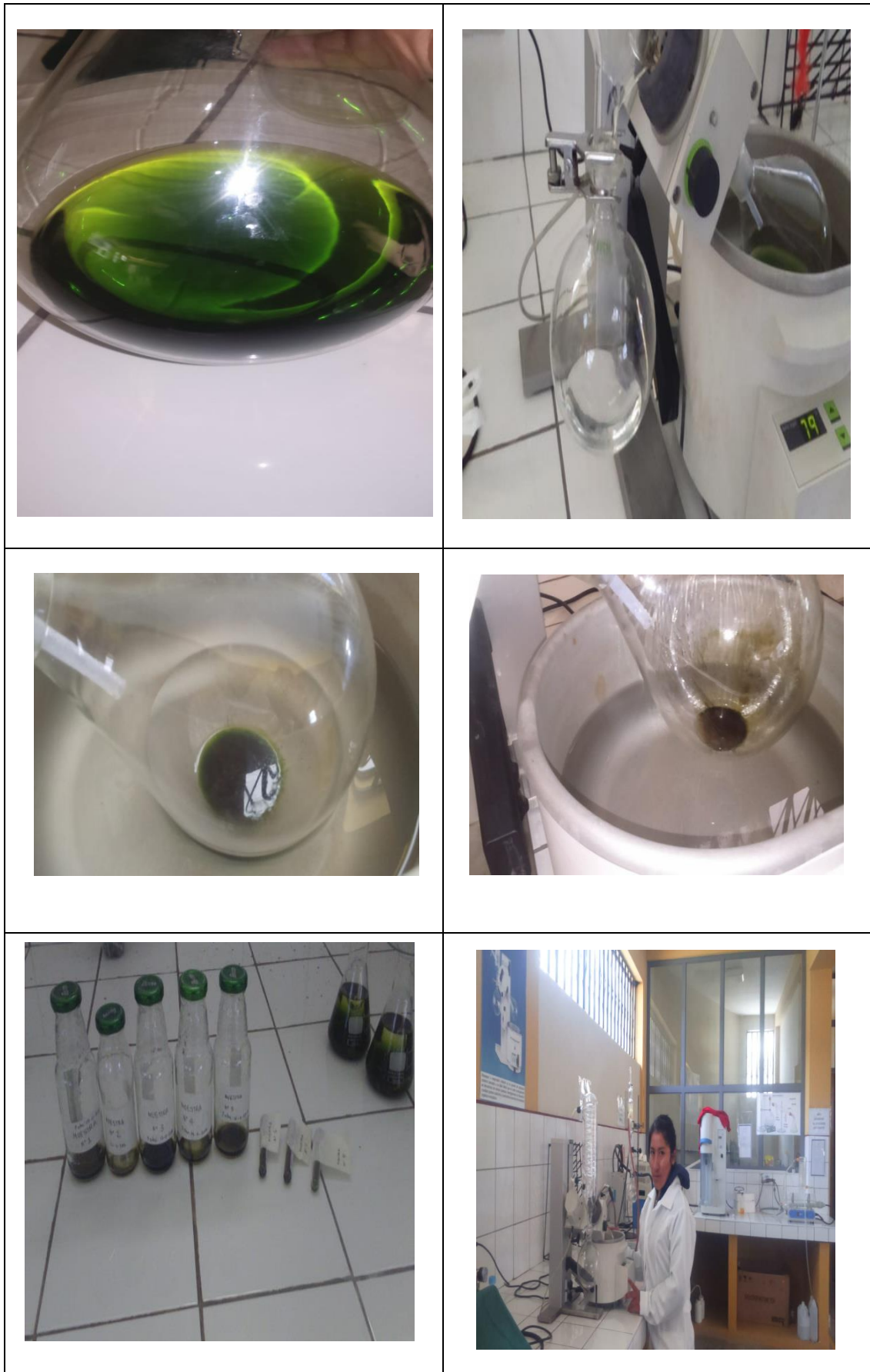
PREPARACIÓN DEL SOLVENTE MÁS MATERIA PRIMA



