

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**“CONDICIONES FAVORABLES PARA LA  
OBTENCIÓN DE CLOROFILA A PARTIR DE LAS  
HOJAS DE REMOLACHA (Beta Vulgaris L.)  
MEDIANTE EQUIPO SOXHLET MODIFICADO”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO QUÍMICO**

**LIZ DEYSI HUINCHO ESPESA  
JONATHAN EDUARDO QUIROZ JULCA**

Callao, Diciembre, 2017

PERU

INFORME N° 10-2018-OJRT-FIQ

A : Ing. Luis Américo Carrasco Venegas  
Decano

DE : Ing. Oscar Juan Rodríguez Taranco  
Presidente de Jurado

ASUNTO : Informe para el empastado de la tesis  
BACH. HUINCHO ESPESA, LIZ DEYSI  
BACH. QUIROZ JULCA, JONATHAN EDUARDO

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO  
FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA  
Secretaría de Decanato

FECHA: 21 FEB 2018

HORA:

RECIBIDO

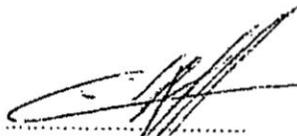
11:00 am

FECHA : Febrero. 20 del 2018

S.D.

Luego de haber sustentado los tesis, BACH. HUINCHO ESPESA, LIZ DEYSI y BACH. QUIROZ JULCA, JONATHAN EDUARDO; en el Programa del Tercer Ciclo Taller de Tesis para Optar el Título Profesional de Ingeniero Químico; la tesis, titulada: "CONDICIONES FAVORABLES PARA LA OBTENCIÓN DE CLOROFILA A PARTIR DE LAS HOJAS DE REMOLACHA (Beta Vulgaris L.) MEDIANTE EQUIPO SOXHLET MODIFICADO"; y habiendo realizado las correcciones de las observaciones colegiadas del jurado; se autoriza el empaste de la tesis.

Atentamente,



Ing. Oscar Juan Rodríguez Taranco  
Presidente de Jurado

## **DEDICATORIA**

Dedicamos nuestra tesis a nuestros  
padres y familiares que nos dieron su  
apoyo incondicional y creyeron en  
nosotros desde que este camino inició  
y con su aliento constante nos  
enseñaron a creer en nosotros mismos  
y poder superar cualquier obstáculo.

## INDICE

<b>TABLAS DE CONTENIDO .....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>8</b>
1.1 Identificación del problema .....	8
1.2 Formulación de problema .....	9
1.3 Objetivos de la investigación .....	10
1.4 Justificación .....	11
1.5 Importancia .....	12
<b>II. MARCO TEORICO.....</b>	<b>13</b>
2.1 Antecedentes del estudio .....	13
2.2 Marco Conceptual .....	17
2.2.1 Remolacha.....	17
2.2.2 Hojas de Remolacha.....	22
2.2.3 Clorofila.....	24
2.2.4 Extracción Solido - Liquido .....	32
2.2.5 Variables del proceso de extracción .....	34
2.2.5.1 Estado de división .....	34
2.2.5.2 Temperatura .....	34

2.2.5.3 PH.....	35
2.2.5.4 Naturaleza del solvente .....	35
2.2.5.5 Tiempo de extracción.....	35
2.2.6 Método de extracción con SOXHLET .....	36
2.2.7 Solvente – Etanol.....	40
2.3 Definición de términos .....	44
<b>III. VARIABLES E HIPÓTESIS .....</b>	<b>45</b>
3.1 Variables de la investigación .....	45
3.2 Operacionalización de variables .....	46
3.3 Hipótesis General.....	47
3.4 Hipótesis Específicas .....	47
<b>IV. METODOLOGIA.....</b>	<b>48</b>
4.1 Tipo de investigación.....	48
4.1.1 Por su finalidad .....	48
4.1.2 Por su diseño interpretativo .....	48
4.1.3 Por el énfasis de la naturaleza de los datos manejados .....	48
4.2 Diseño de la investigación.....	48
4.3 Población y muestra.....	52
4.3.1 Muestra experimental .....	52
4.4 Técnicas e Instrumentos de recolección de datos.....	52
4.5 Procedimientos de recolección de datos .....	53
4.5.1 De la materia prima.....	53
4.5.2 Análisis fisicoquímico de la materia prima .....	55

4.5.3	Montaje del equipo.....	55
4.5.4	Puesta en marcha y condiciones de operación .....	57
4.5.5	Caracterización del producto obtenido.....	59
4.6	Procesamiento y análisis de datos .....	60
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
5.1	Resultado final.....	62
5.2	Resultados parciales .....	63
5.2.1	Características Físico-Químico de las hojas de remolacha .	64
5.2.2	Variables del proceso para la extracción .....	65
5.2.3	Características físicas y químicas de la Clorofila extraída ..	65
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>VIII.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>IX.</b>	<b>REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....</b>	<b>74</b>
<b>X.</b>	<b>ANEXOS</b>	
1.	Matriz de Consistencia .....	85
2.	Informe de Ensayos fisicoquímicos a la hoja de Remolacha ....	87
3.	Informe de Ensayos Fisicoquímicos a la clorofila.....	88

## TABLAS DE CONTENIDO

### INDICE DE TABLAS

Tabla N° 2.1 Remolacha por región según variables productivas .....	20
Tabla N° 2.2 Composición química de la raíz de remolacha .....	22
Tabla N° 2.3 Composición química de la hoja de remolacha.....	24
Tabla N° 2.4 Tipos de clorofila, formula y distribución . .....	28
Tabla N° 3.1 Operacionalización de variables .....	46
Tabla N° 4.1 Matriz de diseño experimental .....	51
Tabla N° 4.2 Cuadro de experimentos.....	61
Tabla N° 5.1 Concentración de clorofila obtenida.....	62
Tabla N° 5.2 Contenido de nutrientes de la hoja de remolacha .....	64
Tabla N° 5.3 Contenido de nutrientes de la clorofila obtenida .....	66

### INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 2.1 Perú: Producción de Remolacha 2016 .....	20
Gráfico N° 6.1 Interacción de variables para la obtención de clorofila .	69
Gráfico N° 6.2 Efecto de variables para la obtención de clorofila.....	70
Gráfico N° 6.3 Impacto incremental de las variables.....	71

## INDICE DE FIGURAS

Figura N° 2.1 Planta de Remolacha.....	19
Figura N° 2.2 Hojas de Remolacha.....	22
Figura N° 2.3 Estructura de la clorofila .....	27
Figura N° 2.4 Equipo de extracción SOXHLET .....	38
Figura N° 3.1 Relación de las variables de la investigación.....	45
Figura N° 4.1 Diseño de Investigación.....	49
Figura N° 4.2 Selección de la materia prima.....	54
Figura N° 4.3 Pesado de hojas de remolacha .....	54
Figura N° 4.4 Montaje de equipo SOXHLET.....	56
Figura N° 4.5 Preparación de solvente .....	57
Figura N° 4.6 Proceso de obtención de la clorofila .....	58
Figura N° 4.7 Recuperación de solvente.....	59
Figura N° 4.8 Clorofila obtenida.....	60
Figura N° 6.1 Análisis estadístico del modelo experimental.....	67
Figura N° 6.2 Ecuación del modelo final .....	68
Figura N° 6.3 Condiciones favorables para la obtención de clorofila ...	71

## RESUMEN

La utilización de las hojas desperdiciadas de algunos vegetales representa una oportunidad de reciclaje y de eliminación de grandes volúmenes de residuos que hoy en día no son aprovechados y sin embargo concentran muchas propiedades beneficiosas para el ser humano.

La presente tesis ha establecido las condiciones favorables para la extracción de Clorofila a partir de las hojas de remolacha recolectadas en el distrito del Callao. La extracción se realizó por medio de etanol, usando el equipo Soxhlet modificado.

Las variables que se controlaron fueron relación masa de hojas / volumen de etanol y el tiempo de extracción, éstas se desarrollaron en un diseño factorial de 9 experimentos en total, siendo los resultados evaluados en forma cuantitativa mediante espectrofotometría.

De los resultados obtenidos, el óptimo nos indica que cuando la relación masa/volumen de etanol es de 1:5 y el tiempo de extracción es de 60 minutos se obtuvo una concentración de clorofila mayor a 405 mg/L.

**Palabras clave:** extracción, clorofila, remolacha, equipo soxhlet.

## ABSTRACT

The use of wasted leaves of some vegetables represents an opportunity for recycling and disposal of large volumes of waste that nowadays are not used and yet concentrate many beneficial properties for humans.

This thesis has established the favorable conditions for the extraction of Chlorophyll from the beet leaves collected in Callao district. The extraction was carried out by means of ethanol, using the modified Soxhlet equipment.

The variables that were controlled were leaves mass / volume ratio of ethanol and extraction time, these were developed in a factorial design of 9 total experiments, with the results evaluated quantitatively by spectrophotometry.

From the results obtained, the optimum indicates that when the mass / volume ratio of ethanol is 1: 5 and the extraction time is 60 minutes, a chlorophyll concentration greater than 405 mg / L was obtained.

**Keywords: extraction, chlorophyll, beet, soxhlet equipment.**

## **I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.1. Identificación del problema**

La utilización de hojas desperdiciadas como fuente de principios activos de gran valor se viene desarrollando desde los años cincuenta, y cada día gana mayor importancia, pues estos productos secundarios en muchos casos son más valiosos que el producto principal y constituyen la base de la conservación y el aprovechamiento integral de los recursos.

La Clorofila es el pigmento natural más abundante presente en las plantas, se producen en los cloroplastos de hojas y otros tejidos de los vegetales, además de aportar energía vital proveniente de la fotosíntesis, desintoxica y oxigena nuestras células de forma muy efectiva, con la ventaja de ser un alimento 100% natural y extremadamente saludable. La clorofila es una fuente fácilmente digerible de vitaminas y minerales, que apoya la circulación sanguínea, intestino, riñones e hígado, y ayuda a equilibrar nuestro metabolismo.

Actualmente los pigmentos clorofílicos son de gran demanda comercial, pueden ser utilizados como pigmento, como antioxidantes o como suplementos nutricionales.

Por esta razón se plantea la obtención de clorofila a partir de las hojas de remolacha que son desechadas debido a falta de conocimientos

adecuados, especialmente de su valor nutritivo , y así elaborar productos con un mayor valor agregado, incrementar los volúmenes de producción de este derivado y reducir los costos.

El método para la obtención de Clorofila será básicamente una extracción sólido-líquido en el equipo Soxhlet, este método es actualmente el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción.

## **1.2. Formulación del problema**

### **1.2.1. Problema General**

¿Cuáles son las condiciones favorables para la obtención de clorofila a partir de las hojas de Remolacha (*Beta Vulgaris L.*) mediante el equipo Soxhlet modificado?

### **1.2.2. Problemas específicos**

- a. ¿Cuáles son las características físicas y químicas de la hoja de Remolacha (*Beta Vulgaris L.*) usada para la obtención de Clorofila?
- b. ¿Cuáles son los valores experimentales de la extracción de la clorofila de las hojas de remolacha con el equipo Soxhlet modificado?

- c. ¿Cuáles son las características físicas y químicas de la Clorofila obtenida de las hojas de Remolacha (*Beta Vulgaris L.*)?

### **1.3. Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Determinar las condiciones favorables para la obtención de Clorofila a partir de las hojas de Remolacha (*Beta Vulgaris L.*) mediante el equipo Soxhlet modificado.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- a. Determinar las características físicas y químicas de la hoja de Remolacha (*Beta Vulgaris L.*) usada para la obtención de Clorofila.
- b. Obtener los valores experimentales de la extracción de la clorofila de las hojas de remolacha con el equipo Soxhlet modificado.
- c. Determinar las Características físicas y químicas y de la Clorofila obtenida de las hojas de Remolacha (*Beta Vulgaris L.*).

