

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS



**“DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE SECADO POR ASPERSIÓN DE
EXTRACTO ACUOSO DE SAPONINAS Y ADAPTACIÓN DE UN MÉTODO DE
CUANTIFICACIÓN EN QUINUA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE”**

TRABAJO PARA OPTAR AL GRADO LICENCIATURA EN CIENCIAS QUÍMICAS

POSTULANTE: SILVIA EUGENIA RAMOS PAREDES

TUTORES: Ph. D. GIOVANNA ROCÍO ALMANZA VEGA
Ph. D. HERIBERTO CASTAÑETA MARONI

TRIBUNALES: Ph. D. RIGOBERTO ROGELIO CHOQUE ASPIAZU
Ph. D. YONNY RENÉ FLORES SEGURA

LA PAZ - BOLIVIA

DEDICATORIA

A mi Madre Juliana Paredes que está con Dios

Por haberme dado todo su cariño, amor y comprensión, por todo su apoyo, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy. “Gracias Mamita, que me guías desde el cielo estando siempre a mi lado en todo momento”.

A mi Padre Modesto Ramos

Por haberme apoyado en cada momento, por sus consejos, valores y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien. “Gracias Papito, por tu cariño, paciencia y por la fortaleza que me diste”.

A mis Hermanos: María, Hugo, Richard, Feliza y Gabriel

Por haberme apoyado, por la paciencia que tuvieron conmigo, por ser parte de mi vida de mis alegrías y por ser el soporte de mis tristezas. “Gracias Hermanitos los quiero Mucho”.

SILVIA EUGENIA RAMOS PAREDES

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de fortaleza, paciencia y su infinito amor. “Gracias Señor Jesús”.

Un agradecimiento especial a mi Tutor, Ph. D. Heriberto Castañeta M. que me brindó su apoyo incondicional durante el transcurso de mi vida universitaria, como Docente y Amigo, además de permitirme trabajar en el Laboratorio de Fisicoquímica.

Agradezco infinitamente a mi Tutora, Ph. D. Giovanna Almanza V. por darme la oportunidad de formar parte de la gran familia del Laboratorio de Biorgánica, y su apoyo constante para realizar el presente trabajo, a los Licenciados y amigos míos, Maribel L., Alberto C., Angela S., Santiago T. Yaquelin S. y a todos los que forman parte del laboratorio.

Un agradecimiento especial a Laboratorios LABSER S.R.L. y a todo el personal, por haberme dado la oportunidad de realizar y culminar el presente trabajo en sus instalaciones y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A mis tribunales Ph. D. Yonny Flores S. y Ph. D. Rigoberto Choque A. por el apoyo, consejos y tiempo invertido en el presente trabajo, muchas Gracias.

A mis amigos, gracias por estar a mi lado en los buenos y malos momentos: Alejandra, Raquel, Maribel, Jimena, Nicol, Karen, Leydi, Heydi, Eduardo, Ezequiel, Marco, Alejandro, Edgar, Julián, Raulito, y a todos Aquellos que forman parte de mi vida, los Quiero Mucho.

A todos los docentes de la Carrera de Ciencias Químicas, por los valores, formación académica, paciencia, y Amistad Brindada.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	v

CAPITULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 ANTECEDENTES.....	3
a) Saponinas de quinua.....	4
b) Propiedades de las saponinas.....	5
c) Investigaciones en Saponinas de quinua.....	6
d) Instituciones con un interés en la implementación de análisis de saponinas en quinua.....	8
e) Labser S.R.L. Servicios Especializados.....	8
f) Laboratorio de servicio de análisis del IIQ-UMSA.....	9
1.3 MARCO TEÓRICO.....	10
a) Secado Por Aspersión.....	10
b) Principios Del Método De Secado Por Aspersión.....	10
c) Ventajas Del Proceso De Secado Por Aspersión.....	12
d) Espectrofotometría Uv/Vis.....	12
e) Ley De Beer.....	14
f) Transmitancia Y Absorbancia.....	14
1.4 MARCO NORMATIVO.....	15
1.5 JUSTIFICACIÓN.....	17

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GENERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL	19
3.1 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	19
3.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	20
3.2.1 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE SECADO POR ASPERSIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SAPONINAS	20
a) Filtrado.....	20
b) Parámetro De Secado Para Extracto De Referencia.....	21
c) Evaluación De Parámetros De Secado Para Extractos Acuosos De Saponinas.....	21
3.2.2. SECADO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SAPONINAS POR EL MÉTODO DE SECADO POR ASPERSIÓN ADECUADO	22
a) Evaluación De Las Propiedades Organolépticas De Las Muestras De Cascarilla De Quinua.....	22
b) Obtención De Un Extracto Rico En Saponinas.....	22
c) Recuperación De Etanol Del Extracto Hidroalcohólico Y Secado Del Extracto Acuoso Obtenido.....	23
3.2.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ESTÁNDAR DE SAPONINAS DE QUINUA MEDIANTE MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PUREZA	23

a) Determinación De Saponinas Por Cromatografía Líquida De Alta Resolución HPLC.....	24
b) Preparación De La Muestra De Saponina Para La Inyección de HPLC.....	24
3.2.4 ADAPTACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS EN QUINUA.....	25
a) Barrido de la Muestra de Saponina Purificada.....	25
b) Protocolo para la Elaboración de la Curva de Calibración.....	26
3.2.5 CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS TOTALES EN EXTRACTOS ACUOSOS DE QUINUA.....	27
a) Protocolo Para La Extracción De Saponinas En Muestras De Quinoa, Y Lectura De Absorbancias De Los Extractos Obtenidos.....	27
 <u>CAPITULO 4</u>	
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	28
4.1 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE SECADO POR ASPERSIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SAPONINAS.....	28
4.2 SECADO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SAPONINAS POR EL MÉTODO DE SECADO POR ASPERSIÓN DETERMINADO.....	29
4.3 OBTENCIÓN DEL ESTÁNDAR EXTRACTO DE SAPONINAS DE QUINUA MEDIANTE MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PUREZA.....	30
a) Eliminación de grasas y ácidos grasos.....	30
b) Eliminación de proteínas.....	31
c) Eliminación de colorantes, micronutrientes y otros componentes de menor peso molecular.....	31
4.4 ADAPTACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS EN QUINUA.....	33

4.5 CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS TOTALES EN EXTRACTOS ACUOSOS DE QUINUA.....	37
---	----

Capítulo 5

CONCLUSIONES.....	40
-------------------	----

Capítulo 6

RECOMENDACIONES.....	41
----------------------	----

Capítulo 7

BIBLIOGRAFÍA.....	43
-------------------	----

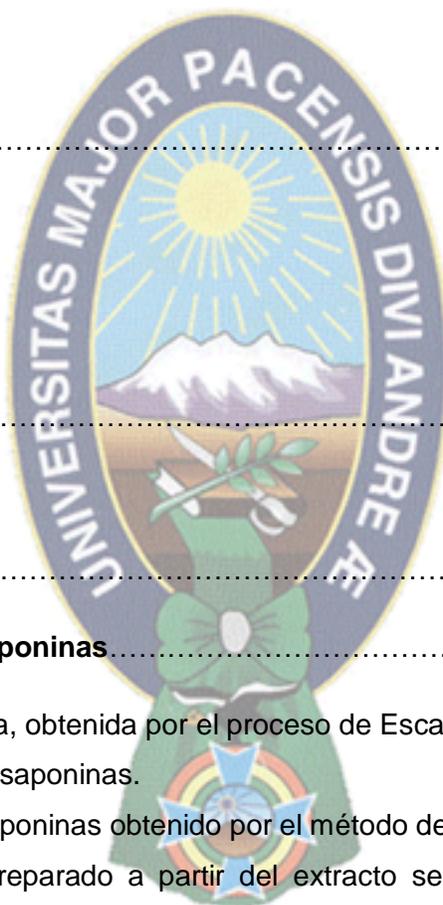
ANEXOS.....	47
-------------	----

Anexo I. Extracción de saponinas.....	47
--	-----------

- (a) Cascarilla de Quinua, obtenida por el proceso de Escarificado
- (b) Extracto Acuoso de saponinas.
- (c) Extracto seco de Saponinas obtenido por el método de Secado Por Aspersión.
- (d) Extracto Acuoso, preparado a partir del extracto seco de saponinas obtenido por Secado por aspersión.