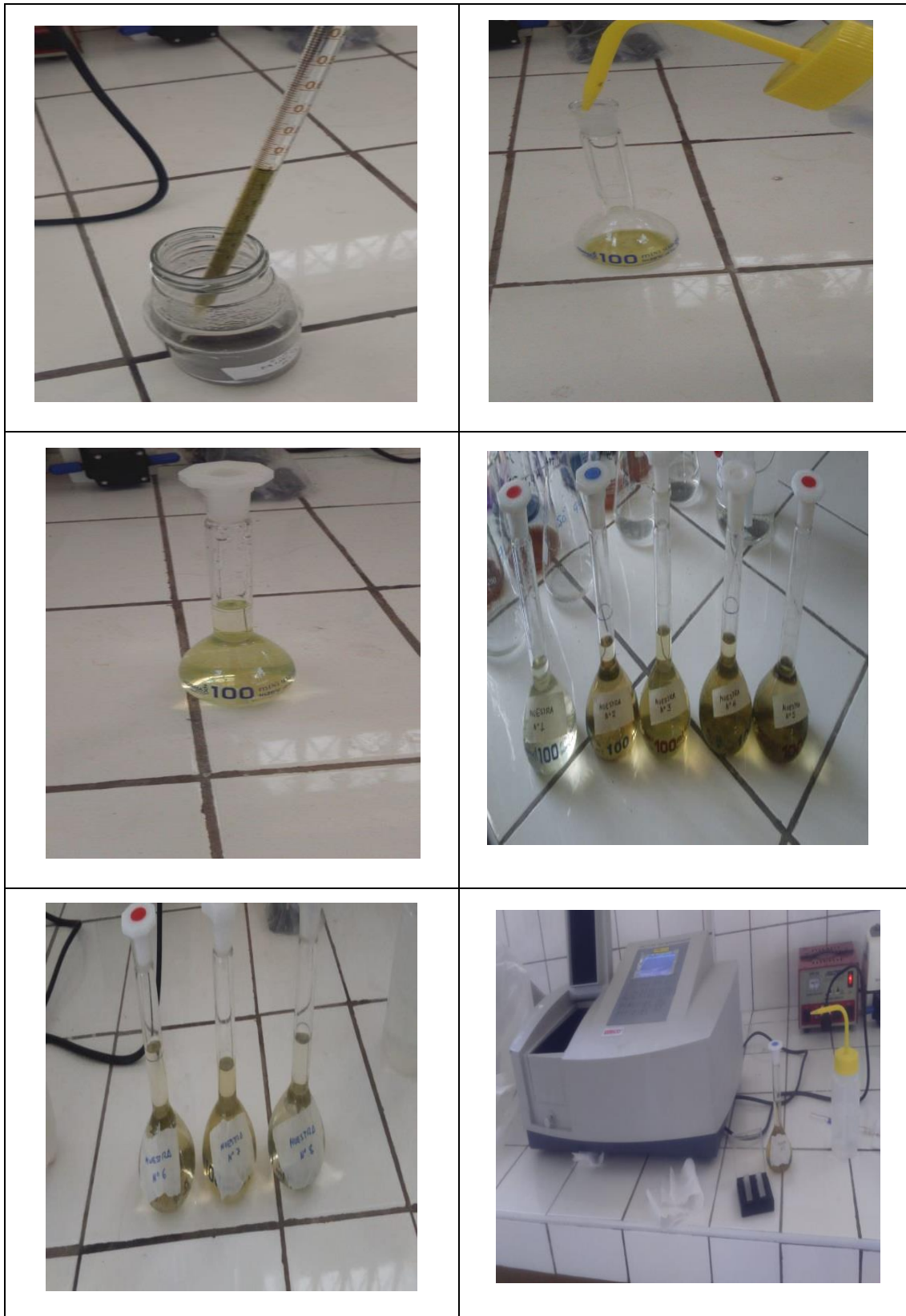
FILTRACIÓN



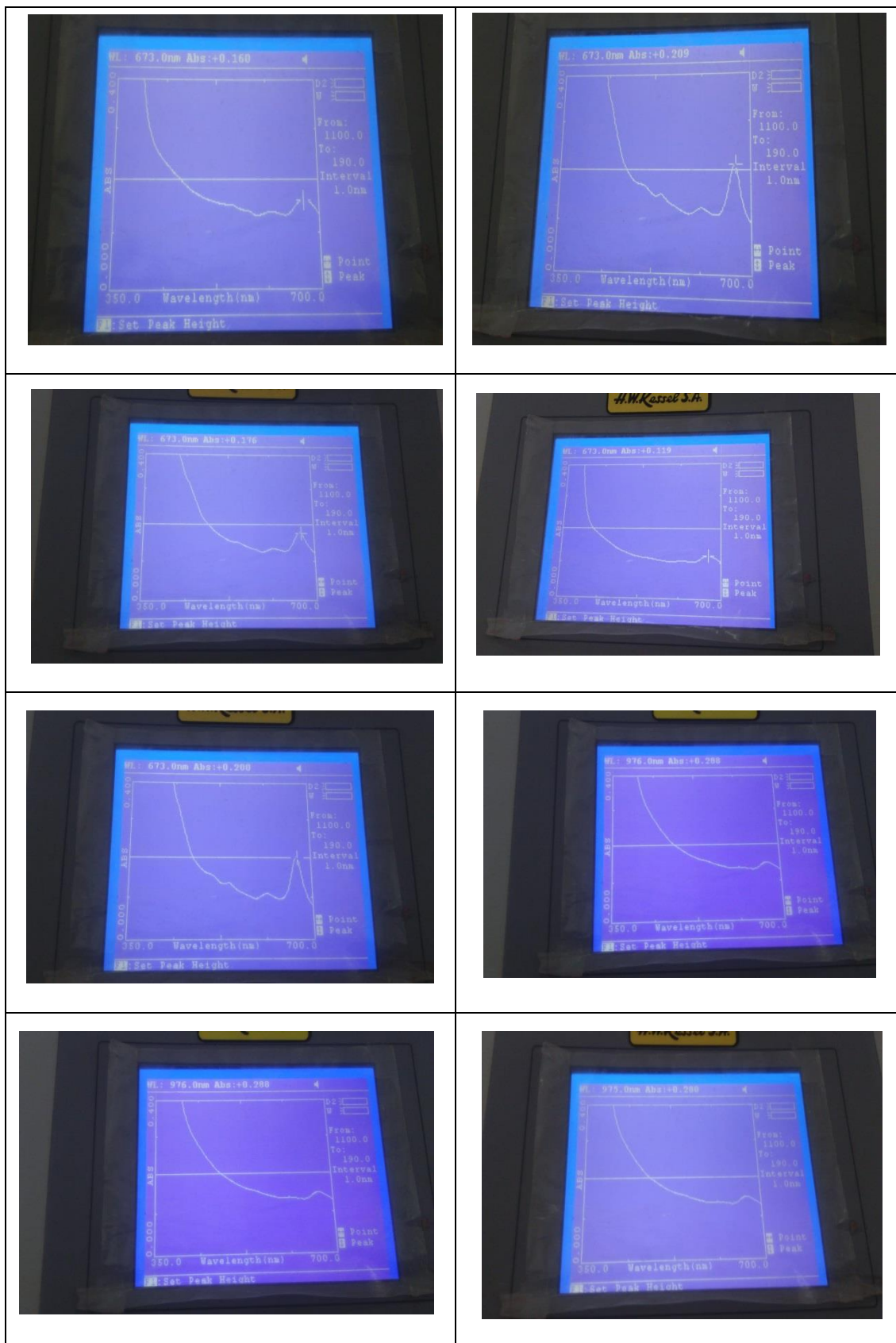
EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO EN EL EQUIPO ROTAVAPOR



CUANTIFICACIÓN EN EL ESPECTROFOTÓMETRO



RESULTADOS DE LECTURA DE ABSORBANCIA EN EL EQUIPO DE ESPECTROFOTÓMETRO





Universidad Nacional del Altiplano - Puno
 FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
 LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD



