

MÁSTER
QUÍMICA AVANZADA APLICADA
SEPTIEMBRE 2012

*“Aplicaciones de la Técnica Extracción con
Fluidos Supercríticos en Química Bioinorgánica”*

ISABEL FERNÁNDEZ GARCÍA

Directores

Antonio Valverde García

Ana M^a Aguilera del Real

INDICE

<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	3
1.1. Características de las clorofilas	4
1.2. Extracción con fluidos supercríticos	7
1.3. Espectrofotometría de absorción	12
<u>2. DESCRIPCIÓN DE LA PRÁCTICA PROPUESTA</u>	14
2.1. Descripción de la práctica.....	14
2.2. Objetivos didácticos	16
2.3. Guión de laboratorio	17
<u>3. REFERENCIAS</u>	21
<u>4. BIBLIOGRAFÍA</u>	23

1. INTRODUCCIÓN

La investigación científica que se ha llevado a cabo en las últimas décadas ha demostrado el papel que desempeñan ciertos componentes químico- nutricionales en la prevención y tratamiento de muchas enfermedades. Actualmente, hay una demanda creciente de compuestos que ayuden a mejorar la calidad de vida de los consumidores. Dentro de este tipo de compuestos, los más estudiados son aquellos que se relacionan con la prevención o cura de enfermedades crónicas y cáncer, principalmente los que tienen función antioxidante.

Por otra parte, los aditivos juegan un papel muy importante en la industria alimentaria de hoy. Los aditivos sintéticos se han empleado en alimentos durante décadas para su conservación pero actualmente hay un creciente rechazo por parte de los consumidores hacia el uso de aditivos sintéticos. Por ello, se ha potenciado el empleo de antioxidantes naturales, libres de compuestos químicos sintéticos, como los ácidos fenólicos, los flavonoides y los tocoferoles.

Los métodos tradicionales de extracción de ingredientes naturales utilizan cantidades altas de solventes tóxicos, son muy laboriosos y tienen poca selectividad, lo cual no permite obtener los productos naturales que los consumidores están buscando.

Una alternativa a los métodos de extracción clásicos es la extracción por medio de fluidos supercríticos. El empleo de CO₂ supercrítico para realizar extracciones está reconocido como una tecnología limpia porque permite producir aditivos de alta calidad como aromas, colorantes o antioxidantes. Además, presenta una serie de ventajas sobre las extracciones clásicas como la extracción con disolventes o destilación con vapor, ventajas relacionadas principalmente con las suaves temperaturas y la atmósfera inerte que emplea el CO₂, lo que permite mantener las propiedades nutricionales y funcionales intactas.

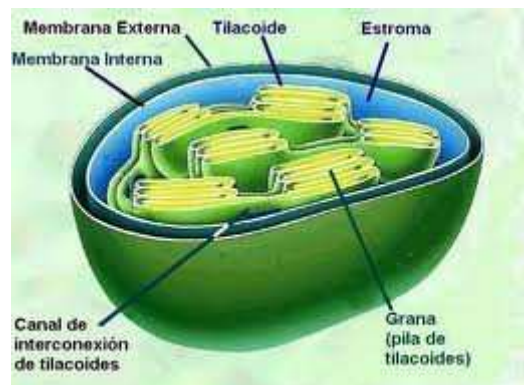
Los bioelementos son aquellos elementos que están presentes en los seres vivos en concentraciones muy bajas pero que sin embargo son imprescindibles para la vida. Los compuestos de los que forman parte estos bioelementos reciben el nombre de compuestos bioinorgánicos. Uno de estos compuestos es la clorofila presente en todas las plantas superiores. Su extracción y cuantificación ha sido objeto de diferentes estudios. Su importancia radica en que es imprescindible para la realización de la fotosíntesis. Sin embargo, también presenta múltiples beneficios para el ser humano.

El objetivo de este trabajo es plantear una práctica de laboratorio en la que se extraiga y cuantifique un compuesto bioinorgánico, la clorofila concretamente, por medio de la técnica de extracción con fluidos supercríticos.

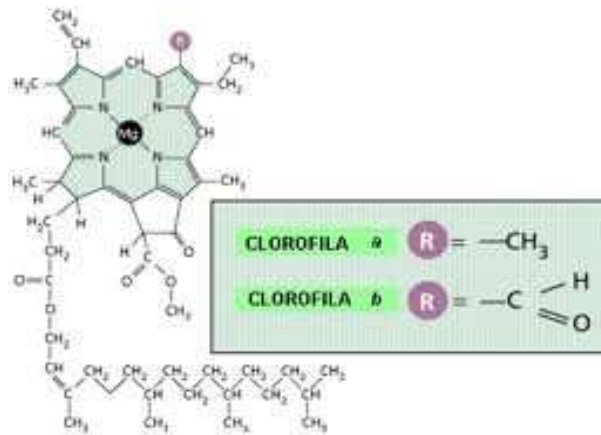
1.1.-CARACTERÍSTICAS DE LAS CLOROFILAS.

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.

En las plantas, existen dos formas de clorofila que presentan ligeras diferencias, llamadas *clorofila a* y *clorofila b*, aunque también hay otras variantes de la clorofila presentes en algunas algas y bacterias. Estos tipos de clorofila forman parte de la membrana de los tilacoides, sáculos apilados que se encuentran en el interior de los orgánulos encargados de la fotosíntesis, los cloroplastos.