#### **1.4. Justificación**

Las razones que justifican la investigación propuesta son las siguientes:

- a. Ambiental: Plantear una solución al desecho de hojas de remolacha tanto en el mercado donde se realizó el estudio, así como en casi todos los establecimientos que no aprecian la hoja de remolacha como fuente rica en clorofila, aprovechando sus características nutritivas.
- b. Tecnológico: Los resultados de este proyecto permitirán aportar información valiosa para posteriores estudios, para que sean sujetos a comparación entre la cantidad y calidad de la clorofila obtenida. Los resultados a obtenerse permitirán pasar de la producción a nivel experimental en laboratorio a la producción a escala piloto.
- c. Social: Ante la necesidad que presenta la sociedad de reemplazar los productos químicos por productos orgánicos o naturales en la agricultura, es de importancia el estudio de la obtención de diferentes extractos vegetales.

## **1.5. Importancia**

La presente tesis nos conduce a solucionar el problema de la acumulación de restos de vegetales no utilizados considerados como desechos, nos ayuda a darle un nuevo y beneficioso uso a las hojas de un vegetal del cual sólo se aprovechaba una porción.

Obtener las condiciones óptimas para la extracción de clorofila aportará resultados muy significativos para la industria, si se requiere obtener un gran volumen del producto, da pie al desarrollo de una escala industrial del proceso.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes del estudio

Para el presente trabajo de investigación se ha consultado diferentes referencias bibliográficas que han realizado investigaciones similares a la planteada en la presente tesis.

Con el objetivo de estudiar los efectos de las variables de proceso sobre la extracción del aceite de las semillas de maracuyá por tres técnicas: ultrasonido, agitación, y Soxhlet; y también los efectos de tipo de disolventes menos impactante para el medio ambiente, Cardoso et al. (2014) en la Universidad Estatal de Maringá, Brasil, realizó el estudio **“Efecto de las variables en el proceso de extracción de aceite de las semillas de maracuyá por técnicas convencionales y no convencionales”** en el cual se evaluó la relación variable de masa de semillas por volumen de disolvente (A), el tiempo de extracción (T) y disolvente (s). Concluyendo que las variables que ejercen una mayor influencia en el rendimiento de extracción de aceite a partir de la semilla de maracuyá eran el tiempo de extracción y la relación de semilla/ disolvente para las tres técnicas estudiadas, junto con el tipo de disolvente para las técnicas de ultrasonido y agitador.

La comparación de las tres técnicas mostró que la técnica Soxhlet tenía los rendimientos más altos y se extrajo 65 % de la cantidad total del aceite presente en la matriz inicial.

En la Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Ecuador, Caldas (2012) realizó estudios para la **“Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción Sólido - Líquido”** y así poder establecer los parámetros de extracción para lograr la estandarización del proceso. Con los análisis preliminares para la obtención de los extractos de altamisa y eucalipto también se pudo determinar y optimizar los parámetros de funcionamiento del equipo Soxhlet los cuales son de importancia ya que nos permitirán realizar los respectivos cálculos y diseño de la planta piloto de extracción sólido-líquido.

El escalamiento de la planta piloto de extracción sólido-líquido se realizó en base a datos obtenidos experimentalmente en el equipo Soxhlet IVA industria Argentina con manta de calentamiento de marca BOECO tecnología Alemana laboratorio LABHEAT, por tal motivo, el diseño de un equipo a otro variará ligeramente en algunos factores tales como rendimiento o capacidades.

Espin (2011), realizó una investigación con respecto a la **“Elaboración de galletas de sal enriquecidas con clorofilas”** en la

“Escuela Superior Politécnica de Chimborazo”, Riobamba – Ecuador, para determinar por degustación cuál de los vegetales (ortiga, acelga y espinaca) es favorablemente aceptado en las galletas de sal enriquecidas con clorofila.

Mediante la realización de esta investigación se logró elaborar galletas de sal con clorofila proveniente de espinaca, después de realizar pruebas y ensayos previos para elegir el vegetal fuente de clorofila y el porcentaje de dicho vegetal en la galleta, la cual cumple con lo estipulado en la NTE INEN 2085 (Galletas, Requisitos).

Cárdenas et al. (2007) en Universidad autónoma Metropolitana, México D.F., realizó el estudio del **“Extracción de aceite de cacahuete”**, de los resultados obtenidos podemos decir que la semilla de cacahuete resultó ser una oleaginosa de la cual se puede obtener una cantidad significativa de aceite. La combinación de diferentes métodos de extracción de aceite, permitió recuperar casi el 98% del aceite contenido en la semilla de cacahuete, respecto a la cantidad teórica reportada.

El tamaño de partícula utilizado en estos experimentos tuvo un impacto importante en la extracción del aceite, ya que entre más pequeño fue el diámetro de la partícula, la extracción de aceite aumentó.

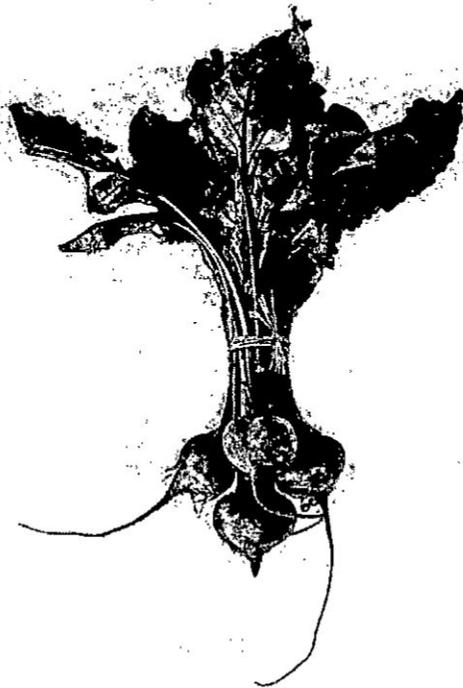
Streit et al. (2005), realizó una investigación en “**Clorofilas**” en la Universidad Federal de Santa María, Brasil; cuyo objetivo fue tratar varios factores que interfieren en la degradación de las Clorofilas, como la luz, radiación, calor, ácidos, oxígeno, alteración enzimática e interacción con otros pigmentos. Así como también otro aspecto fue el uso de las clorofilas como colorantes, concluyendo que la intensidad de la absorción de la luz realizada por la planta depende del entorno en el que se encuentra. Incluyendo los factores ambientales tales como el estrés de agua, pH, la reducción de brillo, cambios enzimáticos, la temperatura y el aumento de la atención individual de etileno deben ser tomadas durante la extracción y análisis, así como durante el procesamiento de alimentos, con el fin de mantener la integridad de la molécula de clorofila.

Para el “**Escalado de la tecnología de laboratorio de obtención de concentrado clorofila-caroteno a partir del follaje de Pinus caribaea Morelet (pino macho)**”, Amaro et al. (2004) realizó estudios en el Centro de Química Farmacéutica, Instituto de Investigaciones Forestales, Instituto de Farmacia y Alimentos, Cuba; con la utilización alcohol natural como solvente. Los estudios de escalado permitieron conocer los parámetros tecnológicos del procedimiento de obtención del concentrado clorofila - caroteno y los índices de calidad. El equipo de extracción PERSOXH puede trabajar de forma satisfactoria en la

es muy rústica y produce muy bien en los climas templados y también en los climas fríos, y aún en los cálidos, sin embargo es mucho más susceptible al frío que la remolacha azucarera. Existe un número considerable de variedades de remolacha; unas especiales para la industria (azucareras y destilerías) y otras remolachas hortícolas y forrajeras; las variedades más nutritivas son las amarillas, luego siguen las blancas y menos ricas son las rojas (Larbaetrier 1901).

Sus características principales son las siguientes: Raíz gruesa, carnosa, azucarada y subterránea; tallo derecho, robusto, anguloso y con ramas largas y rectas; hojas verdes o rojizas, obtusas, tiernas, con frecuencia arrugadas y con peciolo anchos y carnosos en la base; flores pequeñas, reunidas de dos en dos y de cuatro en cuatro, pocas veces solitarias, formando espigas largas, delgadas y derechas; perigonio rojizo; frutos rugosos, amarillo-oscuros, del grosor de un guisante, y encerrando en la cápsula que forman de dos a cuatro semillas aplastadas.

**FIGURA N° 2.1**  
**PLANTA DE REMOLACHA**



*Fuente: Revista Salud Alternativa (2017)*

En el Perú la producción de remolacha se ha mantenido respecto a los años 2015 y 2016 **TABLA N° 2.1**. Las principales zonas productoras de palta destacan los departamentos: Lima Metropolitana, Lima, Arequipa y Lambayeque. El **GRÁFICO N° 2.1** muestra la distribución de la producción del año 2010.

La composición cuantitativa de la remolacha cambia con la variedad; pero las diferencias se acentúan sensiblemente, cuando la comparación se establece entre variedades forrajeras, azucareras y de destilería. Las primeras distínganse por ser muy acuosas, poco ricas, por lo tanto, en materia seca, y abundantes en proteína y celulosa bruta. Las segundas contienen, por el contrario, poca agua, menor cantidad de principios proteicos y celulosa y mayor de hidratos de carbono. Las últimas representan un término medio entre los dos grupos antes indicados, por lo que se refiere a la cantidad de materia seca, pero son más ricas en proteína que las azucareras y más pobres en celulosa, sobre todo que las forrajeras.

El consumo y la utilización de la remolacha, va a depender del conocimiento que se disponga de sus componentes nutricionales que son sustancias indispensables para el organismo de igual manera otras propiedades que se le atribuye para sus posibles usos y aplicaciones. La remolacha forma parte indispensable de la buena alimentación, en algunos casos resulta de mucha utilidad para tratar ciertas enfermedades, aunque no es posible realizar un análisis detallado sobre los beneficios nutricionales de la remolacha, debido a la falta de estudios complementarios.

A continuación se presenta la **TABLA N° 2.2** de la composición química de la raíz y de las hojas de remolacha, y cuáles son las

funciones beneficiosas que producen en el organismo los nutrientes contenidos:

**TABLA N° 2.2**

**COMPOSICION QUIMICA DE LA RAIZ DE REMOLACHA**

<b>COMPOSICION QUIMICA DE LA RAIZ DE REMOLACHA</b>			
Agua	87.5 gr.	Vitamina A	36 UI
Energia	41 Kcal	Vitamina B1	0.03 mg.
Grasa	0.17 gr.	Vitamina B2	0.04 mg.
Proteinas	1.31 gr.	Niacina	0.334 mg.
Carbohidratos	9.56 gr.	Vitamina B6	0.067 mg.
Fibra	2.80 gr.	Vitamina C	4.90 mg.
Potasio	325 mg.	Vitamina E	0.30 mg.
Sodio	78 mg.	Magnesio	0.10 mg.
Fosforo	40 mg.	Cobre	0.20 mg.
Calcio	16 mg.	Cobalto	0.001 mg.
Magnesio	23 mg.	Cloro	0.40 mg.
Hierro	0.80 mg.	Fluor	0.02 mg.
Zinc	0.35 mg.	Yodo	40 mcg.

*Fuente: Ministerio de Salud / Instituto Nacional de Nutrición y Martínez (2009)*

*Elaboración; Asociación Regional de Exportadores – AREG*

**2.2.2. Hoja de Remolacha**

**FIGURA N° 2.2**

**HOJAS DE REMOLACHA**



*Fuente: Revista Salud Alternativa (2017)*

En nuestro país, de acuerdo a las costumbres y por desconocimiento, las hojas de remolacha no son consumidas por las personas, sino que son utilizadas como forraje para el ganado. (Larbaletrier 1901).

En los mercados callejeros, mercados interiores, y centros de distribución de frutas y vegetales, sus hojas se cortan de la bombilla para ser utilizadas como fertilizante orgánico y la alimentación animal o se desechan en el medio ambiente como residuos (Amaral et al., 2004; Mello et al., 2008).