LQ-2018

N° 0630

Certificado de Análisis

ASUNTO : Análisis Físico Químico de ESPINACA
PROCEDENCIA : MERCADO UNION DIGNIDAD, DISTRITO DE PUNO
PROYECTO : " EXTRACCION DE COLORANTE A PARTIR DE LAS HOJAS DE ESPINACA (*Spinacia oleracea*)"
INTERESADO : ADELAYDA BEATRIZ HAÑARI ZAPANA
MOTIVO : PROYECTO DE TESIS
MUESTREO : 06/11/2018, por el interesado
ANÁLISIS : 21/11/2018

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS:

ASPECTO : Solido
COLOR : verde
OLOR : Inodoro

CUADRO RESUMEN - RESULTADOS DE TESIS DE OBTENCION DE COLORANTE APARTIR DE LAS HOJAS DE ESPINACA

N°	Tiempo (horas)	Peso de muestra (g)	Volumen de solvente (mL)	Concentración del solvente (%)	Colorante obtenido (mL)	Concentración de la clorofila (mg/mL)	Absorbancia
1	24	10	300	20	8	0.1	0.035
2	24	10	300	40	10	0.2	0.054
3	24	10	300	60	12	0.4	0.082
4	24	10	300	80	10	0.8	0.128
5	24	10	300	96	7	1.2	0.162

INTERPRETACIÓN

1.- La parte experimental por el método de proceso de extracción solido - líquido, se realizó con el equipo Rotavapor (BUCHI/R-3HB) y el equipo espectrofotómetro UV/VIS (UNICO/SQ2802E). los resultados obtenidos en el laboratorio los cálculos se encuentran en la tesis de investigación mencionada.

Puno, C.U. 21 de diciembre del 2018.



Edith Tello Palma
 Edith Tello Palma
 DECANA
 FACULTAD ING. QUÍMICA
 UNA - PUNO



José Miguel Castillo Prado
 José Miguel Castillo Prado
 Coordinador, Laboratorio Control de Calidad
 FACULTAD INGENIERIA QUIMICA
 UNA-PUNO

Luz Marina Teves Ponce
 ING. LUZ MARINA TEVES PONCE
 ANALISTA DE LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD
 FIQ - UNA - CIP - 182393



Universidad Nacional del Altiplano
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD



CONSTANCIA

Por medio de la presente hago constar que la Bachiller Srta., **ADELAYDA BEATRIZ HAÑARI ZAPANA**, trabajo su proyecto de tesis “**EXTRACCIÓN DE COLORANTE A PARTIR DE LAS HOJAS DE LA ESPINACA (*Spinacia oleracea*)**” en el Laboratorio de control de calidad de aguas de la Facultad de Ingeniería Química de la UNA- Puno.

Durante la ejecución de su proyecto de investigación de tesis, realizó sus pruebas respectivas así obteniendo sus resultados. Según su cronograma establecido con el Memorando N° 216-2018-D-FIQ-UNA-P.

Se le expide el presente a petición de la interesada, para los fines convenientes.

Puno, 14 de diciembre 2018

Atentamente


M.Sc. José Miguel Castillo Prado
Coordinador, Laboratorio Control de Calidad
FACULTAD INGENIERIA QUIMICA
UNA-PUNO



Universidad Nacional del Altiplano - Puno

Facultad de Ingeniería Química

MEMORANDO. N° 216-2018-D-FIQ-UNA-P.

PARA : **M.Sc José Miguel Castillo Prado**
Jefe de Laboratorio de Control de Calidad

ASUNTO : Solicita brindar facilidades

FECHA : Puno, C.U. 09 de Noviembre de 2018

Por intermedio del presente, comunico a usted, que en atención a la solicitud presentada por la Bachiller Srta. **ADELAYDA BEATRIZ HAÑARI ZAPANA**

Solicito a usted, brindarle las facilidades del caso, en el uso del Laboratorio de Control de calidad, para realizar el trabajo de investigación " **EXTRACCIÓN DE COLORANTE A PARTIR DE LAS HOJAS DE LA ESPINACA**", para que pueda realizar el estudio de investigación de la mencionada tesis.

Atentamente,



Edith Tello Palma
DECANA
FACULTAD ING. QUIMICA
UNA - PUNO

C.c
Interesada
Archivo 18
ETP/rva