Su estructura consta de cuatro anillos pirrólicos que forman un macrociclo con diversos sustituyentes laterales. Los pirroles, a través de sus átomos de nitrógeno, forman en el centro del anillo un complejo con el catión Mg^{2+} quedando una estructura casi plana. En el anillo IV se encuentra un residuo de ácido propanoico, esterificado con un alcohol de veinte átomos de carbono (fitol). La única diferencia en la estructura de las clorofilas a y b, es que la primera presenta en el anillo II un grupo metilo, y la segunda un formilo.

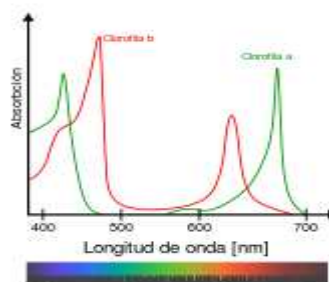


Estructura de las clorofilas *a* y *b*

Un tetrapirrol que por sí mismo forma un anillo cerrado recibe el nombre de porfirina. Una metalporfirina tiene en su centro un átomo metálico. Así que la clorofila se puede definir como una metalporfirina de magnesio.

En la formación de la clorofila también se emplea hierro, en una forma que 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.

El color verde de las clorofilas es debido a que absorben luz de manera principal hacia los dos extremos del espectro visible. Así, el espectro típico de las clorofilas presenta dos picos de absorción, uno en el entorno de la luz azul (400- 500nm) 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.



Espectro de absorción de las clorofilas

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 común de varios compuestos que tienen una relación estrecha entre sí, teniendo todos 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 de colores que van del amarillo al rojo o tirando al pardo, tienen ciertas características estructurales y químicas en común y se denominan de forma general *pigmentos carotenoides*.

Acciones de la clorofila en el ser humano

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 y ayuda a eliminar los olores provocados por la transpiración.

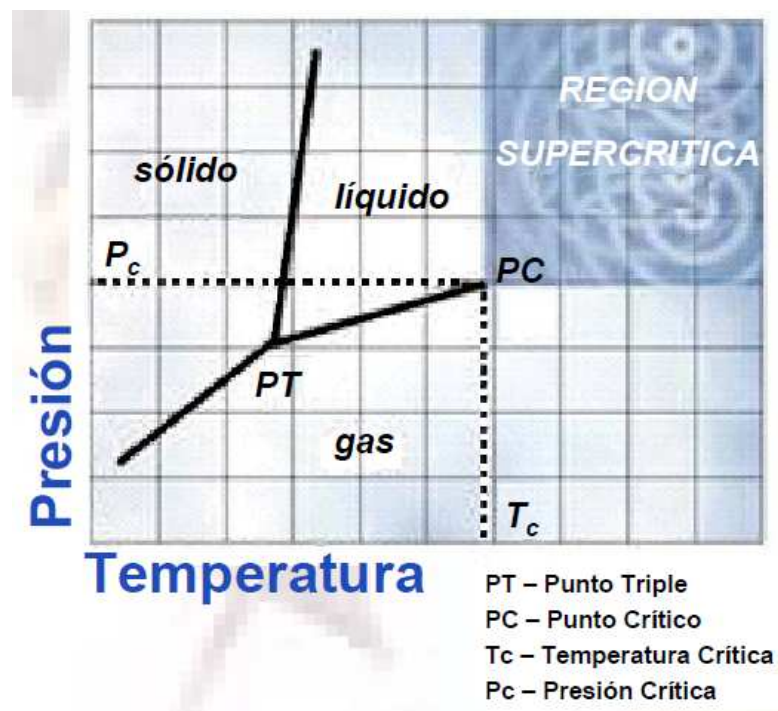
Además:

- Ayuda a eliminar los olores provocados por la transpiración, ya que posee acción antioxidante.
- Nutre y fortalece los sistemas circulatorios e intestinal y ayuda a equilibrar nuestro organismo.
- La clorofila posee potencial anticarcinogénico y antimutagénico, puede ayudar a proteger contra algunas toxinas y pueden mejorar los efectos secundarios de algunos fármacos.
- Es efectiva en la reducción del dolor urinario y fecal, en algunas circunstancias pueden ayudar a aliviar el estreñimiento.
- Es beneficiosa en el tratamiento de piedras de oxalato cálcico.

1.2. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS: GENERALIDADES Y CASO PARTICULAR DE LAS CLOROFILAS EN ESPINACAS.

Todas las sustancias están caracterizadas por un diagrama de fases que permite conocer el estado de agregación de la misma a cualquier valor de presión y temperatura. Estos diagramas están definidos al menos por tres líneas, la línea de fusión, la de sublimación y la de vaporización, que vienen determinadas por el conjunto de parejas de valores de presión y temperatura a los cuales se produce el correspondiente cambio de estado. La línea de vaporización, al contrario de las otras dos, presenta la particularidad de desaparecer en un punto del diagrama, llamado *punto crítico*, a una presión y una temperatura que se denominan *presión crítica* y *temperatura crítica* (P_c y T_c).

Cuando un fluido se somete a condiciones por encima de su temperatura y presión críticas no puede licuarse por mucho que se aumente la presión, así como tampoco se vaporiza al aumentar su temperatura. En esta zona del diagrama la sustancia no puede ser considerada ni como un gas ni como un líquido y se decide que se encuentra en un estado supercrítico, es decir, es un fluido supercrítico.