Las hojas tienen gran valor nutritivo, mayor que el de las grandes y suculentas raíces; las que se emplean en la alimentación humana, como forrajes y para la extracción de azúcar según las características de las distintas variedades y especies (Martínez et al., 2005).

Las hojas son más densas nutritivamente que su raíz. Por otro lado, el consumo de las hojas verdes y tiernas situadas en la parte superior de la raíz aporta principalmente beta-carotenos, calcio y hierro. TABLA N° 2.3

**TABLA N° 2.3**

**COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA HOJA DE REMOLACHA**

<b>COMPOSICION QUIMICA DE LA HOJA DE REMOLACHA</b>			
<b>Agua</b>	88.4 gr.	<b>Magnesio</b>	72 mg.
<b>Energia</b>	34 Kcal	<b>Hierro</b>	2.80 mg.
<b>Grasa</b>	0.5 gr.	<b>Zinc</b>	0.36 mg.
<b>Proteinas</b>	3.40 gr.	<b>Folacina</b>	14.8 mg.
<b>Carbohidratos</b>	5.90 gr.	<b>Vitamina A</b>	6.7 UI
<b>Fibra</b>	1.1 - 3.7 gr.	<b>Vitamina B1</b>	0.30 mg.
<b>Potasio</b>	547 mg.	<b>Vitamina B2</b>	0.15 mg.
<b>Sodio</b>	201 mg.	<b>Niacina</b>	0.93 mg.
<b>Fosforo</b>	56 mg.	<b>Vitamina B6</b>	0.11 mg.
<b>Calcio</b>	139 mg.	<b>Vitamina C</b>	23 mg.

*Fuente: Ministerio de Salud / Instituto Nacional de Nutrición y Martínez (2009)*

*Elaboración; Asociación Regional de Exportadores - AREX*

De acuerdo a esta composición, las hojas de remolacha cada 100 g, reporta una buena cantidad de nutrientes, es decir, tiene un valor nutritivo más elevado que el tubérculo.

Tiene un valor proteico mayor, aunque el contenido de grasa es escaso. Presenta una valor bajo de calorías y carbohidratos, pero posee una buena fuente de fibra.

En cuanto a vitaminas, las hojas de remolacha contienen una buena cantidad de Vitamina A y C, lo que escasea en el tubérculo. Las del complejo B también tienen un valor un poco elevado que el anterior

exceptuando la folacina que tiene un valor bajo. Por otro lado, presenta una fuente muy buena en Potasio, Calcio y Hierro.

Estudios recientes han investigado la composición los perfiles de los alimentos infrautilizados y sus co-productos en el intento para investigar su potencial como alimentos funcionales (Pereira et al., 2003; Almeida et al., 2009; Boroski et al., 2011).

Tenemos el objetivo de utilizar estas hojas en el presente estudio.

### **2.2.3. Clorofila**

Las clorofilas son los pigmentos naturales más abundantes presentes en las plantas y ocurren en los cloroplastos de las hojas y en otros tejidos vegetales. Los estudios en una gran variedad de plantas caracterizaron que los pigmentos clorofilianos son los mismos. Las diferencias aparentes en el color del vegetal son debidas a la presencia y distribución variable de otros pigmentos asociados, como los carotenoides, los cuales siempre acompañan a las clorofilas (Von Elbe, 2000).

El nombre clorofila fue propuesto por Pelletier y Caventou en 1818 para designar la sustancia verde que podría extraer de las hojas con la ayuda de alcohol. Actualmente pigmentos clorofílicos son de gran

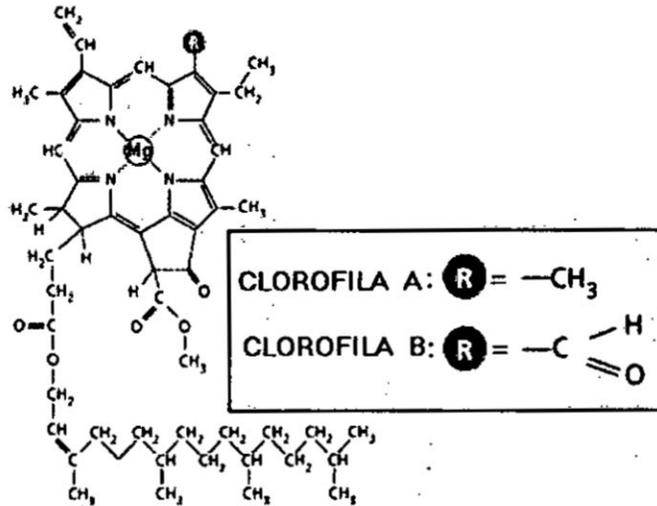
importancia comercial, pueden ser utilizados como pigmento, como antioxidantes o como suplementos nutricionales. (Streit, 2005)

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

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

FIGURA N° 2.3

ESTRUCTURA DE LA CLOROFILA



Fuente: Portal Frutícola (2016)

La clorofila esencial en toda la fotosíntesis de las plantas verdes es la clorofila a, por lo cual está presente en todas las plantas fotosintéticas. Esta clorofila recibe energía lumínica, tanto en forma directa como por transferencia de otras clorofilas y pigmentos accesorios. La clorofila b está presente en la mayoría de las plantas verdes, en las algas verde-azul, en su lugar hay ficocianina, en las algas pardas fucoxantina y en las algas rojas ficoeritrina. (Vieira, 1996)

**TABLA N° 2.4**

**TIPOS DE CLOROFILA, FORMULA Y DISTRIBUCIÓN**

	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>c<sub>1</sub></i>	Clorofila <i>d</i>
<b>Fórmula empírica</b>	C <sub>55</sub> H <sub>72</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub> Mg	C <sub>53</sub> H <sub>58</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub> Mg	C <sub>54</sub> H <sub>70</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub> Mg
<b>Grupo C3</b>	-CH=CH <sub>2</sub>	-CH=CH <sub>2</sub>	-CHO
<b>Grupo C7</b>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
<b>Grupo C8</b>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>Grupo C17</b>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO- Fitol	-CH=CHCOOH	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO- Phytyl
<b>Enlace C17-C18</b>	Simple	Doble	Simple
<b>Distribución</b>	Universal	Cromo alveolados y algas rojas (2)	Algún alga roja(3)

*Fuente: Otra Medicina.com, 2010*

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

magnesio. En la formación de la clorofila también se emplea hierro, en una forma que a la fecha no se conoce bien, pero este metal no está presente en la clorofila misma. De acuerdo con una especulación filogenética reciente, las primeras metalporfirinas de importancia fueron porfirinas de hierro activas en la respiración anaeróbica y la primera porfirina de magnesio fue resultado de un accidente metabólico antiguo. Se aplica el término clorofilida a una clorofila a la que le falta el grupo fitil. Cuando le falta el átomo de Mg a veces se llama una clorofilina. (Schoefs, 2002)

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

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

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

La clorofila como suplemento alimenticio tiene una gran actividad desodorizante. De gran utilidad para combatir los problemas de mal

aliento ocasionados por el tabaco, bebidas alcohólicas y alimentos; ayuda a eliminar los olores provocados por la transpiración, debido a que posee acción antioxidante. Nutre y fortalece los sistemas circulatorios e intestinales.

- **Acciones de la Clorofila en el ser humano**

La clorofila, además de aportar energía vital proveniente de la fotosíntesis, desintoxica y oxigena nuestras células de forma muy efectiva, con la ventaja de ser un alimento 100% natural y extremadamente saludable.

La clorofila es una fuente fácilmente digerible de vitaminas y minerales, que apoya la circulación sanguínea, intestino, riñones e hígado, y ayuda a equilibrar nuestro metabolismo.

La clorofila es un suplemento alimenticio que tiene una gran actividad desodorizante. De gran utilidad para combatir los problemas de mal aliento ocasionados por el tabaco, bebidas alcohólicas y alimentos; ayuda a eliminar los olores provocados por la transpiración, debido a que posee acción antioxidante. Nutre y fortalece los sistemas circulatorios e intestinales.

La clorofilina disminuye de forma significativa el colesterol y triglicéridos séricos en estudios preliminares en animales. La clorofila y la clorofilina poseen potencial anticarcinogénico y antimutagénico; pueden ayudar a proteger contra algunas toxinas y pueden mejorar los efectos secundarios de algunos fármacos.

Es efectiva en la reducción del olor urinario y fecal; en algunas circunstancias puede ayudar a aliviar el estreñimiento. Puede ser beneficioso en el tratamiento de piedras de oxalato cálcico y pueden tener actividad antiaterogénica. (Breinholt, V, 1995)

#### **2.2.4. Extracción Sólido – Líquido**

En la extracción por disolvente conocida como sólido-líquido, el soluto contenido en fase sólida se separa por contacto con el disolvente líquido (Brennan, et al. 1970). La extracción por disolvente se puede realizar de tres maneras: por percolación, por inmersión y por procedimiento mixto, es decir Percolación - inmersión (Bernardini, 1981). El procedimiento de percolación se lleva a cabo mediante una lluvia del disolvente de manera tal que llegue a toda la masa, pero sin llenar todos los espacios vacíos existentes entre las semillas. En este sistema el disolvente envuelve a todas las partículas de la materia prima con una película del líquido en continuo recambio. En el proceso por inmersión la semilla va inmersa completamente en el

disolvente. Durante este proceso la velocidad de recambio del disolvente sobre la superficie de las partículas es necesariamente lenta, incluso si circula rápidamente (Bernardini, 1981).

El procedimiento mixto, percolación-inmersión, llamado también "extracción por medio de gases condensables" ha sido preconizado como la de máxima eficacia, por que aprovecha más el poder disolvente del líquido (Colón, 1963).

Los disolventes más comunes son el éter de petróleo, sulfuro de carbono (este último presenta el peligro de inflamabilidad), hidrocarburos clorinados: por ejemplo tetracloruro de carbono (Bernardini, 1981). La separación del disolvente puede hacerse por evaporación o por destilación, según sea su volatilidad y la del soluto contenido (Vian y Ocon, 1972).

Un proceso extractivo debe definir la selectividad del solvente a ser usado en el proceso. Dependiendo del propósito al que destine, se puede obtener un extracto cuya composición química contiene la mayor parte en los constituyentes químicos de la planta, o un extracto que contiene solamente constituyentes químicos con una determinada característica (Sharapin N.,2000)

#### **2.2.5.1. Estado de división**

La eficiencia del proceso de extracción será mayor mientras más pequeño sea el tamaño de las partículas, ya que de esta forma se tendrá una mayor área de contacto con el solvente. Cabe resaltar que, la presencia de partículas demasiado finas sería perjudicial para el proceso de percolación, ya que ocurre la compactación y formación de falsas vías, y el proceso de maceración, donde las partículas pasan al extracto, haciendo necesaria una filtración como etapa adicional. La penetración del solvente en fragmentos mayores de la muestra es lenta y la salida de las sustancias extraíbles es difícil.

#### **2.2.5.2. Temperatura**

La disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el aumento de la temperatura, que contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso. Sin embargo, muchos principios activos son termolábiles y pueden ser destruidos, total o parcialmente a temperaturas elevadas. El aumento de la temperatura también puede causar la pérdida de sustancias volátiles.

### **2.2.5.3. PH**

El pH influye en la solubilidad de diversos compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales.

### **2.2.5.4. Naturaleza del solvente**

Dependiendo de la finalidad deseada, el solvente utilizado extrae, selectivamente o no, cierta clase de compuestos.

### **2.2.5.5. Tiempo de extracción**

Se determina en función del solvente y del equipo seleccionado. Esta variable es resultante de todos los factores antes mencionados. El tiempo de extracción debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés.