Anexo II. Obtención de Saponina Estándar, Desengrasado, Fraccionamiento de Muestras, y Placas TLC en fase reversa de Muestras purificadas de saponinas de Quinua.....	49
--	-----------

Anexo III. Preparación de la Solución Madre, Diluciones y reacción de la muestra con el reactivo de Liebermann-Burchard, para la construcción de la Curva de Calibración.....	50
--	-----------



Anexo IV. Extracción de saponinas de muestras de quinua.....	51
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Exportaciones de quinua de Bolivia periodo 2004 a 2014.....	2
Figura 2. Planta herbácea <i>Chenopodium quinoa</i> Willd (Quinua).....	3
Figura 3. Morfología de la semilla de quinua entera (izquierda) y un corte en la sección media longitudinal (derecha).....	4
Figura 4. Sapogeninas de quinua.....	5
Figura 5. Saponinas monodesmosídicas y bidesmosídicas de quinua.....	5
Figura 6. Apariencia de saponinas de quinua después del realizar el secado por aspersión de extractos acuosos.....	6
Figura 7. Equipo para el secado por aspersión del extracto acuoso de saponinas de quinua.....	11
Figura 8. Espectro de Absorción y Cuantificación Colorimétrica de Biomoléculas.....	13
Figura 9. Cromatografías TLC de las fracciones obtenidas.....	24
Figura 10. Curva de calibración para la determinación de saponinas en quinua.....	27
Figura 11. Placas en fase reversa de extractos purificados de saponinas, fracciones N°2.....	32
Figura 12. Cromatograma del extracto purificado de Saponinas.....	33
Figura 13. Cromatograma de extracto de saponinas al 80 % de Pureza.....	33
Figura 14. Espectro de barrido del estándar de saponinas, obtención de la longitud máxima de Onda.....	34
Figura 15. Curva de Calibración para la determinación de saponinas en Quinua.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Color de luz absorbida o reflejada en función de la longitud de onda.....	14
Tabla 2. Relación de normas Andinas aprobadas- Sector Granos Andinos.....	16
Tabla 3. Requisitos Bromatológicos De Los Granos De Quinoa.....	16
Tabla 4. Equipos utilizados durante el desarrollo de la investigación.....	19
Tabla 5. Reactivos utilizados durante el desarrollo de la investigación.....	20
Tabla 6. Datos de las pruebas y variación de parámetros realizados en el equipo de secado por Aspersión.....	21
Tabla 7. Parámetros de secado de extractos acuosos de saponinas por Spray Dry.....	22
Tabla 8. Parámetros de extracción hidroalcohólica de saponinas.....	22
Tabla 9. Variación de parámetros realizados en el equipo de secado por Aspersión.....	28
Tabla 10. Parámetros de secado de saponinas.....	29
Tabla 11. Diluciones para la construcción de la curva de calibración, para la cuantificación de saponinas en Quinoa Real.....	34
Tabla 12. Concentraciones reales de las diluciones multiplicadas por el factor de dilución.....	35
Tabla 13. Absorbancias obtenidas en las muestras por triplicado.....	36
Tabla 14. Datos de la concentración y promedio de las absorbancias para la construcción de la curva de calibración.....	36
Tabla 15. Datos de absorbancias obtenidas del análisis de saponinas por espectrofotometría UV/Vis, en muestras de quinoa.....	38
Tabla 16. Concentración de saponinas en muestras de quinoa.....	38

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN.-

La quinua (*Chenopodium Quinoa Willd*) es un grano originario de la zona del altiplano de la Cordillera de Los Andes. Tradicionalmente crece en tierras áridas y semiáridas, con una amplia variabilidad genética y con una capacidad de adaptabilidad a las adversidades climáticas y diversos pisos ecológicos. Se adapta a climas desde desérticos hasta calurosos y secos, puede crecer con humedades relativas desde 40 % hasta 88%, y soporta temperaturas desde -4°C hasta los 38°C; es una planta que usa eficientemente el agua, siendo tolerante y resistente a la falta de humedad del suelo. ^{[1], [7]}

Actualmente, Bolivia es uno de los principales exportadores de quinua (Figura 1) aunque en los dos últimos años los niveles de exportación han bajado principalmente por la producción de quinua en otros países del mundo como Perú. Los lugares con una mayor cantidad de superficie cultivada de este grano son: el departamento de La Paz, Oruro, Potosí, y con un área menor de cultivo, los departamentos de Chuquisaca y Cochabamba.

La quinua representa un alimento para contribuir a la seguridad alimentaria de la humanidad, pues su calidad nutritiva está representada por su composición en aminoácidos esenciales, oligoelementos y vitaminas, en calidad como en cantidad, constituyéndose en un alimento funcional e ideal para el organismo. ^[3] Además de ser una gran fuente nutritiva, la quinua tiene como componentes a las saponinas, que son sustancias de sabor amargo que deben ser eliminadas antes del consumo humano.

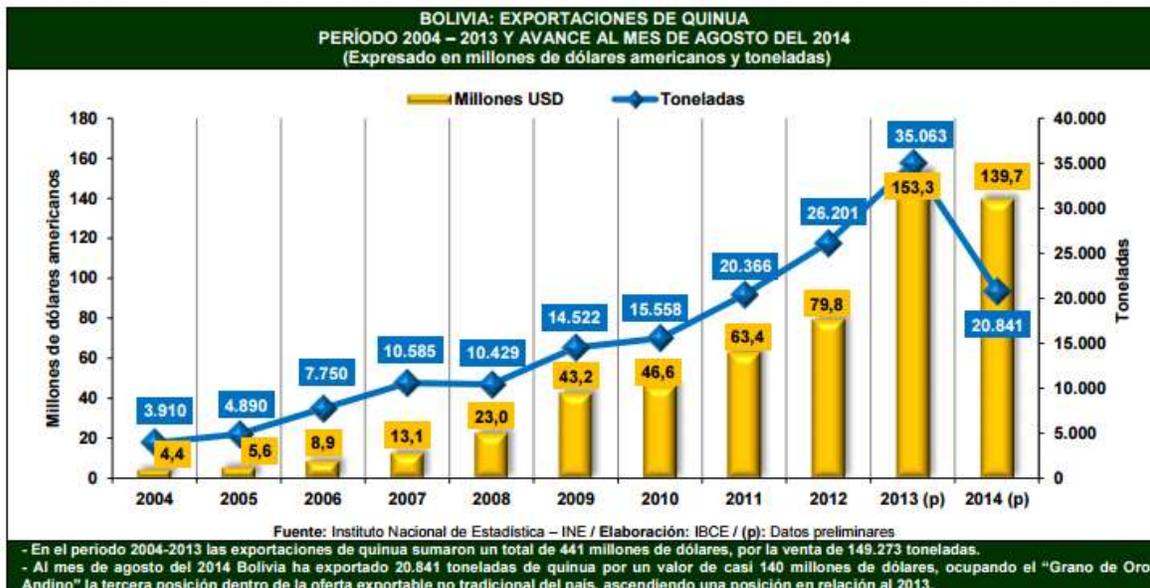


Figura 1. Exportaciones de quinua de Bolivia periodo 2004 a 2014 ^[31]