Los valores de ciertas propiedades de los fluidos supercríticos son intermedios entre la de los líquidos y las de los gases:

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

La principal característica de los fluidos supercríticos es que poseen una densidad similar a la de los líquidos y por tanto similares propiedades disolventes, ya que ambas características están directamente relacionadas. Sin embargo, su viscosidad es mucho menor (entre 5 y 20 veces menor), lo que dota a los fluidos supercríticos de una gran facilidad de transporte y de una velocidad de transferencia de masa. Además, su elevada difusividad les permite una mejor penetración en las matrices sólidas. Así, las extracciones con fluidos supercríticos son tan completas como las llevadas a cabo con disolventes líquidos pero mucho más rápidas y eficaces.

Otra propiedad importante de los fluidos supercríticos es que su densidad está estrechamente relacionada con la presión y, en menor medida, con la temperatura. A temperatura constante, la densidad de un fluido supercrítico aumenta notablemente al aumentar la presión, mientras que a presión constante la densidad disminuye al aumentar la temperatura. Esta propiedad hace posible modificar fácilmente la capacidad de solvatación de un determinado fluido supercrítico sobre un analito mediante un cambio de presión y/o temperatura. Esto significa que se puede llevar a cabo la extracción selectiva de diferentes tipos de analitos cambiando la densidad del fluido, lo que puede conseguirse con un simple cambio de la presión de extracción.

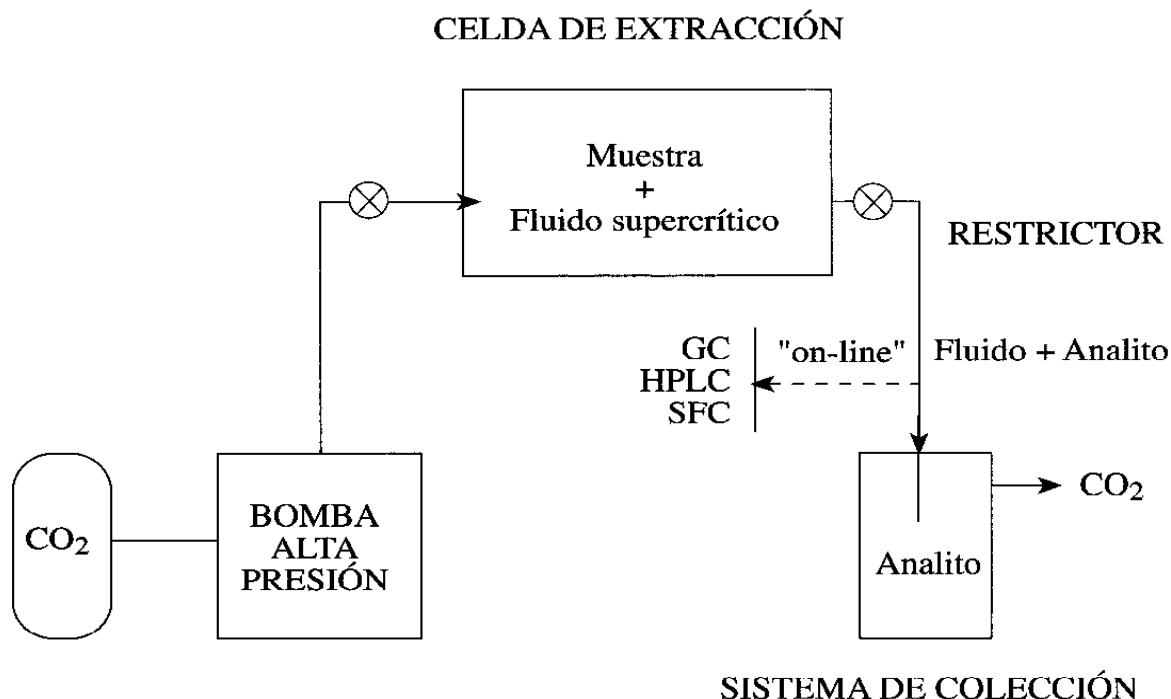
Otra ventaja adicional de la extracción con fluidos supercríticos tiene lugar cuando el fluido utilizado es gas a la presión atmosférica, de forma que se puede dejar escapar a la atmósfera el agente extractor después de la etapa de extracción, recogiendo los analitos en un pequeño volumen de disolvente. Esto permite llevar a cabo las extracciones sin utilizar prácticamente disolventes orgánicos y obtener extractos finales listos para ser analizados sin necesidad de efectuar etapas de concentración.

Sin duda, el fluido supercrítico más utilizado es el CO₂. Sus principales ventajas, además de ser gas a temperatura ambiente, son las siguientes:

- ✓ Parámetros críticos muy accesibles: 31° C y 73 atm.
- ✓ Baja temperatura crítica: muy ventajosa para extraer productos naturales sin que ocurra degradación térmica.
- ✓ Baja toxicidad
- ✓ No es inflamable
- ✓ Es bastante inerte desde el punto de vista químico
- ✓ Puede adquirirse con un alto grado de pureza y bajo coste

La principal desventaja de CO₂ supercrítico es su carácter no polar, lo que hace que pueda ser no adecuado para extraer analitos polares, como es el caso de las clorofilas. Sin embargo, esta limitación se supera mediante la adición de pequeñas cantidades de un disolvente orgánico polar llamado modificador o codisolvente. Este modificador no sólo altera las propiedades del fluido supercrítico sino que también actúa sobre la matriz de la muestra favoreciendo la desorción de los analitos adsorbidos en los centros activos de la matriz.