La extracción puede definirse como un proceso de separación en el cual un soluto se reparte o distribuye entre dos fases diferentes. Lo más común es realizar una extracción entre dos fases líquidas, aunque también pueden realizarse extracciones sólido – líquido.

La extracción sólido – líquido recibe distintos nombres según la finalidad del proceso; así, se le conoce como lixiviación, macerado,

percolación, etc. La finalidad de esta operación puede ser diversa, pues en algunos casos es necesario eliminar algún componente no deseable de un sólido mediante disolución con un líquido, denominándose lavado a este proceso de extracción.

La forma en que el soluto esté contenido en el sólido inerte puede ser diversa, puede ser un sólido disperso en el material insoluble o estar recubriendo su superficie. También puede tratarse de un líquido que este adherido o retenido en el sólido, o bien estar contenido en su estructura molecular.

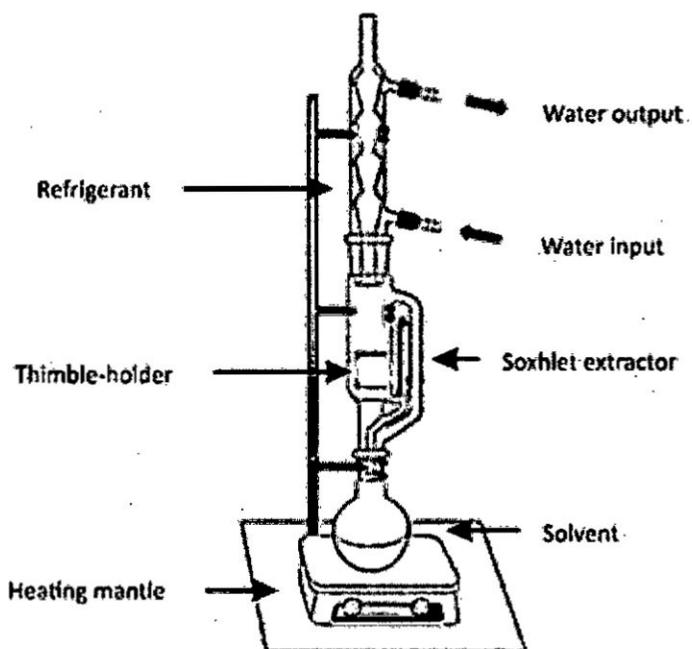
#### **2.2.6. Método de extracción con Soxhlet**

La extracción Soxhlet es la técnica de separación sólido-líquido comúnmente usada para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza. De igual modo, puede ser usada como técnica preparativa de muestra como paso previo al análisis mediante otra técnica instrumental, por ejemplo, la extracción de ácidos grasos en muestras de tocino para su posterior determinación mediante cromatografía de gases.

Aunque su campo de aplicación es fundamentalmente el agroalimentario es también de utilidad en el área medioambiental, así es el método de análisis recomendado para la determinación del

aceite y la grasa total recuperable en aguas de vertidos industriales permitiendo la determinación de hidrocarburos relativamente no volátiles, aceites vegetales, grasas animales, ceras, jabones y compuestos relacionados.

**FIGURA N° 2.4**  
**EQUIPO DE EXTRACCION SOXHLET**



Fuente: World Journal of Chemical Education (2017)

La extracción con Soxhlet presenta las siguientes ventajas:

- La muestra está en contacto repetidas veces con porciones frescas de disolvente.

- La extracción se realiza con el disolvente caliente, así se favorece la solubilidad de los analitos.
- No es necesaria la filtración después de la extracción.
- La metodología empleada es muy simple.
- Es un método que no depende de la matriz.
- Se obtienen excelentes recuperaciones, existiendo gran variedad de métodos oficiales cuya etapa de preparación de muestra se basa en la extracción con Soxhlet.

Por otra parte, las desventajas más significativas de este método de extracción son:

- El tiempo requerido para la extracción normalmente está entre 6-24 horas.
- La cantidad de disolvente orgánico (50-300 ml)
- La descomposición térmica de los analitos termolábiles, ya que la temperatura del disolvente orgánico está próxima a su punto de ebullición.
- No es posible la agitación del sistema, la cual podría acelerar el proceso de extracción.
- Es necesaria una etapa final de evaporación del disolvente para la concentración de los analitos.
- Esta técnica no es fácilmente automatizable.

En relación a los equipos, el Soxhlet consta básicamente de cuatro partes fundamentales, las cuales son: vaso extractor, calderín, torre de relleno y reóstatos. Adicionalmente, se tiene un distribuidor de flujo a la entrada del vaso extractor para lograr un mejor esparcimiento del solvente sobre la torta de extracción. En las condiciones ambientales se observan los factores ambientales que ejercen influencia en el proceso a estudiar. Las condiciones ambientales del equipo están controladas por la presión y la temperatura ambiente, que determinan los valores de las propiedades fisicoquímicas reportadas en la literatura de los compuestos involucrados.

La extracción Soxhlet ha sido (y en muchos casos, continúa siendo) el método estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño en el siglo pasado, y actualmente, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción. Además de muchos métodos de la EPA (U.S. Environmental Protection Agency) y de la FDA (Food and Drugs Administration) utilizan esta técnica clásica como método oficial para la extracción continua de sólidos.

#### **2.2.7. Solvente: Etanol**

Debe seleccionarse un solvente conveniente de tal forma que ofrezca el mejor balance de varias características deseables:

- Alto límite de saturación y selectividad respecto al soluto por extraer capacidad para producir el material extraído con una calidad no alterada por el disolvente
- Estabilidad química en las condiciones del proceso
- Baja viscosidad, baja presión de vapor baja toxicidad e inflamabilidad
- Baja densidad baja tensión superficial facilidad y economía de recuperación de la corriente de extracto y bajo costo

Cada solvente diferente produce extractos y composiciones específicos. El solvente más ampliamente utilizado para extraer extractos vegetales de las plantas es el etanol.

En este trabajo se seleccionó como disolvente al etanol porque en investigaciones previas al proyecto se encontró que en ensayos de antagonismo, la acción inhibidora de varios extractos vegetales ante *Botrytis cinérea* y *Alternaria spp* es efectiva al igual que compuestos metanólicos. Se optó por el uso de etanol en lugar de metanol por sus propiedades parecidas, por su disponibilidad y menor toxicidad que el primero.

El compuesto químico etanol, conocido como alcohol etílico, es un alcohol que se presenta en condiciones normales de presión y

temperatura como un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78 °C y punto de fusión de -114,1 °C. Es altamente inflamable, soluble en agua en cualquier proporción, reacciona violentamente con oxidantes fuertes y lentamente con hipoclorito cálcico, óxido de plata y amoníaco

La investigación científica que se ha llevado a cabo en las últimas décadas ha demostrado el papel que juegan ciertos componentes químicos-nutricionales en la prevención y tratamiento de muchas enfermedades. Esta situación ha provocado un cambio del simple concepto de alimento como fuente de nutrientes a uno más integral que traduce la potencialidad que los alimentos pueden tener, no sólo de nutrir sino también de prevenir y curar enfermedades. Aquí entran a jugar un rol importante, en la nueva focalización de la industria alimentaria, los denominados alimentos funcionales, los cuales según la Academia Nacional de Ciencias (EEUU) ha definido como: «Alimentos modificados, o que tengan un ingrediente que demuestre una acción que incremente el bienestar del individuo o disminuya los riesgos de enfermedades, más allá de la función tradicional de los nutrientes que contiene». Para la Comunidad Europea, se define alimento funcional como: «Alimento que contiene un componente nutriente o no nutriente que posea un efecto selectivo sobre una o

varias funciones del organismo, cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse que es funcional (fisiológico) o incluso saludable».

En general, todos los alimentos funcionales son apreciados al ser considerados como promotores de la salud. Asimismo, los alimentos funcionales se distinguen por ser un aporte a la salud en cuanto contienen sustancias químicas que contribuyen a prevenir ciertas enfermedades crónicas no transmisibles; reducen el riesgo de algún tipo de anomalías de carácter fisiológico y, en general contribuyen al buen estado de salud del individuo que le permite prolongar o mejorar su calidad de vida.

En función de lo expresado en los párrafos precedentes y por las investigaciones científicas realizadas sobre la composición y las propiedades de la hoja de remolacha, donde se demuestra que posee características y propiedades específicas y beneficiosas para la salud y nutrición humana, dichas hojas pueden ser consideradas como materia prima para la obtención de Clorofila ingrediente principal en la elaboración de alimentos funcionales. Consecuentemente, la clorofila se convierte en una excelente fuente de productos químicos nutricionales para el desarrollo y comercialización de nuevos productos para la industria de alimentos funcionales en el Perú.

## **2.3. Definición de términos**

### **2.3.1. Escalamiento:**

Proceso mediante el cual se desarrollan los criterios y las reglas de asignación numérica que determinan las unidades de medida significativas para llevar de un tamaño dado a otro tamaño mayor o menor una operación u objeto (Durand et al, 2008).

### **2.3.2. Equipo soxhlet:**

Soxhlet (en honor a su inventor Franz von Soxhlet) es un tipo de equipo de vidrio utilizado para la extracción de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica.

### **2.3.3. Etanol:**

Compuesto químico también conocido como alcohol etílico y de fórmula química  $C_2H_5OH$ , incoloro e inflamable con punto de ebullición 78.4 °C.

### **2.3.4. Extracción:**

Es la técnica más empleada para proceder a la separación y purificación de los componentes de una mezcla o para aislar un compuesto orgánico de sus fuentes naturales.

### III. VARIABLES E HIPÓTESIS

#### 3.1 Variables de la investigación

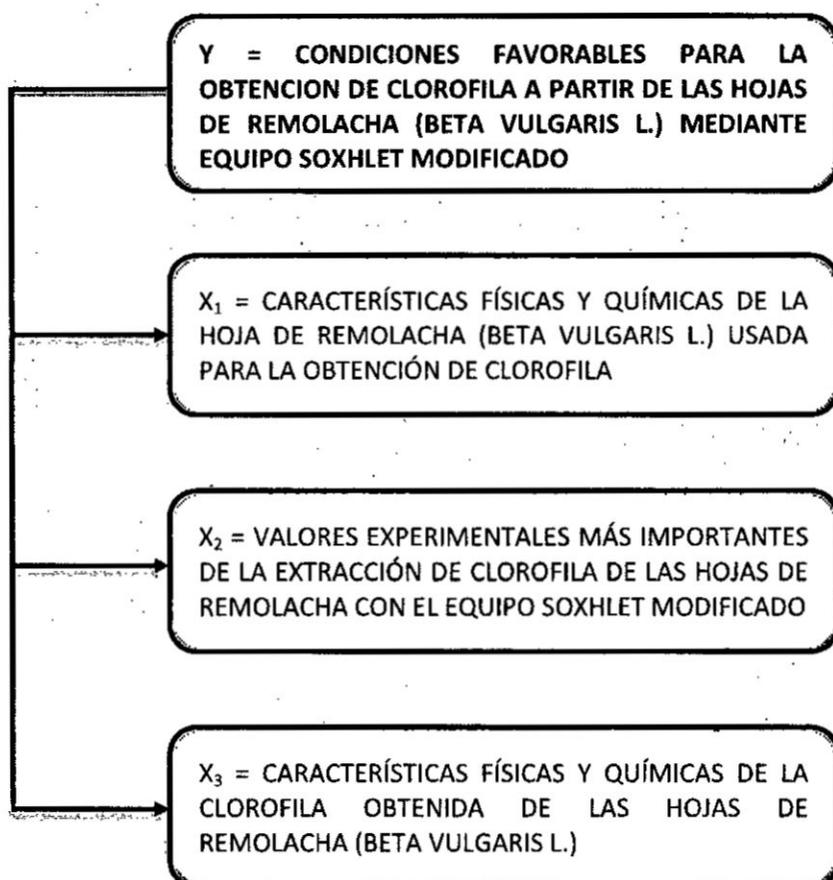
La presente investigación se caracteriza por ser experimental y aplicada, por ser éste el determinante en la relación causa efecto.