Las saponinas se encuentran principalmente en el epispermo del grano, y para su eliminación las empresas exportadoras de quinua, desarrollaron un proceso de “beneficiado” donde se separa el epispermo del grano mediante dos procesos: El primero se basa en la fricción entre granos por acción mecánica (escarificado), que desprende las capas externas y genera un sub-producto rico en saponinas llamado “Mojuelo”, el segundo es un proceso de lavado con agua para eliminar el epispermo restante. ^[1] El contenido de saponina en quinua es variable de acuerdo al ecotipo.

Las saponinas de la Quinua, que se obtiene de residuos del escarificado del grano de Quinua, tiene un rendimiento de alrededor de 4,5 % respecto al grano, por lo que cada año se generan toneladas de estos residuos en Bolivia. Las saponinas son un grupo de compuestos de gran interés para la industria agrícola, farmacéutica, cosmética y de detergentes, por sus diferentes propiedades biológicas y fisicoquímicas. Así, se determinó un efecto inhibitorio de hongos, actividad antiviral y molusquicida, por lo que se propuso su uso en la agricultura como biopesticida. Por sus efectos reductores de colesterol y sus propiedades hemolíticas tienen interés para la industria Farmacéutica, y por su capacidad surfactante y emulsificante, tiene interés en la industria cosmética y de detergentes. Es así que estudios sobre la obtención de extractos y cuantificación de saponinas de quinua son importantes para el desarrollo de potenciales productos de interés económico. ^{[1], [3]}

1.2 ANTECEDENTES.-

***CHENOPODIUM QUINOA* (QUINUA)**



Figura 2. Planta herbácea *Chenopodium quinoa* Willd (Quinoa) ^[1]

La quinua es un pseudo-cereal que pertenece a la familia de las Chenopodaceas. También conocido como el Grano de Oro de los Andes, fue domesticado y utilizado en la dieta de las civilizaciones Tiwanacota e Inca desde hace más de 5000 años. ^[4]

La variedad que tiene actualmente más demanda en el mundo, es la Quinoa real que se da únicamente en el altiplano Sur de Bolivia debido a que está perfectamente adaptada a sus características extremas, un clima frío y seco (entre 200 y 400 mm de lluvia anual), suelos salinos y elevadas altitudes (entre 3700 y 4200 m sobre el nivel del mar). Estas condiciones permiten la producción de un grano de mayor tamaño con características organolépticas particulares y un mayor valor nutricional, pues es el único grano que contiene todos los aminoácidos esenciales necesarios para el desarrollo del cuerpo humano, conteniendo a la vez cantidades significativas de varios minerales. ^[4]

a) SAPONINAS DE QUINUA

El grano de quinua tiene sus limitaciones antes de ser consumido, es preciso extraer cierta cantidad de compuestos glucósidos llamados SAPONINAS, los cuales se encuentran en el epicarpio de esta especie y son los que le confieren un sabor amargo al grano. [5]

Las rugosidades que se asemejan a celdas de un panal (Figura 3), albergan a una sustancia blanca, opaca y amarga, se asume que son las saponinas. Su contenido y adherencia en los granos es muy variable. [1]

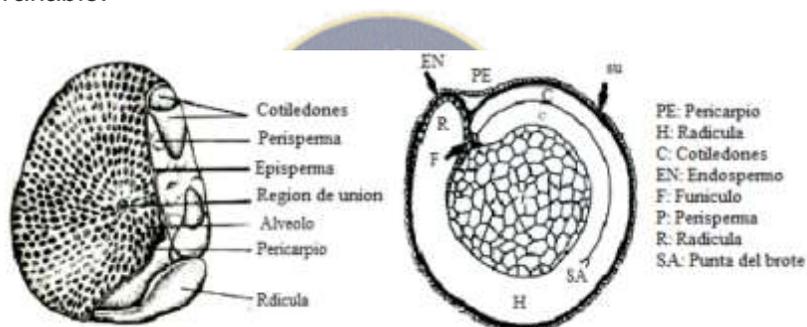


Figura 3. Morfología de la semilla de quinua entera (izquierda) y un corte en la sección media longitudinal (derecha). [1]

Las saponinas de quinua, químicamente son compuestos triterpénicos que se encuentran en las hojas, flores, tallos y en el mojuelo de las semillas, las mismas se componen de una cadena de hidratos de carbono (hidrofílica) unida a una aglicona o sapogenina triterpénica (lipofílica) (Figura 4), donde los azúcares pueden unirse a la aglicona en el carbono 3 y carbono 28. [6]

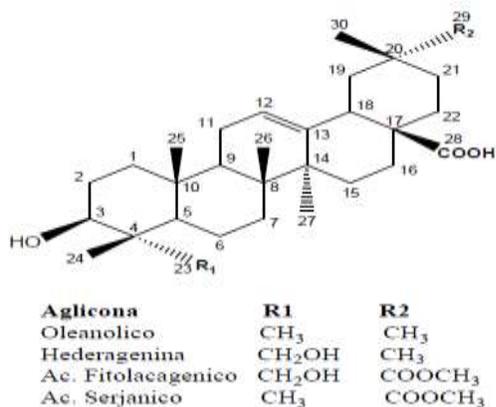


Figura 4. Sapogeninas de quinua [6]

De acuerdo al número de cadenas de azúcares unidas a la aglicona o saponina, se dividen en: saponinas monodesmosídicas que poseen una cadena simple de azúcar, normalmente enlazada en el C-3. Saponinas bidesmosídicas que poseen dos cadenas de azúcares unidas a través de un enlace tipo éter en el C3 y otra unión tipo éster en el C-28 (Figura 5), y las saponinas tridesmosídicas que poseen tres cadenas de azúcares y son raramente encontradas. ^[1]

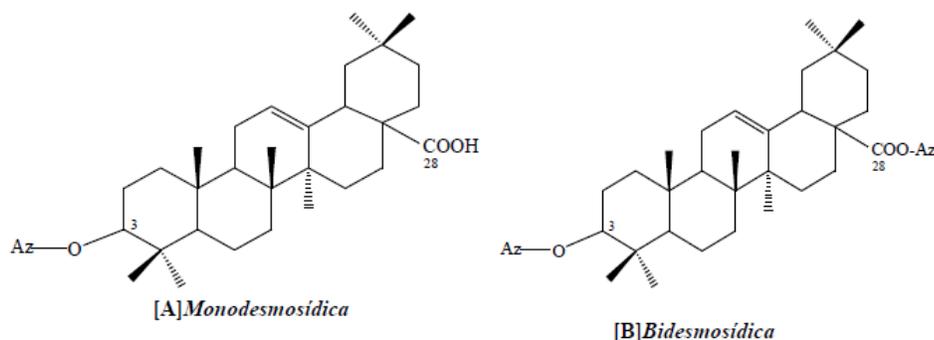


Figura 5. Saponinas monodesmosídicas y bidesmosídicas de quinua ^[6]