La instrumentación necesaria para realizar una extracción con fluidos supercríticos es bastante simple. Básicamente, el sistema de extracción consiste en una bomba de alta presión, una celda de extracción, una zona en la que se produce la descompresión del fluido, y por último, un sistema adecuado de colección de los analitos. El extractor propiamente dicho consta de una o varias celdas de extracción, donde se sitúa la muestra, y de un sistema adecuado que permite fijar y mantener la temperatura del fluido durante toda la etapa de extracción. El tamaño de estas celdas de extracción varía ampliamente, aunque los volúmenes oscilan entre 0,5 y 10 mL, por lo que el tamaño de la muestra en esta técnica suele ser mucho más pequeño que el empleado en las extracciones convencionales.



Esquema de un sistema de extracción SFE

La parte del equipo donde se produce la descompresión del fluido (restrictor) suele consistir en un tubo capilar de pequeño diámetro interno, metálico o de sílice fundida. Su temperatura suele estar termostatazada con el fin de evitar que los analitos extraídos precipiten dentro de él.

El sistema para utilizado para recoger los analitos puede consistir en un vial o tubo de ensayo conteniendo un pequeño volumen de disolvente orgánico, en el que se hace burbujear el fluido a la salida del restrictor, o en sistemas más complejos. Una vez finalizada la extracción, los extractos obtenidos pueden pasar a ser analizados sin necesidad de realizar posteriores etapas de concentración.

La extracción con fluidos supercríticos puede llevarse a cabo de forma estática o dinámica. En la forma estática, la celda de extracción es presurizada con el fluido manteniendo cerrada la válvula de salida del extractor y cuando finaliza la extracción se abre dicha válvula y pasa el fluido con los analitos extraídos al sistema de colección. En la forma dinámica, el fluido fluye de forma continua a través de la celda de extracción. Esta forma permite una mayor penetración del fluido en los poros de la matriz de muestra, así como el que se pueda alcanzar el equilibrio de reparto del analito entre la matriz y el fluido. Por esta razón, las extracciones suelen realizarse de forma estática y seguidas de un período de extracción dinámica.

En cuanto al uso de los modificadores, también se pueden adicionar de dos formas. La más sencilla consiste en añadir el modificador directamente a la muestra inmediatamente antes de la extracción (adición estática). Y la otra es utilizar un fluido modificado previamente (adición dinámica), el cual puede adquirirse ya preparado o adquirirlo in situ usando una segunda bomba de presión.

Extracción de clorofilas en espinacas con CO₂ supercrítico.

Según L. Álvarez [1] es posible obtener metabolitos, clorofila entre ellos, a partir de hojas secas de espinaca mediante una extracción con CO₂ supercrítico. Se analizaron muestras extraídas utilizando tres distintas presiones (1200, 1350 y 1500 PSI) a partir de material vegetal con dos tamaños distintos de partícula y se determinó la presencia de metabolitos por medio de un barrido en un espectrofotómetro UV-VIS. Este barrido se compara con el barrido teórico de la clorofila, determinando la presencia de este metabolito en los extractos obtenidos. Además, los resultados obtenidos muestran que sí es posible la extracción con CO₂ supercrítico, determinando que no existe diferencia significativa en el rendimiento de metabolitos al utilizar dos tamaños de partícula diferentes, para un mismo material vegetal con tiempo de residencia y temperatura variable.

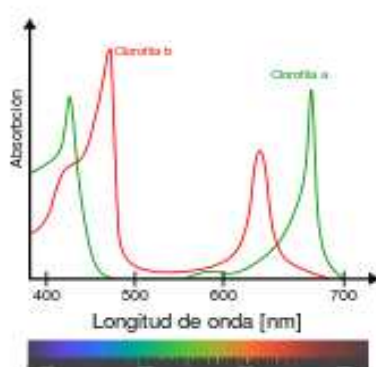
Las características del proceso de extracción fijadas por L. Álvarez se tomarán como referencia a la hora de proponer la práctica objeto de este trabajo y son las siguientes:

- ✓ Extracción estática
- ✓ Temperatura de trabajo: 40° C
- ✓ Uso de etanol como modificador estático

1. 3. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN.

Esta técnica mide la intensidad de la absorción de radiación electromagnética de una sustancia, a diversas longitudes de onda. Cuando la región del espectro utilizada para estas mediciones es la visible, estamos hablando de espectrofotometría de absorción visible.

Una determinada sustancia puede ser analizada mediante espectrofotometría de absorción visible siempre que absorba radiación electromagnética en el rango de longitudes de onda correspondientes a la región visible del espectro (400 a 800 nm). Este es el caso de la clorofila a y la clorofila b, cuyo espectro de absorción muestra dos picos en los extremos de intervalo visible:



Espectro de absorción de las clorofilas

Esta característica permite determinar la presencia o no de clorofilas en una muestra al comparar el espectro de absorción de la muestra con el teórico de las clorofilas. Este procedimiento es el utilizado en trabajo desarrollado por L. Álvarez mencionado anteriormente, en el que se determinaba la presencia de los metabolitos mediante un barrido espectral. La posterior cuantificación se llevaba a cabo utilizando un equipo de HPLC.