Por su naturaleza, las variables identificadas son del tipo cuantitativas. Por su dependencia Y es dependiente, y las variables  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  son independientes.

Es decir:  $Y=f(X_1, X_2, X_3)$ . La **FIGURA 3.1** muestra la relación entre las variables.

**FIGURA 3.1**

#### RELACIÓN DE LAS VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN



### 3.2 Operacionalización de variables

TABLA 3.1

#### OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES DEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
X = Condiciones favorables para la obtención de Clorofila a partir de las hojas de Remolacha (Beta Vulgaris L.) mediante equipo Soxhlet modificado	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Relación masa / Volumen de etanol</li> <li>✓ Tiempo de Extracción</li> <li>✓ Temperatura</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>g/mL</li> <li>min</li> <li>°C</li> </ul>	Método de extracción Soxhlet.
VARIABLES INDEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
X <sub>1</sub> = Características Físicas y químicas de la hoja de Remolacha (Beta Vulgaris L.) usada para la obtención de Clorofila	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Materia Seca</li> <li>✓ Composición nutricional</li> <li>✓ Cenizas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>% Materia Seca</li> <li>% de nutrientes</li> <li>% cenizas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>PEC-022</li> <li>PEC-009</li> <li>PEC-012</li> </ul>
X <sub>2</sub> = Valores experimentales más importantes de la extracción de clorofila de las hojas de remolacha con el equipo Soxhlet modificado	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Relación masa / Volumen de etanol</li> <li>✓ Tiempo de Extracción</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>g/mL</li> <li>min</li> </ul>	Método de extracción Soxhlet.
X <sub>3</sub> = Características Físicas y químicas de la Clorofila obtenida de las hojas de Remolacha (Beta Vulgaris L.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Concentración de clorofila en extracto</li> <li>✓ Composición nutricional</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>mg/L</li> <li>% de nutrientes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>SM 10200 H</li> <li>PEC-009</li> </ul>

### **3.3. Hipótesis general e hipótesis específicas**

#### **3.3.1. Hipótesis General**

Las condiciones favorables para la obtención de Clorofila a partir de las hojas de Remolacha (*Beta Vulgaris L.*) mediante equipo SOXHLET modificado son relación masa/volumen 1:5 y 60 min de extracción.

#### **3.3.2. Hipótesis Específicas**

- a. Las características físicas y químicas que presentan las hojas de remolacha (*Beta Vulgaris L.*) son: % de materia seca, % de nutrientes y % de cenizas.
- b. Los valores experimentales más importantes de la extracción de clorofila de las hojas de remolacha con el equipo Soxhlet modificado son la relación masa/volumen y el tiempo de extracción.
- c. Las características que presenta la clorofila son: concentración de clorofila y % de nutrientes.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **4.1. Tipo de Investigación**

Los tipos de investigación que se realizarán en la presente tesis son:

#### **4.1.1. Por su finalidad**

Es de tipo exploratorio, puesto que busca identificar nuevos rumbos para la investigación en campos del conocimiento no estudiados o poco estudiados.

#### **4.1.2. Por su diseño interpretativo**

Es experimental porque permitirá manipular distintas variables para conseguir el efecto deseado, se tomarán en cuenta los registros y análisis de cada variación.

#### **4.1.3. Por el énfasis de la naturaleza de los datos manejados**

Es del tipo cuantitativo porque las variables de la investigación se obtuvieron realizando mediciones, y con estos se busca interpretar los cambios producidos.

### **4.2. Diseño de Investigación**

El diseño de la presente investigación ha considerado tres etapas, los cuales se ven la **FIGURA 4.1**

**PRIMERA ETAPA DE LA INVESTIGACIÓN**

Caracterización de las hojas de remolacha recolectadas

Método:

Análisis de Laboratorio

**SEGUNDA ETAPA DE LA INVESTIGACIÓN**

Obtención de la data experimental de la extracción de la clorofila de las hojas de remolacha con el equipo Soxhlet modificado

Método:

Ensayos experimentales en el Laboratorio

**TERCERA ETAPA DE LA INVESTIGACIÓN**

Determinación de las condiciones favorables para la obtención de clorofila a partir de hojas de remolacha

Método:

Análisis de Experimentos

**CONDICIONES FAVORABLES PARA LA OBTENCIÓN DE CLOROFILA A PARTIR DE LAS HOJAS DE REMOLACHA (Beta Vulgaris L.) MEDIANTE EQUIPO SOXHLET MODIFICADO**

En la presente tesis buscamos la estrategia más eficaz para obtener la información que necesitábamos para dar respuesta a cada una de nuestras hipótesis, dado esto utilizamos un diseño experimental que presentamos a continuación:

- **Diseño Experimental**

Este diseño nos permite determinar el número de experimentos necesarios en la investigación, para tal fin utilizamos la fórmula estadística:

$$N = n^f$$

Donde:

f = número de variables o factores a manipular

n = número de valores que adopta la variable

N = número de experimentos a realizar

Por lo tanto para esta tesis:

$$N = 3^2 = 9$$

A: Relación Masa / Volumen	1/3	1/4	1/5
B: Tiempo de extracción (min)	40	50	60

**TABLA 4.1**  
**MATRIZ DE DISEÑO EXPERIMENTAL**

Nº de experimento	A1	A2	A3	B1	B2	B3
1	+	-	-	+	-	-
2	+	-	-	-	+	-
3	+	-	-	-	-	+
4	-	+	-	+	-	-
5	-	+	-	-	+	-
6	-	+	-	-	-	+
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	-	+	-
9	-	-	+	-	-	+

### **4.3. Población y Muestra**

El concepto de población y muestra no se aplica en la presente investigación y se considera el criterio de muestra experimental.

#### **4.3.1. Muestra experimental**

La muestra está constituida por 50 gr de hojas de remolacha recolectadas en el mercado TRABAJADORES UNIDOS DE SANTA ROSA, ubicado en el cruce la av. Santa Rosa con la av. Colonial en el distrito de Bellavista, Callao. La muestra es representativa considerando que todas las hojas se encuentran en estado óptimo de conservación y con las facultades para el tratamiento posterior.

### **4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

#### **Materia Prima**

- Hojas de Remolacha

#### **Equipos**

- Equipo Soxhlet modificado
- Espectrofotómetro
- Rotavapor R-205 marca Büchi
- Baño María
- Balanza al 0,1g
- Balanza analítica al 0,0001g

### **Material Básico**

- Matraces erlenmeyer de 250mL, 500mL y 1000mL
- Pipetas graduadas 1 mL y 10 mL
- Vaso Precipitado de 250mL
- Bureta de 10,00mL con pinza de Mohr
- Tubos de ensayo 15 x 100
- Probeta
- Espátula
- Embudo

### **Reactivos**

- Etanol (99.9%)
- Agua destilada

## **4.5. Procedimientos de recolección de datos**

### **4.5.1. De la materia prima**

Las hojas utilizadas en el estudio provienen de hojas de remolacha recolectadas pasaron previamente por un pre-tratamiento de selección, limpieza, y desinfección, posteriormente se dejó secar ligeramente a temperatura

ambiente para luego ser trituradas y obtener tamaños de partículas homogéneos.

**FIGURA N° 4.2**

**SELECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA**



**FIGURA N° 4.3**

**PESAJE DE HOJAS DE REMOLACHA**



#### **4.5.2. Análisis Físicoquímico de la materia prima**

En este punto se señala la metodología utilizada para el análisis de las hojas de remolacha utilizado en el presente estudio.

- **Determinación de materia seca.** Se determinó la cantidad de materia seca de las hojas de remolacha según el método PNT PEC-022.
- **Determinación de cenizas.** Se determinó el porcentaje de ceniza a través del método PNT PEC-012.
- **Determinación de nutrientes.** Se determinó la cantidad de metales en las hojas de remolacha usando el método PNT PEC-009.

#### **4.5.3. Montaje del Equipo**

En relación al equipo, el Soxhlet consta básicamente de cuatro partes fundamentales, las cuales son: vaso extractor, calderín, torre de relleno y reóstatos. En las condiciones ambientales se observan los factores que ejercen influencia en el proceso a estudiar. Las condiciones ambientales del equipo están controladas por la presión y la temperatura del ambiente, que determinan

los valores de las propiedades fisicoquímicas reportadas en la literatura de los compuestos involucrados.

Una vez adecuado el montaje, se probó su funcionamiento operándolo con agua solamente, se observó que no tuviera fugas ni pérdidas significativas de calor, que la alimentación fuera adecuada y que la toma de datos no presentara dificultad.

**FIGURA N° 4.4**

**MONTAJE DE EQUIPO SOXHLET**



**FIGURA N° 4.5**

**PREPARACIÓN DE SOLVENTE**



**4.5.4. Puesta en marcha y condiciones de operación**

Para la determinación de las condiciones más apropiadas en la obtención de clorofila de hojas de remolacha, se utilizó como solvente al etanol 99.9% puro para la extracción de esta sustancia, utilizando como medio de calentamiento una manta calefactora mantenida aproximadamente a una temperatura de 80 °C.

Determinación de la relación masa y volumen empleados

La cantidad de hojas de remolacha empleada es de 50.0 g y volúmenes de etanol de 150mL, 200mL y 250mL con ello

tenemos relaciones de masa / volumen de etanol de 1:3, 1:4 y 1:5, en tiempos de 40min, 50min y 60min; y la recuperación del extracto sigue los mismos procedimientos de recuperación del solvente en la pera instalada en la parte superior del equipo. (FIGURA N° 4.7)