La parte glucosídica puede ser lineal o ramificada, con 11 como número máximo de monosacáridos presentes en una saponina tienden a tener cadenas azucaradas relativamente cortas, con 2 a 5 residuos de monosacáridos, los más comúnmente encontrados son: D-glucosa, D-galactosa, d-ácido glucoronico, D-ácido galacturonico, L-rhamnosa, L-arabinosa, D-xilosa y D-fucosa. ^[1]

b) PROPIEDADES DE LAS SAPONINAS

Las saponinas tienen normalmente una coloración blanco amarillenta y una apariencia de polvo fino, algo irritante para las fosas nasales (Figura 6). ^[1]



Figura 6. Apariencia de saponinas de quinua después del realizar el secado por aspersión de extractos acuosos.

Fuente: Elaboración Propia.

Entre algunas de las propiedades importantes de las saponinas están:

- ❖ Su propiedad surfactante, debido a su capacidad de romper la tensión superficial del agua generando burbujas, y espuma estable que es una propiedad importante para su uso como detergente. ^{[1],[6]}
- ❖ Actividad antimicrobiana e insecticida, citotóxica-antitumoral, toxicidad en peces, moluscos, etc. Además de ser expectorante, antitusígeno, antiinflamatorio, antioxidante y antiulcérico. ^[1]
- ❖ Actividad hemolítica: las saponinas tienen la capacidad de romper eritrocitos de la membrana celular, cuyo resultado es la ruptura de la membrana causando un incremento en la permeabilidad y un daño en la hemoglobina.

Adicionalmente, una de las principales propiedades que cumplen las saponinas en las plantas es la protección contra el ataque de hongos. Un estudio recientemente realizado ^[1], ^[3], demuestra que cuando las plantas con saponinas son invadidas por hongos, las saponinas monodesmosídicas, por reacciones enzimáticas, se van transformando en bidesmosídicas inhibiendo el crecimiento fúngico.

c) INVESTIGACIONES EN SAPONINAS DE QUINUA

Se han realizado varios estudios sobre la separación y aislamiento de saponinas en quinua, por lo cual fueron desarrollados varios métodos de cuantificación utilizando técnicas cromatográficas como ser: Cromatografía en Capa fina (TLC en Fase Reversa), Cromatografía Líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP), método semi-cuantitativo de Espuma que consiste en la medida de la altura de la espuma. La capacidad de las saponinas para formar complejos con los esteroides de los eritrocitos de la sangre, se constituye en un ensayo hemolítico para la cuantificación de saponinas en granos. Esta técnica se basa en la determinación espectrofotométrica de liberación de hemoglobina. ^{[1]. [3]}

En los últimos años se fue desarrollando un método Colorimétrico cuantitativo, que consiste en adicionar reactivos cromóforos (Reactivo de Liebermann-Burchard) donde el color se le atribuye a la formación del catión polieno, permitiendo que las saponinas puedan absorber en la región del visible del espectro (entre 400 y 528 nm), esta reacción también fue aplicada para la determinación cuantitativa de saponinas en granos de quinua. ^[3]

Asimismo, en el Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ-FCPN-UMSA), se realizaron varios estudios para el aislamiento de saponinas de residuos de Escarificado de Quinua. Entre ellos, se pueden mencionar, el trabajo realizado acerca de la cuantificación de saponinas^[1] que cuantifica saponinas en residuos de quinua real (*Chenopodium Quinoa Willd*), que son generados por empresas exportadoras de quinua de los departamentos de, La Paz, Oruro y Potosí; ^{[1]. [6]} habiendo optimizado un método de extracción de saponinas por maceración con mezclas hidroalcohólicas, considerando los siguientes parámetros: Relación masa/volumen de extracción; tiempo de extracción y relación porcentual EtOH/H₂O (v/v), determinándose que la mejor relación m/v de extracción es 1:9. El tiempo de extracción óptimo es de 72 h y la mejor mezcla de extracción es con 50/50 EtOH/H₂O. El porcentaje de saponinas se determinó utilizando los métodos de Espuma, Espectrofotométrico UV y por cromatografía HPLC, observándose que no hay grandes diferencias entre los 3 métodos. Además, es muy importante mencionar la utilización como muestra de referencia un estándar de saponinas de quinua en todos los métodos. ^{[1]. [6]}

Asimismo, se realizaron otros estudios sobre separación de saponinas presentes en los residuos de escarificado de la quinua real de Bolivia, determinándose que el principal constituyente es el ácido oleanólico,^[1] y que estas sustancias presentan propiedades antiinflamatorias.^[1]

d) INSTITUCIONES CON UN INTERES EN LA IMPLEMENTACIÓN DE ANÁLISIS DE SAPONINAS EN QUINUA.

Existen Instituciones que prestan servicios de análisis para la cuantificación de saponinas en granos de quinua a varias empresas productoras y exportadoras de este grano, que para su exportación y comercialización debe cumplir con la Norma Boliviana que exige niveles menores a 120 mg de saponinas por 100 g de quinua. Asimismo, es importante considerar la generación de subproductos de los residuos de quinua por la presencia de saponinas, siendo necesario conocer la cantidad de estos compuestos.

Entre las instituciones interesadas en la implementación de análisis de saponinas de quinua entre sus servicios ofrecidos están:

e) LABSER S.R.L. SERVICIOS ESPECIALIZADOS

LABSER (Laboratorio de Servicios Especializados) surge ante la demanda de contar con servicios de un laboratorio acreditado en Bolivia que ofrezca análisis especializados en el rubro de alimentos, brindando resultados confiables y oportunos, generando empleo, y contribuyendo al desarrollo del país.

Hoy en día, la salud del consumidor es un tema crucial, donde factores como contaminaciones microbiológicas y toxicológicas en alimentos orgánicos está tomando fuerza, por ello las entidades internacionales de regulación, definen límites máximos permisibles de contaminantes en alimentos.

LABSER S.R.L., es un Laboratorio que presta servicios de análisis de alimentos y aguas, con una amplia gama de ensayos fisicoquímicos, toxicológicos, nutricionales y microbiológicos, atendiendo las necesidades de los clientes, autoridades reguladoras y otros actores de la cadena alimentaria, en el marco del control de la inocuidad y calidad de los alimentos.

Entre estos servicios se consideran los análisis de saponinas en granos de quinua, para garantizar que los productos de quinua que se encuentran en el mercado estén dentro de la Norma Boliviana de Quinua.

Con el respaldo y compromiso de la dirección, personal calificado y tecnología moderna para una buena práctica profesional brinda confiabilidad y calidad de sus resultados analíticos

bajo el cumplimiento del sistema de gestión internacional ISO/IEC 17025 y normas legales vigentes. La formación y especialización del personal aseguran el cumplimiento obligatorio de las políticas y procedimientos documentados en el trabajo rutinario y mejora continua del sistema de gestión y las actividades de ensayos.

f) LABORATORIO DE SERVICIO DE ANÁLISIS DEL IIQ - UMSA

El Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ) es una Unidad de investigación dependiente de la Carrera de Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Puras y Naturales, perteneciente a la Universidad Mayor de San Andrés. Fundado en febrero de 1973, en sus más de 35 años de existencia ha venido generando investigación científica en el área de la Química, tanto a nivel básico como aplicado, con una fuerte identidad de servicio en beneficio de la población. Por consiguiente, ha participado en importantes procesos en el campo de la investigación científica a nivel regional, departamental, nacional e internacional.