La cuantificación de analitos mediante espectrofotometría de absorción requiere el uso de una curva de calibrado. Sin embargo, en la cuantificación de clorofilas y carotenoides no es necesario, puesto que se dispone de ecuaciones que permiten calcular su concentración (J. Val et al. [2]). Estas ecuaciones permiten el cálculo de concentraciones de clorofilas a y b en mezclas complejas mediante lecturas espectrofotométricas. En ellas se hacen intervenir las absorbancias medidas en el extracto de hojas a unas longitudes de onda específicas y presentan varios términos cuya finalidad es minimizar la contribución del resto de componentes que tienen absorción a esa misma longitud de onda.

Desde que en 1949 se publicaran las primeras fórmulas para el cálculo de clorofilas en extractos de acetona (D. Arnon [3]), muchos autores (Jeffrey y Humphrey [4], Lichtenthaler y Wellburn [5]) han propuesto diferentes ecuaciones para la determinación de clorofilas en diferentes solventes. Finalmente, en 1994, Alan R Wellburn [6] establece las siguientes ecuaciones para la determinación, en µg/ml, de clorofila a y b y carotenoides totales usando varios solventes y espectrofotómetros de distinta resolución:

Solvent	Spectrophotometer resolution range	
	0.1–0.5 nm	1–4 nm
80 % Acetone	$C_a = 12.25A_{663.2} - 2.79A_{646.8}$ $C_b = 21.5A_{646.8} - 5.1A_{663.2}$ $C_{x+c} = (1000A_{470} - 1.82C_a - 85.02C_b)/198$	$C_a = 12.21A_{663} - 2.81A_{646}$ $C_b = 20.13A_{646} - 5.03A_{663}$ $C_{x+c} = (1000A_{470} - 3.27C_a - 104C_b)/198$
Chloroform	$C_a = 11.47A_{665.6} - 2A_{647.6}$ $C_b = 21.85A_{647.6} - 4.53A_{665.6}$ $C_{x+c} = (1000A_{480} - 1.33C_a - 23.93C_b)/202$	$C_a = 10.91A_{666} - 1.2A_{648}$ $C_b = 16.38A_{648} - 4.57A_{666}$ $C_{x+c} = (1000A_{480} - 1.42C_a - 46.09C_b)/202$
Diethyl-ether	$C_a = 10.05A_{660.6} - 0.97A_{642.2}$ $C_b = 16.36A_{642.2} - 2.43A_{660.6}$ $C_{x+c} = (1000A_{470} - 1.43C_a - 35.87C_b)/205$	$C_a = 10.05A_{662} - 0.77A_{644}$ $C_b = 16.37A_{644} - 3.14A_{662}$ $C_{x+c} = (1000A_{470} - 1.28C_a - 56.7C_b)/205$
Dimethyl-formamide	$C_a = 12A_{663.8} - 3.11A_{646.8}$ $C_b = 20.78A_{646.8} - 4.88A_{663.8}$ $C_{x+c} = (1000A_{480} - 1.12C_a - 34.07C_b)/245$	$C_a = 11.65A_{664} - 2.69A_{647}$ $C_b = 20.81A_{647} - 4.53A_{664}$ $C_{x+c} = (1000A_{480} - 0.89C_a - 52.02C_b)/245$
Dimethyl-sulphoxide	$C_a = 12.47A_{665.1} - 3.62A_{649.1}$ $C_b = 25.06A_{649.1} - 6.5A_{665.1}$ $C_{x+c} = (1000A_{480} - 1.29C_a - 53.78C_b)/220$	$C_a = 12.19A_{665} - 3.45A_{649}$ $C_b = 21.99A_{649} - 5.32A_{665}$ $C_{x+c} = (1000A_{480} - 2.14C_a - 70.16C_b)/220$
Methanol	$C_a = 16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4}$ $C_b = 34.09A_{652.4} - 15.28A_{665.2}$ $C_{x+c} = (1000A_{470} - 1.63C_a - 104.96C_b)/221$	$C_a = 15.65A_{666} - 7.34A_{653}$ $C_b = 27.05A_{653} - 11.21A_{666}$ $C_{x+c} = (1000A_{470} - 2.86C_a - 129.2C_b)/221$

En nuestro caso particular, el espectrofotómetro tiene una resolución de 1nm, así que las ecuaciones a utilizar son:

$$C_a = 15,65 \cdot A_{666} - 7,34 \cdot A_{653}$$

$$C_b = 27,05 \cdot A_{653} - 11,21 \cdot A_{666}$$

2. DESCRIPCIÓN DE LA PRÁCTICA PROPUESTA

Fruto de la revisión de los aspectos analizados anteriormente es la práctica que se propone a continuación, dirigida a alumnos y alumnas de la asignatura “*Química inorgánica de los seres vivos*” del Master en Química Avanzada Aplicada. Experimentalmente, esta práctica tiene tres objetivos:

1. Estudiar la influencia del uso de un modificador, metanol en este caso, en el rendimiento de la extracción mediante CO₂ supercrítico de clorofilas en hojas de espinacas.
2. Comprobar la dependencia del rendimiento de la extracción con la presión de trabajo utilizada, determinando la presión óptima de entre varias propuestas.
3. Determinar espectrofotométricamente la concentración de clorofila a y clorofila b en hojas de espinaca.