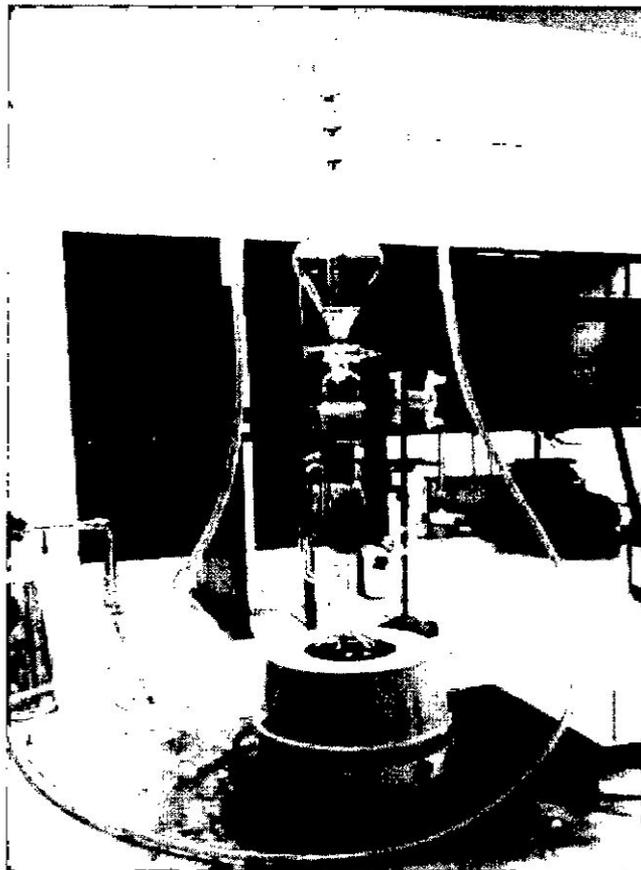
**FIGURA N° 4.6**

**PROCESO DE OBTENCIÓN DE LA CLOROFILA**



**Figura N° 4.7**

**RECUPERACIÓN DE SOLVENTE**

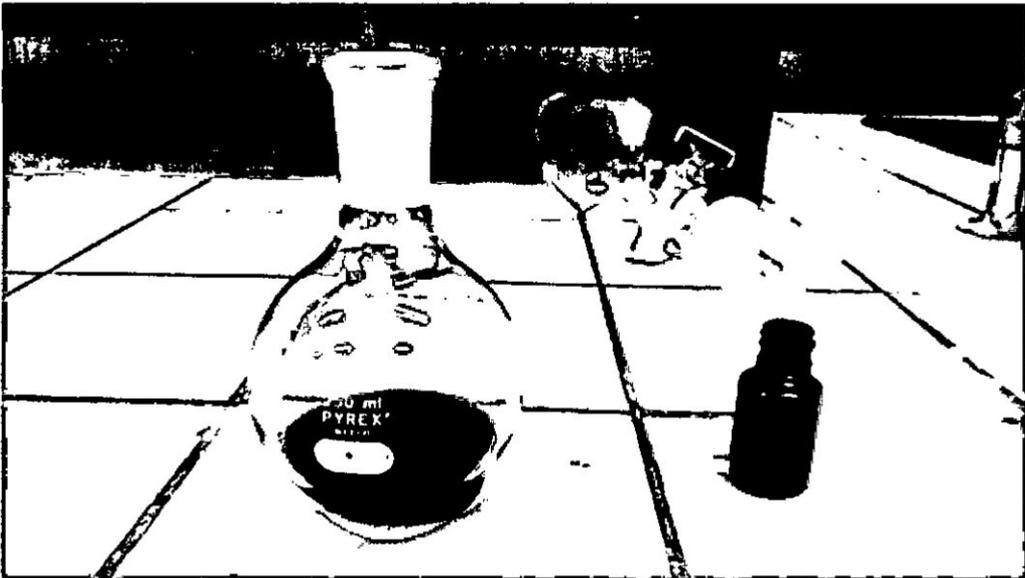


**4.5.5. De la caracterización del producto obtenido**

Al extracto obtenido de las hojas de remolacha se le realizaron análisis fisicoquímicos para determinar su concentración y el porcentaje de nutrientes contenidos en el extracto (FIGURA N° 4.8).

**FIGURA N° 4.8**

**COLOROFILEA OBTENIDA**



**4.6. Procesamiento estadístico y análisis de datos**

Se realizaron 9 corridas experimentales obtenidas del diseño factorial  $3^2$ . Las variables fueron:

- Relación Masa / Volumen de etanol: 1/3, 1/4 y 1/5
- Tiempo de extracción: 40min, 50min y 60min

De estos experimentos se obtuvieron datos de masa de hojas / volumen de etanol, tiempo de extracción y concentración de clorofila

para evaluar las mejores condiciones para la máxima eficiencia. A la clorofila obtenida se le realizaron pruebas fisicoquímicas para conocer los principales nutrientes y un análisis espectrofotométrico para conocer la concentración obtenida.

Las combinaciones realizadas se muestran en la siguiente tabla:

**TABLA N° 4.2**  
**CUADRO DE EXPERIMIENTOS**

<b>N° de Experimento</b>	<b>Relación masa/volumen (gr/ml)</b>	<b>Tiempo de Extracción (min)</b>
1	1/3	40
2	1/3	50
3	1/3	60
4	1/4	40
5	1/4	50
6	1/4	60
7	1/5	40
8	1/5	50
9	1/5	60

## V. RESULTADOS

### 5.1. Resultado Final

Con el objetivo de determinar las condiciones de favorables en el proceso de extracción de clorofila de las hojas de remolacha se modificaron las variables independientes tales como la relación masa/volumen del solvente y tiempo de extracción, usando etanol como solvente extractor.

Se ha realizado el programa experimental (véase la **TABLA N°4.2**) usando el equipo Soxhlet, en base al diseño factorial  $3^2$ , se hicieron 9 corridas con etanol y se obtuvieron los resultados de la **TABLA 5.1**.

**TABLA N° 5.1**

#### **CONCENTRACION DE CLOROFILA OBTENIDA**

<b>N° de Experimento</b>	<b>Relación masa/volumen (gr/ml)</b>	<b>Tiempo de Extracción (min)</b>	<b>Concentración de clorofila (mg/L)</b>
01	1/3	40	66.0024
02	1/3	50	70.3812
03	1/3	60	156.5688
04	1/4	40	172.2417
05	1/4	50	183.6960
06	1/4	60	211.0368
07	1/5	40	293.8068
08	1/5	50	404.2914
09	1/5	60	407.1750

De los resultados se identifica que las condiciones favorables para obtener una mayor concentración de clorofila: 407.17 mg/L de etanol son:

- Relación masa / volumen de etanol: 1:5
- Tiempo de extracción: 60 min

## **5.2. Resultados Parciales**

### **5.2.1. Características Físico-Químico de las hojas de remolacha**

Los resultados experimentales del análisis realizado a las hojas de remolacha antes de la extracción de la clorofila son los siguientes:

- Cantidad de material seco: 18.85%
- Cenizas: 20.79%
- Nutrientes: Tabla N° 5.2

**TABLA N° 5.2**

**CONTENIDO DE NUTRIENTES DE LA HOJA DE REMOLACHA**

N° de Referencia:		V-17/201701
Código/descripción del cliente		HOJA DE REMOLACHA
Cantidad de muestra		500 g
Fecha muestreo		14/12/2017
Hora muestreo		N/I
Parámetro	Unidades	Resultado
<b>Metales</b>		
Boro B	mg/Kg	64.3
Calcio Ca	%	2.56
Cobre Cu	mg/Kg	16.3
Hierro Fe	mg/Kg	1286.4
Potasio K	%	3.17
Magnesio Mg	%	1.07
Manganeso Mn	mg/Kg	480.9
Molibdeno Mo	mg/Kg	<LC
Sodio Na	mg/Kg	15209
Fosforo P	%	0.5
Azufre S	%	0.84
Zinc Zn	mg/Kg	95.8
<b>Físico Químicos</b>		
Materia seca	%	18.65
Ceniza	%	20.79

*Fuente: Informe AGQ Perú SAC*

Se observa que las hojas de remolacha tienen alto contenido de nutrientes.

### **5.2.2. Valores experimentales más importantes de la extracción de clorofila de las hojas de remolacha con el equipo Soxhlet modificado**

Se identifica que los valores experimentales más importantes para el proceso a una temperatura 80°C y 50 g de hojas de remolacha son:

- Relación masa / volumen: esta variable tiene una mayor influencia para la obtención de clorofila
- Tiempo de extracción

### **5.2.3. Características físicas y químicas de la Clorofila extraída**

Se envió a realizar los análisis físico-químicos en el laboratorio AGQ Perú SAC, los resultados obtenidos para una concentración de 407.17 mg/L fueron los siguientes:

**TABLA N° 5.3**

**CONTENIDO DE NUTRIENTES DE LA CLOROFILA OBTENIDA**

<b>N° de Referencia:</b>		EX-17/201702
<b>Código/descripción del cliente</b>		Extracto alcohólico (2)
<b>Relación masa/volumen (g/mL)</b>		1/5
<b>Tiempo de Extracción (min)</b>		60
<b>Fecha muestreo</b>		02/12/2017
<b>Hora muestreo</b>		18:27
<b>Parámetro</b>	<b>Unidades</b>	<b>Resultado</b>
<b>Metales</b>		
Boro B	mg/L	0.3167
Calcio Ca	mg/L	0.7380
Cobre Cu	mg/L	0.0520
Hierro Fe	mg/L	0.0319
Potasio K	mg/L	153.20
Magnesio Mg	mg/L	5.0941
Manganeso Mn	mg/L	0.0008
Molibdeno Mo	mg/L	0.0003
Sodio Na	mg/L	131.3
Fosforo P	mg/L	19.80
Azufre S	mg/L	33.44
Zinc Zn	mg/L	1.265

*Fuente: Informe AGQ Perú SAC*

## VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se realizaron análisis estadísticos con los valores obtenidos en las corridas experimentales para validar nuestra hipótesis. Para ello evaluamos los valores de "p" (FIGURA 6.1) obtenidos por cada variable.

FIGURA 6.1

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL MODELO EXPERIMENTAL

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Relacion masa/volumen	2	113858	56929	50.14	0.001	
Tiempo	2	9825	4913	4.33	0.100	
Error	4	4542	1135			
Total	8	128225				

Model Summary				
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)	
33.6970	96.46%	92.92%	82.07%	

Existe evidencia suficiente de que los datos obtenidos reflejan un seguimiento real y concordante con lo establecido en la metodología de la presente investigación, puesto que los valores de "p" son menores a 1.

Además, del análisis estadístico (**FIGURA 6.2**) se identifica que de alguna manera la variable "Relación masa/volumen" es más importante que la variable "Tiempo de extracción" para predecir el valor de "Concentración de clorofila" usando la regresión, debido a que el valor de "p" obtenido es menor a 0.05.

Para el modelo elegido la ecuación de regresión es:

### **FIGURA 6.2**

#### **ECUACIÓN DEL MODELO FINAL**

$$\text{Concentracion} = 1825 - 12059 X_1 + 4.05 X_2 + 18822 X_1^2$$

- $X_1$ : Relaciona masa / volumen de etanol
- $X_2$ : Tiempo de extracción

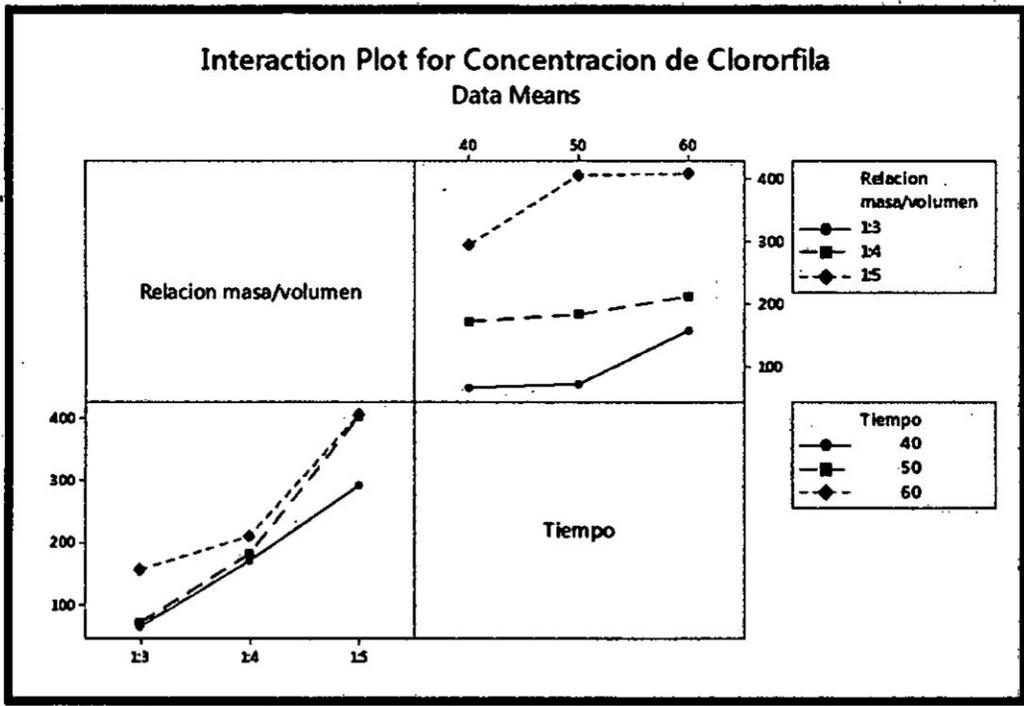
Resumiendo los resultados anteriores (**FIGURA N° 6.1**), podemos concluir que el modelo que se obtiene es el óptimo, pues éste nos brinda un  $R^2$  de 96.46% para la ecuación del modelo final (**FIGURA 6.2**) y tiene un valor "p" relativamente pequeño, lo cual indica que el ajuste a los datos es bueno.