El Laboratorio de Servicio de Análisis del IIQ es la unidad de servicios correspondiente al IIQ, que tiene ingresos por fondos propios, compuesta principalmente por los asistentes o técnicos de investigación, quienes son responsables de equipos y prestan servicios especializados en Química. Entre los servicios que se presentan, están los análisis en la matriz agua, aire, de alimentos y de productos naturales, determinando componentes importantes y contaminantes a nivel de trazas; gracias al excelente equipamiento implementado en la institución mediante proyectos de colaboración nacional e internacional: RMN, IR, AA con horno de grafito y generador de hidruros, GC/MS y HPLC entre otros.

Así, el instituto de Investigaciones Químicas, que presta servicios de análisis en beneficio de la población. También realiza análisis de saponinas en Quinuas por cromatografía HPLC, con los métodos implementados en los proyectos de investigación desarrollados en residuos de quinua, con garantía en los resultados obtenidos de los análisis.

1.3 MARCO TEORICO.-

En este apartado se dan las bases teóricas para los métodos utilizados

a) SECADO POR ASPERSIÓN

El secado por atomización o secado en “spray” se utiliza desde principios del siglo XX. Aunque existen patentes para el SA de huevos y de leche desde 1850, la atomización industrial de alimentos apareció en 1913 en un proceso desarrollado para la leche por Gray y Jensen en 1913. El primer equipo rotativo lo desarrolló el alemán Kraus (1912) pero, comercialmente gracias al danés Nyro (1933). El principio del sistema es la obtención de un producto en polvo a partir de un material líquido concentrado que se pulveriza finamente formando una niebla que entra en contacto con una corriente de aire caliente, que actúa como medio calefactor y fluido de transporte. ^[2]

Por definición, el secado por aspersión corresponde a la transformación de un fluido en un material sólido, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio de secado en caliente.

b) PRINCIPIOS DEL MÉTODO DE SECADO POR ASPERSIÓN

El secado por aspersión es la producción de un polvo seco por medio de la atomización de un extracto líquido en una corriente de aire caliente en una cámara de secado. El agua se evapora instantáneamente, siendo entonces la técnica para la obtención de extractos secos sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 segundos).

A continuación en la siguiente imagen se mostrará un diagrama de un equipo de secado por aspersión:



Figura 7. Equipo para el secado por aspersión del extracto acuoso de saponinas de quinua

Fuente: elaboración propia

El proceso de secado por aspersión consiste en lo siguiente:

Primeramente, el extracto o mezcla que está en el tanque de alimentación fluye a través de la bomba peristáltica hasta la boquilla de aspersión donde se dispersa a través de gotas. El aire caliente, llega hasta el secador por aspersión desde la parte de arriba, por lo tanto tiene contacto con la mezcla a secar, atomizándolo en forma de gotas minúsculas, el agua que contiene el extracto se evapora al instante, el extracto líquido se pulveriza finamente formando una niebla que entra en contacto con la corriente de aire caliente (entre 200 y 300 °C para alimentos), esta corriente de aire además de actuar como medio calefactor también es el fluido de transporte de la mezcla ya seca, que se transporta al ciclón para luego ser descargada en el recipiente de recolección.^[8]

La cámara de secado más común es de tipo cilíndrico con un cono inferior que hace un ángulo con la vertical entre 40 y 60 ° para que pueda ser retirado de allí el polvo por gravedad. El aire utilizado en la operación tiene temperaturas de entrada entre 100 y 330°C.

para alimentos termoestables como el café pueden usarse hasta 250 °C mientras para materiales, delicados como leche o huevos pueden manejarse a 100 ° C o menos. Las temperaturas de salida del aire oscilan entre 50° y 100°C. ^[2]El calentamiento del aire se hace por métodos indirectos (vapor, gas o aceite como medios calefactores) o directo (gas o electricidad).^[10]

c) VENTAJAS DEL PROCESO DE SECADO POR ASPERSIÓN

- ✓ La evaporación de agua enfría el contenido de las partículas permitiendo usar varias temperaturas de aire de secado sin afectar las cualidades del producto.
- ✓ Proceso continuo y constantemente controlado.
- ✓ Homogeneidad de productos.
- ✓ Tiempos cortos de secado.
- ✓ Secado de materiales termo sensibles, exponiéndolos a tiempos cortos.
- ✓ Solamente se requiere ser operado por una persona.
- ✓ Alto rendimiento y velocidad en el proceso.
- ✓ El producto final es un polvo fluido y soluble. ^{[9]. [10]}

d) ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS

La espectrofotometría UV-Visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución, la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas. ^[8]

En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y el visible (400-780 nm).

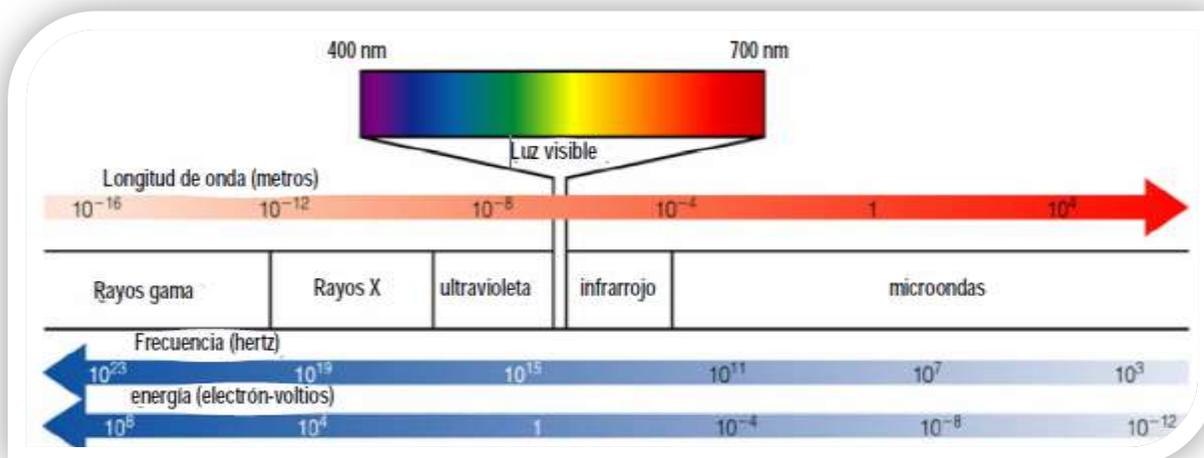


Figura 8. Espectro de Absorción y Cuantificación Colorimétrica de Biomoléculas. [8]

La región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm. Es una región de energía muy alta. Provoca daño al ojo humano así como quemadura común. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores -como pH, concentración de sal y el disolvente- que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV.

La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio.

En la región visible apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite.

Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada.