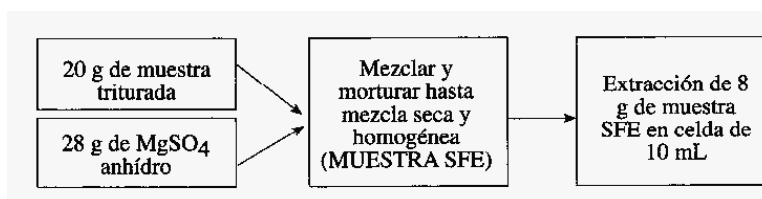
Sin embargo, estos objetivos que se persiguen en el laboratorio no se pueden confundir con otros más amplios, los objetivos didácticos, que se detallarán más adelante.

2.1. DESCRIPCIÓN DE LA PRÁCTICA

a) Tratamiento de la muestra.

La extracción se lleva a cabo a partir de hojas secas de espinaca. En el estudio desarrollado por L. Álvarez las hojas de espinaca se secaban en un secador por convección. Sin embargo, en nuestro caso se va a utilizar el método propuesto por A. Valverde et al. [7] que aumenta la extracción de compuestos polares. Este método consiste en mezclar la muestra triturada con sulfato de magnesio anhidro en proporción 5:7 y morturar hasta mezcla seca y homogénea.

En la siguiente figura aparece un esquema del método propuesto:



b) Extracción con CO₂ supercrítico.

A lo largo de la práctica se hacen diversas extracciones con CO₂ supercrítico y aunque hay algunas variables que cambian de un experimento a otro, hay otras que son comunes a todos. Estas variables que se mantendrán constantes en todas las extracciones son las siguientes:

- ✓ Celda de extracción de 10 mL
- ✓ Tipo de extracción: estática
- ✓ Tiempo de extracción: 30 minutos
- ✓ Temperatura de trabajo: 40° C
- ✓ Sistema de colección: tubos de ensayo opacos graduados de 10 mL inmersos en baño de agua a 15-20 °C . Los extractos se mantienen protegidos de la luz para evitar su oxidación y refrigerados si no se utilizan de inmediato.
- ✓ Disolvente de colección: metanol 95%

c) Influencia en la extracción del uso de un modificador.

Como ya se mencionó anteriormente, la extracción de clorofilas se ve mejorada con el uso de un modificador. Éste no solo mejora la extracción modificando las propiedades del fluido supercrítico sino que también favoreciendo la desorción de los analitos de los centros activos de la matriz.

El modificador a utilizar en este caso es el metanol. Aunque L. Álvarez utiliza etanol como disolvente debido a su baja toxicidad para el ser humano, en nuestro caso el modificador utilizado será metanol, ya que para este disolvente existen ecuaciones matemáticas (A.R. Wellburn [6]) que permiten la cuantificación espectrofotométrica de clorofilas.

Para determinar la influencia o no del modificador en el rendimiento de la extracción se harán dos extracciones sin modificador y otras dos añadiendo 250 µL de metanol a la celda antes de la extracción (modificador estático) y se comprobará la influencia positiva del modificador comparando la absorbancia de los extractos obtenidos a 666 nm, longitud de onda a la cual el espectro de la clorofila a presenta un pico de absorción.

A partir de entonces, en todos los experimentos se agregarán a la celda 250 µL de metanol.

d) Comprobación de la dependencia del rendimiento de la extracción con la presión de trabajo utilizada, determinando la presión óptima de entre varias propuestas.

Una de las variables que más influye en el rendimiento de la extracción con fluidos supercríticos es la presión de trabajo. Para comprobar esta dependencia se realizarán diversas extracciones a distintas presiones propuestas, estimando cualitativamente la cantidad de clorofilas extraídas midiendo la absorbancia de los extractos obtenidos a 666 nm.

Además de comprobar la influencia de la presión de trabajo, este apartado permitirá determinar la presión óptima de extracción de entre varias propuestas.

e) Determinación espectrofotométrica de la concentración de clorofila a y clorofila b en hojas de espinaca.

En los experimentos anteriores se hacía una estimación cualitativa de la clorofila extraída a través de la absorbancia de los extractos a 666 nm. Sin embargo, las medidas de absorbancia permiten cuantificar la concentración en $\mu\text{g/ml}$ de clorofila a y b en el extracto utilizando las ecuaciones propuestas por A. Wellburn, concretamente, las propuestas para el caso de utilizar metanol como disolvente y un aparato con resolución de 1 nm.

Para hacer esta cuantificación se harán cuatro extracciones utilizando metanol como modificador y a la presión óptima determinada en el apartado anterior.

De cada extracto obtenido, se medirá la absorbancia a las longitudes de onda 666 y 653 nm y se determinará la concentración de clorofila a y b, en $\mu\text{g/ml}$, en el extracto, expresándola finalmente como mg de clorofila por gramo de tejido extraído.

2.2. OBJETIVOS DIDÁCTICOS

1. Conocer la implicación de los bioelementos en procesos fundamentales para los seres vivos.
2. Reconocer el anillo porfirínico como estructura base de diversos compuestos bioinorgánicos.
3. Valorar el desarrollo de nuevas técnicas de extracción debido a la creciente demanda de aditivos naturales.