El  $R^2$  explica en un 96.46% el ajuste a los datos. Además el valor para  $R^2$  (*pred*) nos dice que éste modelo tiene una capacidad predictiva del 82.07%.

- Interpretación de gráficos

En el **GRÁFICO 6.1** de interacción de variables las líneas no son paralelas. Este efecto de interacción indica que no existe relación directa entre las variables

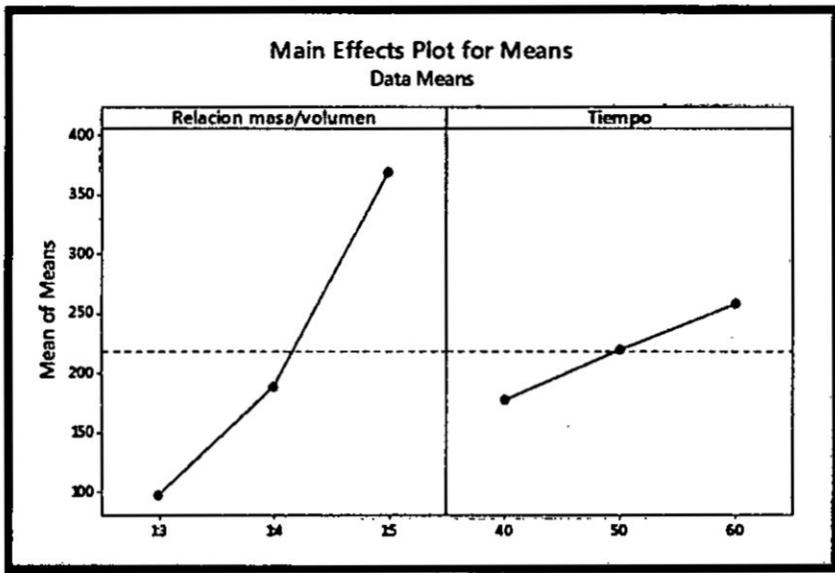
**GRÁFICO 6.1**  
**INTERACCIÓN DE VARIABLES PARA LA OBTENCIÓN DE**  
**CLOROFILA**



El **GRÁFICO 6.2** de efectos refleja que de las dos variables, la relación masa/volumen es la de mayor influencia para la obtención de clorofila.

**GRAFICO 6.2**

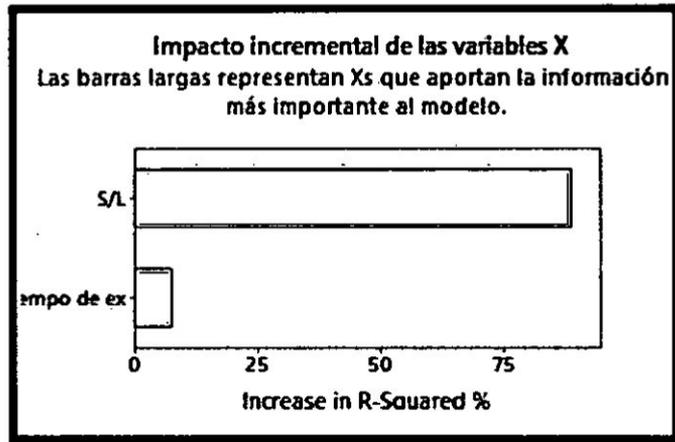
**EFFECTO DE VARIABLES PARA LA OBTENCIÓN DE CLOROFILA**



El **GRÁFICO 6.3** reafirma el impacto que tiene la variable de relación masa / volumen de solvente sobre el resultado de obtención de clorofila.

### GRÁFICO 6.3

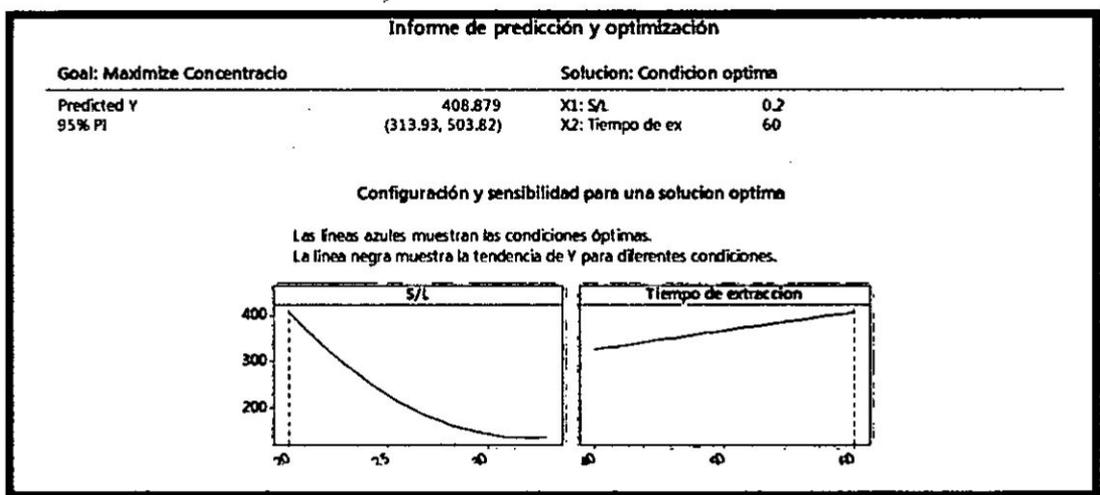
#### IMPACTO INCREMENTAL DE LAS VARIABLES



La FIGURA 6.3 refleja el resumen del análisis de resultados óptimos para la obtención de clorofila.

### FIGURA 6.3

#### CONDICIONES FAVORABLES PARA LA OBTENCIÓN DE CLOROFILA



## VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar posteriores estudios para el aprovechamiento del residuo de hoja de remolacha obtenido después de la extracción de clorofila.
- Profundizar en la evaluación de otros solventes o mezclas de estos.
- No exponer la muestra por mucho tiempo a la luz, ya que es sensible y se degrada fácilmente.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, David y otros. **Introducción a la cromatografía.** Primera edición. España: Editorial Alambra, 121pp, 1970.
2. AMARAL, A. y otros. **Resíduo de plantas de cobertura e mobilidade dos produtos da dissolução do calcário aplicado na superfície do solo.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, 28(1), 115-123. 2004.
3. AMARO, Daniel y otros. **Escalado del proceso de obtención de concentrado clorofila-caroteno a partir de pinus caribaea morelet.** Revista Forestal Baracoa no. 1. Junio 2004
4. AOAC. **Official methods of analysis.** AOAC International. William Horwitz, Ed. Washington, DC. EEUUA. 2000.
5. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.** 15th Ed. Washington, D.C. US Government Printing Office, 1990.

6. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.** 11th Ed. Washington, D.C. US Government Printing Office, 1970.
7. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.** 12th Ed. Washington, D.C. US Government Printing Office, 1985.
8. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.** 14th Ed. Arlington, VA, 834, 1984.
9. BALCINDE, Yaisme. **Comparación de diferentes métodos de extracción para la obtención de una fracción rica en fitosteroles a partir de la cachaza de caña de azúcar.** Revista CENIC. Ciencias Químicas, vol. 36, núm. 1, pp. 6-8 Centro Nacional de Investigaciones Científicas. La Habana, Cuba, 2005.
10. BEKBOG LET, M. **Light effects on food.** Journal of Food Protection, v.53, p.430-440, 1990.

11. BARROSO, G.F. **BMLP - Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura**. Programa de Monitoramento Ambiental. Protocolo para Análise de clorofila a e feopigmentos pelo método fluorímetro TD - 700. Vitória, Espírito Santo, p.1 2, 1998.
12. BIDWELL, R.G.S. **Fisiología vegetal. Primera edición**. México, D.F.:A.G.T. editor, S.A., 784pp, 1990.
13. BREINHOLT, V y otros. **Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in rainbow trout**. Estados Unidos, Cancer Res; pp: 55,57-62. 1995.
14. CALDAS, Adriana. **Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción Sólido – Líquido**. Tesis para licenciatura en Ingeniería Química. Cuenca. Universidad de Cuenca. 2012.
15. CARDENAS, Angelica y otros. **Extracción de aceite de Cacahuete**. Tesis para licenciatura en Ingeniería Química. México. Universidad Autónoma Metropolitana. 2007.
16. CARDOSO DE OLIVEIRA, Ricardo y otros. **Effect of process variables on the oil extraction from passion fruit seeds by**

**conventional and nonconventional techniques.** Acta Scientiarum. Technology, vol. 36, núm. 1, pp. 87-91. Enero-Marzo 2014.

17. CRONQUIST, Arthur. **Botánica Básica.** Primera edición. México, D.F.: Compañía Editorial Continental, S.A., 655pp, 1987.
18. D.L. Pavia y otros. **Química Orgánica Experimental.** Ed.Universitaria de Barcelona Eunibar, 1978.
19. DAVIES, B. H. **Carotenoids in Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.** T. W. GOODWIN, 2nd Ed., Academic Press, London, v.2, p.38-165, 1976.
20. ESPIN, Jhorky. **Elaboracion de galletas de sal enriquecidas con Clorofila.** Chimborazo, Ecuador. Escuela superior de Chimborazo. 2011.
21. ESAU, Katherine. **Anatomía vegetal.** Primera edición. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 729pp, 1959.

22. FAO/WHO. **Risk management and food safety.** Report of a joint FAO/WHO consultation, Rome, Italy, 27±31 January. FAO Food and Nutrition Paper No. 65. 1997.
23. FONTQUER, P. **Plantas medicinales.** Editorial Labor, s. ed. 1961.
24. GONZALEZ, Mario y otros .**Crema epitelizante de clorofila, carotenos y vitaminas aplicada en heridas abiertas experimentales.** Revista Cubana Medica Militar, [línea]. Oct.-nov. 2001, vol.30, no.4, p.236-240. Agosto 2007.
25. HACH , C. y otros. **A powerfull Kjeldahl nitrogen method using peroxy monosulfuric acid.** J. Agric. Food Chem. v.33, p.1117-1123, 1985.
26. HOLDEN, M. **Chlorophylls in Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.** T. W. GOODWIN, 2nd Ed., AcademicPress, London, v.2, p. 2-37, 1976. Abbott. Introducción a la cromatografía. Editorial Alambra S.A. Segunda Edición Española, 1970.

27. **ISO Water quality measurement of biochemical parameters spectrophotometric determination of chlorophyll-a concentration.** Ginebra, International Organization for Standardization: 1-6, 1992.
28. **LARBALETRIER, W. Pequeña enciclopedia de agricultura.** Editorial Maxtor Madrid. pp. 6-7, 1901.
29. **LOPEZ, Juan. Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilesteres de ácidos grasos.** Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología. Escuela de química. 23, 24, 25. Pereira. 2008.
30. **MARTÍNEZ, R. y otros. Determinación del momento óptimo de trasplante en el cultivo de la remolacha (Beta vulgaris L).** Ciencias Holguín 11(4): 1-5. 2005.
31. **MATISSEC R.; SCHNEPEL F. M, STEINER, G., Análisis de los alimentos: Grasas y sustancias acompañantes.** Berlín, Alemania, Editorial: Springer-Verlag. GMBH & Co, KG. 1992.
32. **Métodos cromatográficos.**

<http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia>. Octubre 11 de 2009.

33. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO DEL PERÚ (MINAGRI). **Anuario Agrícola - Ganadera 2016**. Agosto 2017.
34. Métodos de extracción para la separación cuantitativa de sustancias mediante solventes. <http://www.textoscientificos.com> Octubre 10, de 2009.
35. MONTOYA, Humberto. **Manual del Laboratorio de Análisis de Alimentos**. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Programa de Tecnología Química. Pereira, 4, 26, 47,54. Enero de 2007.
36. NAUS, J y otros. **Spad chlorophyll meter reading can be pronouncedly affected by chloroplast movement**. Photosynthesis Research. 105 (3) 265-271. Septiembre 2010.
37. NUSCH, E. A. **Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination**. 1980.
38. PEARSON, D. **Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos**. Editorial Acribia. Zaragoza, España. Cap. 12, 1976.