La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm.

longitud de onda aproximada	color de luz que se absorbe	color de luz que se refleja o ve
390 - 435	Violeta	Amarillo verdoso
435 - 490	Azul	Amarillo
490 - 580	Verde	Rojo
580 - 595	Amarillo	Azul
595 - 650	Naranja	Azul verdoso
650 - 780	Rojo	Verde azulado

Tabla 1. Color de luz absorbida o reflejada en función de la longitud de onda. ^[8]

e) LEY DE BEER

De acuerdo con la ley de Beer, la absorbancia está relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente, c , y con la longitud de la trayectoria de la radiación en el medio absorbente o camino óptico, b . Esto es:

$$A = abc$$

Dónde: a es una constante de proporcionalidad llamada absortividad. Cuando la concentración c se expresa en moles por litro, y b en centímetros, la constante de proporcionalidad se denomina absortividad molar, y se designa por el símbolo ϵ , y, puesto que la absorbancia es una magnitud adimensional, tendrá unidades de $L\text{ cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$. En este caso, la ley de Beer adquiere la forma:

$$A = \epsilon bc$$

f) TRANSMITANCIA Y ABSORBANCIA

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad I_0 lo incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz o cromóforo, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente (I_a) y dejará pasar el resto (I_t), de forma que se cumple:

$$I_0 = I_a + I_t$$

La transmitancia (T) de una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra, I_t y la cantidad de luz que incidió sobre ella, I_0 y se representa normalmente en tanto por ciento:

$$\%T = \frac{I_t}{(I_0 * 100)}$$

La transmitancia nos da una medida física de la relación de intensidad incidente y transmitida al pasar por la muestra. La relación entre %T y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa.

La absorbancia (A) es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de $1/T$, en consecuencia:

$$A = \frac{\log 1}{T} = -\log T = \frac{-\log I_t}{I_0}$$

Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ($I_0 = I_t$), la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces A vale $\log 1 = 0$.

La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y de la concentración de éste.^[13]

1.4 MARCO NORMATIVO

En el contexto de la globalización y la apertura de mercados internacionales, se exige que todo el país cuente con Normas de Calidad para la presentación de sus productos alimenticios. En este sentido se hace necesario determinar parámetros de calidad del producto de quinua y productos procesados en base a este grano andino, por lo que podemos mencionar en la siguiente tabla las Normas Andinas Aprobadas:

TABLA 2. RELACION DE NORMAS ANDINAS APROBADAS- SECTOR GRANOS ANDINOS

Norma	Código	Título
NB/NA	0032-2007	Granos Andinos-Pseudo cereales-Quinoa en grano-Definiciones
NB/NA	0038-2007	Granos Andinos-Pseudo cereales-Quinoa en grano-Clasificación y Requisitos
NB/NA	0039-2007	Granos Andinos-Pseudo cereales-Hojuelas de quinua-Requisitos
NB/NA	18004-2009	Granos Andinos-Pseudo cereales-Harina de quinua-Requisitos

Todas pueden ser solicitadas en la Normateca del IBNORCA o consultar en el siguiente sitio Web: ww.ibnorca.org.

En esta norma se encuentra todos los requisitos que debe tener el grano de quinua, entre ellos encontramos los requisitos bromatológicos de los granos de quinua entre los cuales se encuentra los valores máximos del contenido de saponina en quinua como producto final y para exportación los cuales se presentan en la tabla 3.

TABLA 3. REQUISITOS BROMATOLOGICOS DE LOS GRANOS DE QUINUA

Requisitos	Unidad	Valores		Método de ensayo
		Min	Max	
Humedad	%		13,5	AOAC 945.15
Proteínas	%	10		AOAC 992.23
Cenizas	%		3,5	AOAC 32.1.05
Grasa	%	4,0		AOAC 945.38 – 920.39C
Fibra cruda	%	3,0		AOAC 945.38 – 962.09 E
Carbohidratos	%	65		Determinación indirecta por diferencia
Saponinas	mg/100g		120	Método de la espuma

En esta norma nos indica que el límite o valor máximo de contenido de saponina en los granos de quinua que es 120 mg por cada 100 g de producto final.

Este mismo dato lo podemos encontrar en la Norma Boliviana NB 683, que está reconocida por IBNORCA. En ambos casos se realizó la determinación de saponinas por el método de espuma. ^[11]

1.5 JUSTIFICACIÓN.-

Hoy en día Bolivia es uno de los mayores productores y exportadores de quinua real orgánica a nivel mundial. La quinua es utilizada como un alimento de alto valor proteico, además de sus componentes nutricionales, la quinua tiene saponinas, que son sustancias de sabor amargo localizadas principalmente en el epispermo del grano, que deben ser eliminadas para ser consumibles. La quinua, al ser el cultivo más importante en la región occidental de Bolivia y al ser un producto de exportación, produce grandes volúmenes de residuos de escarificado del grano, ricos en saponinas, que son utilizados para el forraje de los animales o son desechados y en otros casos, incinerados. Las saponinas son sustancias beneficiosas en los campos de la cosmética, salud, agricultura como pesticidas y otros. En los últimos años se han desarrollado en el país varios proyectos científicos sobre los beneficios de las saponinas, que suponen una alternativa viable frente a la valorización de residuos agroindustriales como sustratos, y la posibilidad de darle un valor agregado. Por ello, en el presente trabajo se obtuvo saponina en polvo a partir de la determinación de los parámetros de secado por aspersión de extractos acuosos de saponinas de la cascarilla de quinua, producto del beneficiado (escarificado).

Además se realizó la adaptación del método de cuantificación de saponinas en Quinua Real, de consumo local y de exportación, por la técnica de espectrofotometría UV-Visible (más económica que la cromatografía HPLC), para determinar si estos productos alimenticios se encuentran dentro límite permisible de contenido de saponinas o para futuros productos en base a saponinas de quinua.

CAPÍTULO 2

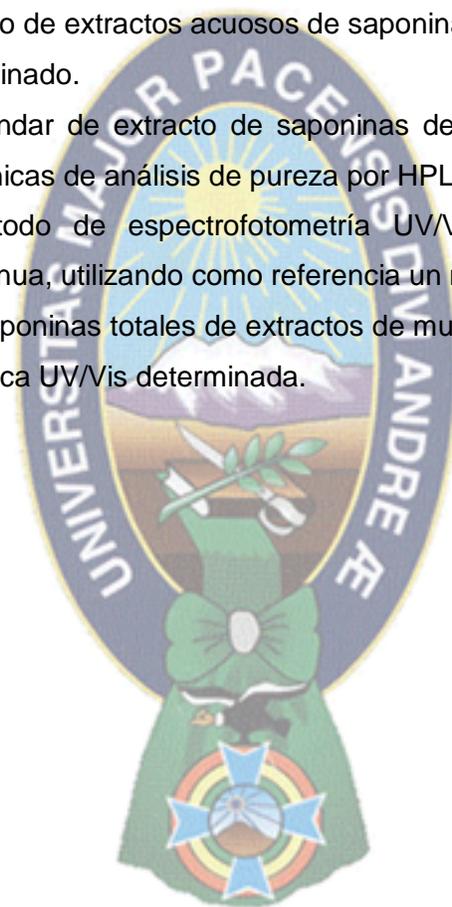
OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar los parámetros de secado para la obtención de saponina en polvo y su cuantificación por el método de espectrofotometría UV-Visible.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el secado de extractos acuosos de saponinas por el método de secado por aspersión determinado.
- Obtener un estándar de extracto de saponinas de quinua mediante métodos de separación y técnicas de análisis de pureza por HPLC.
- Adaptar un método de espectrofotometría UV/Vis para la cuantificación de saponinas en quinua, utilizando como referencia un método descrito
- Cuantificar las saponinas totales de extractos de muestras de quinua, por la técnica espectrofotométrica UV/Vis determinada.