4. Reconocer las ventajas de la extracción SFE como técnica limpia para la extracción de productos naturales frente a la extracción clásica.
5. Familiarizarse con el uso del equipo SFE.
6. Conocer las principales variables que intervienen en una extracción con CO₂ supercrítico así como con el procedimiento de optimización de alguna de ellas.
7. Valorar la utilidad de la cuantificación espectrofotométrica sin necesidad de curva de calibrado.
8. Adquirir destrezas propias del trabajo en el laboratorio de Química.

Para alcanzar estos objetivos el alumnado, además de realizar la parte práctica y analizar los resultados obtenidos, deberá contestar una serie de cuestiones que se le plantean en el guión de la práctica.

2.3. GUIÓN DE LABORATORIO

TÍTULO: Aplicaciones de la técnica de extracción con fluidos supercríticos a la química bioinorgánica: extracción de clorofilas en hojas de espinaca.

Reactivos y aparatos:

- Muestra de hojas de espinacas trituradas.
- Sulfato de magnesio anhidro
- Metanol 95%
- Balanza analítica (precisión: décima de gramo)
- Equipo SFE: bomba de jeringa de alta presión, Isco 260D; Extractor, Isco SFX 2; Cámara de Termostatación del restrictor, Isco; Celdas de extracción de 10 mL, Isco; restrictor capilar de sílice fundida (30 cm · 50 µm); Tubos de ensayo opacos graduados de 10 mL inmersos en baño de agua a 15-20 °C como sistema de colección.
- Equipo espectrofotométrico UV-VIS: UV-1700 Pharmaspec; Rango de medición de λ : 190-1900 nm; Ancho de banda espectral (resolución): 1 nm; Cubetas de vidrio (1 cm).

Preparación de la muestra.

Pesar 20 g de hojas de espinacas trituradas (en balanza de precisión de décima de gramo) y mezclar con 28 g de sulfato de magnesio anhidro. Homogeneizar con ayuda de un mortero.

a. Estudio de la influencia del uso de un modificador.

a) Procedimiento experimental.

- Pesar 8,0 g de la muestra SFE preparada e introducirlos en la celda de extracción de 10 ml. Poner en los dos extremos de la celda sendos filtros de fibra de vidrio. Cerrar la celda.
- Realizar una extracción estática con CO₂ supercrítico a 200 atm y 40° C, manteniendo el sistema cerrado durante 30 minutos para que el CO₂ y la muestra vegetal alcancen el equilibrio.
- Despresurizar el sistema de forma suave para que salga el CO₂ y el metanol con los analitos disueltos. Utilizar como sistema de colección un tubo de ensayo de 10 mL conteniendo 4 mL de metanol, inmerso en un baño de agua a temperatura ambiente.
- Una vez finalizada la extracción, ajustar el extracto SFE obtenido a 3 mL con metanol y guardar el extracto final en un tubo de vidrio opaco provisto de rosca para evitar la oxidación del mismo. Refrigerar si no se utilizan de inmediato.
- Medir la absorbancia a $\lambda=666$ nm del extracto obtenido, utilizando 1 ml para el análisis y metanol como blanco.
- Hacer el experimento por duplicado.
- Repetir el experimento agregando a la celda 250 μ l de metanol como modificador justo antes de la extracción.

b) Resultados.

MUESTRA	g MUESTRA	MODIFICADOR	A ₆₆₆
1		NO	
2		NO	
3		SI	
4		SI	

c) Cuestiones:

- 1.- A la vista de los resultados, ¿tiene alguna influencia el uso de metanol como modificador en la extracción de las clorofilas?
- 2.- Busca en Internet información sobre la estructura de las clorofilas. ¿Qué otros compuestos de vital importancia para los seres vivos tienen una estructura similar?
- 3.- ¿Crees que estará relacionada su estructura con la mejora de su extracción al utilizar un modificador como el metanol?
- 4.- En este caso se ha añadido el modificador a la celda de extracción, ¿de qué otra manera pueden utilizarse?

b. Estudio de la presión del proceso de extracción.

a) Procedimiento experimental.

- Pesar 8,0 g de la muestra preparada e introducirlos en la celda de extracción de 10 ml. Añadir 250 µL de metanol. Poner en los dos extremos de la celda sendos filtros de fibra de vidrio. Cerrar la celda.
- Realizar una extracción estática con CO₂ supercrítico a 100 atm y 40° C, manteniendo el sistema cerrado durante 30 minutos para que el CO₂ y la muestra vegetal alcancen el equilibrio.
- Despresurizar el sistema de forma suave para que salga el CO₂ y el metanol con los analitos disueltos. Utilizar como sistema de colección un tubo de ensayo de 10 mL conteniendo 4 mL de metanol, inmerso en un baño de agua a temperatura ambiente.
- Una vez finalizada la extracción, ajustar el extracto SFE obtenido a 3 mL con metanol y guardar el extracto final en un tubo de vidrio opaco provisto de rosca para evitar la oxidación del mismo. Refrigerar si no se utilizan de inmediato.
- Medir la absorbancia a $\lambda=666$ nm del extracto obtenido, utilizando 1 ml para el análisis y metanol como blanco.
- Repetir el experimento variando la presión de trabajo.