39. PEDRERO, D. F. **Evaluación sensorial de los alimentos.** Ed. Alhambra. México D.F. México. 1989.
40. PERRY, Robert y CHILTON, Cecil. **Manual del Ingeniero Químico.** Volumen 1. Segunda edición. México: McGraw-Hill, 1982.
41. R. CELA y otros. **Técnicas de Separación en Química Analítica,** Ed. Síntesis, Madrid. Julio 2011.
42. STREIT, Nivia. **As Clorofilas.** Ciência Rural, vol. 35, núm. 3, pp. 748-755. Brasil Mayo, 2005.
43. SCHWARTZ, S. J. **Chlorophylls in foods.** Revisit Food Sci. Technol. Estados Unidos, pp:1-17, 1990.
44. SKOOG. HOLLER. NIEMAN. **Principios de análisis instrumental.** Quinta edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. Cap 20. 537-573, 2001:
45. SCHOEFS B. **Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of**

**analysis.** Trends in Food Science & Technology, v.I3, p.361-371, 2002.

46. **Técnicas de extracción con disolventes orgánicos.**  
<http://www.textoscientificos.com>. Octubre 17 de 2009.
47. VANDER D.A y otros. **Plant products as potencial antiviral agents.** Bull Ints Pasteur 1986; 844: 101-105. BIDWELL, R.G.S. *Fisiología vegetal*. Primera edición. México, D.F.A.G.T. editor, S.A., 784pp, 1990.
48. VIEIRA, G. **Gap dynamics in managed Amazonian forest: Structural and ecophysiological aspects.** Tese (Doutorado em Ecologia Tropical) - University of Oxford, Grã-Bretanha. 1996.
49. VON ELBE J.H. **Colorantes.** FENNEMA, O.W. Química de los alimentos. 2.ed. Zaragoza: Wisconsin - Madison, Cap.10, p.782-799. 2000.
50. VILMORIN **"Cultivo de remolacha"**. Disponible en: <http://www.vilmorin.com/index.htm?>, 2009.

51. XU, H. y otros. **Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v.98, n.24, Noviembre 2001.

# **ANEXOS**

**MATRIZ DE CONSISTENCIA**  
**CONDICIONES FAVORABLES PARA LA OBTENCIÓN DE CLOROFILA A PARTIR DE LAS HOJAS DE REMOLACHA (*Beta Vulgaris L.*) MEDIANTE EQUIPO SOXHLET MODIFICADO**

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
¿Cuáles son las condiciones favorables para la obtención de Clorofila a partir de las hojas de Remolacha ( <i>Beta Vulgaris L.</i> ) mediante Equipo Soxhlet modificado?	Determinar las condiciones favorables para la obtención de Clorofila a partir de las hojas de Remolacha ( <i>Beta Vulgaris L.</i> ) mediante equipo Soxhlet modificado.	Las condiciones favorables para la obtención de Clorofila a partir de las hojas de Remolacha ( <i>Beta Vulgaris L.</i> ) mediante equipo SOXHLET modificado son relación masa/volumen 1:5 y 60 min de extracción.	Y = Condiciones favorables para la obtención de Clorofila a partir de las hojas de Remolacha ( <i>Beta Vulgaris L.</i> ) mediante equipo Soxhlet modificado	Relación masa / Volumen de etanol Tiempo de Extracción Temperatura	g /mL  min  °C	Método de extracción Soxhlet.
SUB – PROBLEMA	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLES INDEPENDIENTES	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
a. ¿Cuáles son las Características Físicas y Químicas de la hoja de Remolacha ( <i>Beta Vulgaris L.</i> ) usada para la obtención de Clorofila?	a. Determinar las Características Físicas y Químicas de la hoja de Remolacha ( <i>Beta Vulgaris L.</i> ) usada para la obtención de Clorofila.	Las características físicas y químicas que presentan las hojas de remolacha <i>Beta Vulgaris L.</i> son: porcentaje de materia seca, porcentaje de nutrientes y porcentaje de cenizas.	X <sub>2</sub> = Características Químicas y Físicas de la hoja de Remolacha ( <i>Beta Vulgaris L.</i> ) usada para la obtención de Clorofila	% Materia Seca % de nutrientes % cenizas	% % %	PEC-022 PEC-009 PEC-012
b. ¿Cuáles son los valores experimentales de la extracción de la clorofila de las hojas de remolacha con el equipo Soxhlet modificado?	b. Obtener los valores experimentales de la extracción de la clorofila de las hojas de remolacha con el equipo Soxhlet modificado.	Los valores experimentales más importantes de la extracción de clorofila de las hojas de remolacha con el equipo Soxhlet modificado son la relación masa/volumen y el tiempo de extracción.	X <sub>1</sub> = Valores experimentales de la extracción de la clorofila de hojas de remolacha con el Equipo Soxhlet modificado.	Relación masa / Volumen de etanol Tiempo de Extracción	g /mL  min	Método de extracción Soxhlet.
c. ¿Cuáles son las Características Físicas y Químicas de la Clorofila obtenida de las hojas de Remolacha ( <i>Beta Vulgaris L.</i> )?	c. Determinar las Características Físicas y Químicas de la Clorofila obtenida de las hojas de Remolacha ( <i>Beta Vulgaris L.</i> ).	Las características que presenta la clorofila son: concentración de clorofila en extracto y composición nutricional.	X <sub>3</sub> = Características Químicas y Físicas de la Clorofila obtenida de las hojas de Remolacha ( <i>Beta Vulgaris L.</i> )	Concentración de clorofila en extracto Composición nutricional	mg/L  % de nutrientes	SM 10200 H  PEC-009



## INFORME DE ENSAYO

Análisis:	Extracto alcohólico y vegetal	Registrada en:	AGO PERU	Ciente:	JONATHAN EDUARDO QUIROZ JULCA
		Centro Análisis:	AGO PERU		
				Domicilio:	AV. LOS INSURGENTES 2057 – BELLAVISTA – CALLAO
Tipo Muestra:	Extracto alcohólico y vegetal	Fecha Recepción:	14/12/2017		
Fecha Inicio:	14/12/2017	Fecha Fin:	20/12/2017	Contrato:	—
				Ciente 3°:	—

Muestreado por:	El cliente
PNT Muestreo	—

A continuación se exponen el Informe de Ensayo y Anexo Técnico asociados a la muestra, en los cuales se pueden consultar toda la información relacionada con los ensayos realizados.

Los Resultados emitidos en este informe, no han sido corregidos con factores de recuperación. Siguiendo el protocolo recogido en nuestro manual de calidad, AGQ guardará bajo condiciones controladas la muestra durante un periodo determinado después de la finalización del análisis. Una vez transcurrido este periodo, la muestra será eliminada. Si desea información adicional o cualquier aclaración, no dude en ponerse en contacto con nosotros.

Yoel Ifigo Guizado, CQP 826  
Director de Laboratorio  
AGQ Perú SAC

Fecha Emisión: 20/12/2017

### Observaciones:

Muestra trabajado de manera específica según la solicitud del cliente.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como un certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

AGQ PERU S.A.C

Av. Santa Rosa 511, La Perla - Caño Lirio, Lima, PERU. T: (511) 710 27 00 F: (511) 718 30 94 [operacionesperu@agq.com.pe](mailto:operacionesperu@agq.com.pe) [www.agqlabs.pe](http://www.agqlabs.pe)

**RESULTADOS ANALITICOS**

N° de Referencia:		V-17231701
Código/descripción del cliente		HOJA DE REMOLACHA
Cantidad de muestra		500 g
Fecha muestreo		14/12/2017
Hora muestreo		NI
Parámetro	Unidades	Resultado
<b>Metales</b>		
Boro B	mg/Kg	64.3
Calcio Ca	%	2.56
Cobre Cu	mg/Kg	16.3
Hierro Fe	mg/Kg	1286.4
Potasio K	%	3.17
Magnesio Mg	%	1.67
Manganeso Mn	mg/Kg	480.9
Mercurio Hg	mg/Kg	<L.C
Sodio Na	mg/Kg	15229
Fósforo P	%	0.5
Azufre S	%	0.84
Zinc Zn	mg/Kg	95.8
<b>Factores Químicos</b>		
Materia seca	%	18.85
Ceniza	%	23.79

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como un certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

AGQ PERU S.A.C

Av. Santa Rosa 511 La Perla - Callao Lima, Lima, PERU. T: (511) 710 27 00 F: (511) 718 30 94 [operacionesperu@agq.com.pe](mailto:operacionesperu@agq.com.pe) [www.agq.com.pe](http://www.agq.com.pe)

**RESULTADOS ANALITICOS**

N° de Referencia:		EX-17221701	EX-17221702	EX-17221703	EX-17221704	EX-17221705
Código/descripción del cliente		Extrato atómico (1)	Extrato atómico (2)	Extrato atómico (3)	Extrato atómico (4)	Extrato atómico (5)
Relación masa/volumen (g/mL)		1/5	1/5	1/5	1/3	1/4
Tiempo de Extracción (min)		40	60	60	60	40
Fecha muestreo		02/12/2017	02/12/2017	03/12/2017	03/12/2017	03/12/2017
Hora muestreo		16:14	18:27	12:51	12:46	14:02
Parámetro	Unidades	Resultado				
<b>Flujo Químicos</b>						
Clorofila A	mg/L	293.8	477.2	404.3	70.38	172.2

N° de Referencia:		EX-17221706	EX-17221707	EX-17221708	EX-17221709
Código/descripción del cliente		Extrato atómico (6)	Extrato atómico (7)	Extrato atómico (8)	Extrato atómico (9)
Relación masa/volumen (g/mL)		1/3	1/3	1/4	1/4
Tiempo de Extracción (min)		60	40	60	60
Fecha muestreo		09/12/2017	09/12/2017	10/12/2017	10/12/2017
Hora muestreo		15:45	17:32	12:17	12:21
Parámetro	Unidades	Resultado			
<b>Flujo Químicos</b>					
Clorofila A	mg/L	156.6	66.00	211.0	183.7

N° de Referencia:		EX-17221702
Código/descripción del cliente		Extrato atómico (2)
Relación masa/volumen (g/mL)		1/5
Tiempo de Extracción (min)		60
Fecha muestreo		02/12/2017
Hora muestreo		18:27
Parámetro	Unidades	Resultado
<b>Metales</b>		
Boro B	mg/L	0.2167
Calcio Ca	mg/L	0.7250
Cobre Cu	mg/L	0.0520
Hierro Fe	mg/L	0.0319
Potasio K	mg/L	153.20
Magnesio Mg	mg/L	6.0941
Manganeso Mn	mg/L	0.0008
Nitrógeno NO	mg/L	0.0003
Sodio Na	mg/L	121.2
Fósforo P	mg/L	18.00
Azufre S	mg/L	33.44
Zinc Zn	mg/L	1.265



## INFORME DE ENSAYO

### ANEXO TÉCNICO

Parámetro	PNT	Técnicas
<b>Parámetros Físico Químicos</b>		
Metales	PEC-009	ICP-OES
Clorofila A	SM 10200 H	UV-Vis
Materia seca	PEC-022	Gravimétrico
Cenizas	PEC-012	Gravimétrico

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como un certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

AGQ PERU S.A.C

Av. Santa Rosa 511 La Perla - Calleo Lima, Lima, PERU. T: (511) 710 27 00 F: (511) 710 30 94 [operacionesperu@agq.com.pe](mailto:operacionesperu@agq.com.pe) [www.agqlabs.pe](http://www.agqlabs.pe)