CAPÍTULO 3

3.1 PARTE EXPERIMENTAL

3.1.1 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Los equipos, Materiales y Reactivos utilizados durante el desarrollo de la investigación son los que se presentan en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Equipos utilizados durante el desarrollo de la investigación

Equipo	Características	Ubicación
Espectrofotómetro UV-Visible	UV-Winlab	LABSER-SRL
Balanza digital	Sartorius	LABSER-SRL
Vortex	Thermo Scientific	LABSER-SRL
Rotaevaporador	Heidolph HB digital	IIQ-UMSA
HPLC	Agilent 1100 series	IIQ-UMSA
Bioreactor	Glass Reactor 10 L.	IIQ-UMSA
Agitador magnético	Kika- werke	IIQ-UMSA
Estufa	Memmert - UN55	IIQ-UMSA
Equipo de Secado por aspersión	BILON-6000Y	IIQ-UMSA

Tabla 5. Reactivos utilizados durante el desarrollo de la investigación

Solvente	Pureza	Aplicación
Etanol	Comercial 96 GL	Obtención de extractos
Acetonitrilo	Grado HPLC	Fase móvil RP-HPLC
Agua	Ultra purificada	Fase móvil RP-HPLC
Ácido Fórmico	Para análisis 100 %	Condiciones de la columna HPLC
Anhídrido Acético	Para análisis 98%	Cuantificación espectrofotométrica UV-Vis. De saponinas.
Ácido Sulfúrico	Para análisis al 96 %	Cuantificación de espectrofotométrica UV-Vis. De saponinas.
Ácido Clorhídrico	Para análisis al 38 %	Precipitación Isoeléctrica de proteínas.
Eter de Petróleo	Fracción 40-60	Extracción de Grasas

3.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE SECADO POR ASPERSIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SAPONINAS

Para la determinación de los parámetros de secado por aspersion de extractos acuosos de saponinas, se realizó lo siguiente:

a) Filtrado

Se filtra el extracto acuoso de saponinas que se obtuvo por el método de maceración descrito por Lozano 2010, ^[1] el extracto filtrado se lleva al equipo de secado por Aspersion (Spry Dry).

b) Parámetro de secado para extracto de una muestra de referencia

Tomando como referencia los parámetros de secado para una muestra de café de cebada, los cuales son: temperatura de entrada de 180°C, tiempo de inyección de la muestra de 5 s, velocidad de la bomba peristáltica de 10 rpm y ciclones de soplado de 25 Hz. ^[5]

c) Evaluación de parámetros de secado para extractos acuosos de saponinas

Para el secado de extractos de saponinas, se fueron variando los parámetros de temperatura de entrada (T_E) y salida (T_S) del producto, tiempo de inyección, velocidad de la bomba peristáltica y ciclones de soplado de la muestra, datos que se presentan en la tabla 6:

Tabla 6. Datos de las pruebas y variación de parámetros realizados en el equipo de secado por Aspersión

N° de Prueba	T_E/T_S (°C)	Tiempo de inyección de la Muestra (s)	Velocidad de la Bomba Peristáltica (rpm)	Ciclones de Soplado de la Muestra Seca (Hz)
1	90/20	5	10	30
2	90/20	10	30	20
3	100/25	10	20	30
4	115/27	10	20	10
5	120/30	5	10	30
6	130/35-40	5	20	30
7	150/55-65	10	10	20
8	150/55-65	5	4	30
9	175/70	10	15	40
10	180/75	10	15	40

De las pruebas realizadas se observó, que los parámetros de secado en los cuales se muestra un secado adecuado de los extractos de saponinas son los que se presentan en la tabla 7:

Tabla 7. Parámetros de secado de extractos acuosos de saponinas por Spry Dry:

T_E/T_S [°C]	Tiempo de Inyección de la Muestra [s]	Velocidad de la Bomba Peristáltica [rpm]	Ciclones de Soplado de la Muestra Seca [Hz]
150/55-65	4	6-9	40

Con estos parámetros finales se realizó el secado de extractos acuosos de saponinas.

3.2.2 SECADO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SAPONINAS POR EL MÉTODO DE SECADO POR ASPERSIÓN ADECUADO.

Una vez que se ha determinado los parámetros de secado. Se realizó la extracción de saponinas por el método de maceración mencionado anteriormente, para ello se realizó las siguientes actividades:

a) Evaluación de las propiedades organolépticas de las muestras de cascarilla de quinua.

Se puede mencionar que la clasificación de ecotipos de quinua se basa en la coloración del pericarpio del grano, y la coloración variada muestra una composición diferente en saponinas. La muestra tenía un aspecto de polvo de color rosado, ya que se trataba de una mezcla de las diferentes variedades.

b) Obtención de un extracto rico en saponinas:

Para la obtención de un extracto de saponinas en la cascarilla de quinua, se eligió la técnica de maceración a temperatura ambiente y sin agitación ^[1], en la cual se utilizaron los siguientes parámetros: Tiempo de maceración, relación solvente extractor H₂O/ EtOH en porcentaje v/v y la relación masa de mojuelo /volumen de solvente extractor descrita en la tabla 8:

Tabla 8. Parámetros de extracción hidroalcohólica de saponinas.

Parámetros	Muestra
Tiempo de maceración (h)	72
Mezcla agua/etanol (%)	50
Relación masa de mojuelo /volumen (g/mL)	1:9

c) Recuperación de etanol del extracto hidroalcohólico y secado del extracto acuoso obtenido.

Con los parámetros indicados en la tabla 8. Se realizó varias extracciones. Y para la recuperación del solvente utilizado se siguió el siguiente procedimiento; pasado el tiempo de maceración se separó por filtración a vacío. Luego el extracto fue concentrado a presión reducida hasta evaporación completa del etanol (recuperación), en el equipo Bioreactor de 10 L de capacidad a temperatura externa de 55 °C y una temperatura Interna entre 45 y 50 °C, con una velocidad de agitación de 130 rpm. Posteriormente se filtra nuevamente el extracto acuoso de saponinas y se transfiere a frascos de vidrio, y son llevados al equipo de secado por aspersion. Y con los parámetros determinados de secado obtenidos anteriormente se secan los extractos acuosos de saponinas.

3.2.3 OBTENCIÓN DEL ESTÁNDAR EXTRACTO DE SAPONINAS DE QUINUA MEDIANTE MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PUREZA.