b) Resultados

MUESTRA	g MUESTRA	PRESIÓN (atm)	A ₆₆₆
1		100	
2		150	
3		200	
4		250	
5		300	

c) Cuestiones:

- 1.- A la vista de los resultados, ¿qué presión de las ensayadas elegirías para hacer la extracción?
- 2.- ¿Por qué influye la presión en la extracción con CO₂ supercrítico?

c. Cuantificación espectrofotométrica de las clorofilas a y b presentes en hojas de espinaca.

a) Procedimiento experimental

- Pesar 8,0 g de la muestra preparada e introducirlos en la celda de extracción de 10 ml. Añadir 250 µL de metanol. Poner en los dos extremos de la celda sendos filtros de fibra de vidrio. Cerrar la celda.
- Realizar una extracción estática con CO₂ supercrítico a 40° C y a la presión que hayas elegido como óptima en el apartado anterior, manteniendo el sistema cerrado durante 30 minutos para que el CO₂ y la muestra vegetal alcancen el equilibrio.
- Despresurizar el sistema de forma suave para que salga el CO₂ y el metanol con los analitos disueltos. Utilizar como sistema de colección un tubo de ensayo de 10 mL conteniendo 4 mL de metanol, inmerso en un baño de agua a temperatura ambiente.
- Una vez finalizada la extracción, ajustar el extracto SFE obtenido a 3 mL con metanol y guardar el extracto final en un tubo de vidrio opaco provisto de rosca para evitar la oxidación del mismo. Refrigerar si no se utilizan de inmediato.

- Medir la absorbancia del extracto obtenido a 666 y 653 nm, utilizando 1 ml para el análisis y metanol como blanco.

- Repetir el experimento cinco veces.

b) Resultados.

MUESTRA	g MUESTRA	A ₆₆₅	A ₆₅₃
1			
2			
3			
4			
5			

c) Cuestiones:

De acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$Ca = 15,65 \cdot A_{666} - 7,34 \cdot A_{653}$$

$$Cb = 27,05 \cdot A_{653} - 11,21 \cdot A_{666}$$

utiliza los datos obtenidos para calcular la concentración en $\mu\text{g/mL}$ de clorofila a y b en el extracto. Transforma estos valores para expresar finalmente los resultados en μg de clorofila por g de espinaca fresca utilizada.

Muestra	[Cla] _{extracto} ($\mu\text{g/mL}$)	[Cib] _{extracto} ($\mu\text{g/mL}$)	[Cla] _{espinaca} ($\mu\text{g/g}$)	[Cib] _{espinaca} ($\mu\text{g/g}$)

Resultado final:

[Cl a] media =	[Cl b] media =
Desviación estándar =.....	Desviación estándar =.....

3. REFERENCIAS

- [1] **L.J. Álvarez González.** “Extracción de metabolitos solubles en dióxido de carbono en condiciones supercríticas a partir de hojas deshidratadas de espinaca.” Universidad San Carlos de Guatemala (2011).
- [2] **J. Val, L. Heras y E. Monge.** “Nuevas ecuaciones para la determinación de pigmentos fotosintéticos en acetona”, An. Aula Dei **17**, 231-238, 1985.
- [3] **D. Arnon.** “Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*”, Plant. Physiol. **24**, 1-15, 1949.
- [4] **S. W. Jeffrey y G. F. Humphrey.** “New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton”, Biochem. Physiol. **167**, 191-194, 1975.
- [5] **H. K. Lichtenthaler y A. R. Wellburn:** “Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b in leaf extracts in different solvents”. Biochem. Soc. Trans. **11**, 591-592, 1983.
- [6] **A. R. Wellburn:** “The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution”. J. Plant Physiol., **144**, 307-313, 1994.
- [7] **Valverde García A. Fernández-Alba A.R., Agüera A. and Contreras M.** “Extraction of methamidophos residues from vegetables with supercritical fluid carbon dioxide”, J. AOAC Int. **78**, 867-873, 1995.

4. BIBLIOGRAFÍA

- **White, A. Handler, P., Smith, E., Hill, R., Lehman, R.** “*Principios de Bioquímica*”. Ed. McGraww Hill, 1989.
- **Reinaldo J. Velasco, Héctor S. Villada y Jorge E. Carrera.** “*Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria*”. Información Tecnológica 18, 53-65, 2007.
- **P. G. Irianda Araujo:** “*Capacidad antimicrobiana y antioxidante de extractos de orégano obtenidos mediante fluidos supercríticos*”(Máster en gestión y seguridad alimentaria). Universidad Politécnica de Valencia.
- **Namiki, M:** “*Antioxidant/antimutagens in food*”. Food Science and Nutrition 29, 273-300, 1990.
- **A. Esquivel y P. Vargas.** “*Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales*”. Tecnología en Marcha 20, 41-50, 2007.
- **Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beck TA.** “Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts”. *Food Chem.* 85: 231-237, 2004.
- **Cobos. A., Díaz. O., L. Perales. y J. A.Ordóñez.** “*El dióxido de carbono supercrítico en la elaboración de alimentos de origen vegetal.* Alimentación, equipos y tecnología, 16, 55-63, 1997.
- **Viera de Melo, S. A. B., G. M. N. Costa., A. Casula. y B. Pittau.** “*Supercritical CO₂ extraction of essential oils from Thymus vulgaris*”.Brazilian J. Chem. Eng, 17, 367–371,2000.