A partir del polvo de saponinas obtenido por el secado por aspersion, de acuerdo a los antecedentes, el extracto seco obtenido puede contener minerales, ácidos grasos, proteínas, colorantes, azúcares libres y saponinas. ^{[1], [3], [6]} Por lo que inicialmente se realizó la separación de ácidos grasos mediante una extracción Soxhlet utilizando como solvente Éter de Petróleo la fracción 40-60, posteriormente se separaron las proteínas, mediante precipitación isoelectrica a pH= 4.5, para ello se preparó una disolución al 10% w/v del extracto seco en agua destilada desionizada, a la cual se le adiciona gradualmente HCl 1N hasta alcanzar un pH de 4.3- 4.5. En este punto se observa la formación de un enturbiamiento o precipitado blanco muy fino, que para su separación se deja bajo refrigeración por 30 min, luego se separa el precipitado por centrifugación a 20000 rpm durante 15 min a 10°C ^[1]. El filtrado se lleva a sequedad nuevamente al equipo de secado por aspersion, obteniéndose un extracto seco libre de proteínas. Finalmente para eliminar o realizar la separación de las saponinas de los colorantes, oligosacáridos y demás constituyentes de menor peso molecular, se empleó la técnica de la cromatografía de exclusión molecular, para lo cual se utilizó 600 mg del extracto libre de proteínas y se hizo pasar por una columna de sephadex G-25 de 100 cm de alto * 2 cm de diámetro, 20-80 µm de tamaño de partícula, se obtuvo 15 fracciones, las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa fina (TLC) de Silicagel 60F254 empleando como sistema eluyente una mezcla conformada por (nPrOH/HOAc/H₂O) 50/20/30 v/v/v reagrupándose en cinco

fracciones (FQ-1, FQ2, FQ3, FQ4 y FQ5), nuevamente se realizó un análisis TLC, esta vez en fase reversa, obteniendo el siguiente cromatograma:

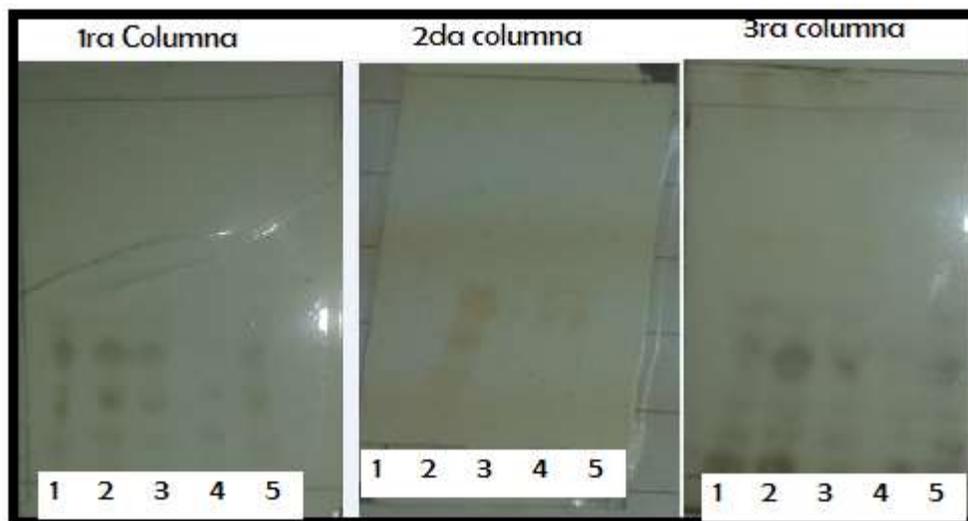


Figura 9. Cromatografías TLC de las fracciones obtenidas.

La técnica de fraccionamiento se realizó por quintuplicado obteniendo 5 columnas en la figura 9 se puede observar que en la fracción n° 2 es donde se obtiene mayor concentración de saponinas.

a) Determinación de saponinas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC:

Una vez obtenidas cada muestra se dio inicio con las pruebas de HPLC de las fracciones obtenidas, las cuales se realizaron por triplicado, para ello se utilizó la metodología descrita en la referencia, ^[1] los parámetros se describen a continuación:

La separaciones se realizaron en una columna kromasil (fase reversa) C18 de 4 mm +125 mm d.i., 5 μ m a 20 °C y 210nm. Se inyectan 5 μ L de muestras de concentración 15mg/ 1.5 mL de extracto de saponinas de mojuelo de quinua.

Para la separación se emplea como fase móvil agua al 0.1% v/v en Acido fórmico como solvente A y Acetonitrilo 100% como solvente B. para la elución se trabajó con una gradiente lineal de 75% de Solvente A con un flujo constante de 0.7 mL/min durante 15 min. Luego 65% de A con cambio de flujo de 0.7 a 1.0 mL/min en 20 min.

b) Preparación de la muestra de saponina seca para la inyección a HPLC:

Se pesó 15 mg de muestra en tubos Eppendorf de 2 mL, se disolvió con 1,5 mL de agua destilada ultrapurificada y se llevó a agitación en Vortex durante 1 min. Cada muestra.

Luego se tomó con una jeringa de 5 ml cada muestra disuelta y se filtró a los viales para HPLC, con un filtro de mezcla éster celulosa, y se llevó al equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC.

Se tomó en cuenta el tiempo de retención de cada muestra, ya que las saponinas se obtienen a partir de los 11 a 28 min.

3.2.4 ADAPTACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS EN QUINUA.

En el extracto se puede determinar el contenido de saponinas de diversas formas (método de espuma, cromatografía líquida de alta resolución HPLC, espectrofotometría UV-Vis, etc.). El método que se aplicó en este trabajo es el de espectrofotometría UV-Vis para la cuantificación de saponina total en el extracto, mediante la reacción de Liebermann- Burchard ^{[1], [3], [6]}, que ayuda a dar coloración a la solución de saponina total extraída éste reactivo es una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico en una proporción de 1:5 (16,7 %). La proporción de la muestra con el reactivo de color 1:3,5 (22,23%).

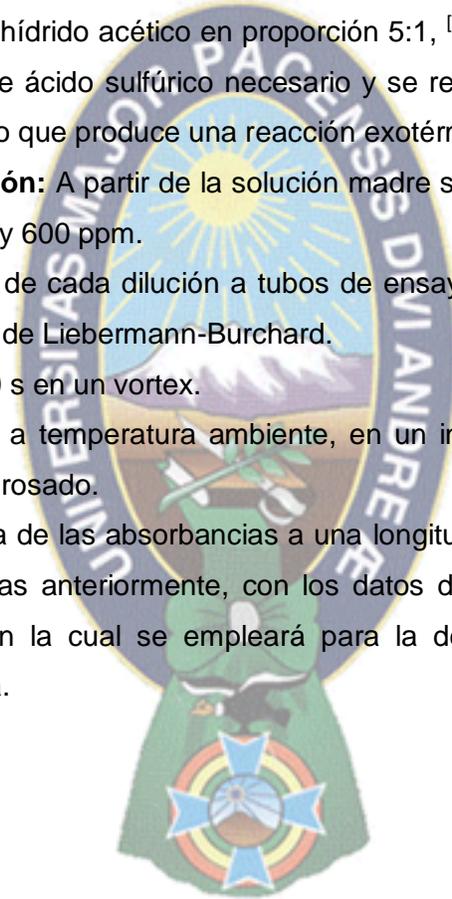
a) Barrido de la muestra de saponina purificada:

Antes de realizar la construcción de la curva de calibración se necesita obtener la longitud de onda máxima a la cual absorbe la muestra purificada que se obtuvo, para ello se debe hacer un barrido de la muestra de saponina, para lo cual:

- Se pesa 1 mg de saponina y se disuelve con 1 mL de agua destilada ultrapurificada. Se agita la solución de saponina durante 30 s a 1500 rpm.
- Se transfiere la solución a un tubo de ensayo con tapa rosca, posteriormente se le agrega 3,5 mL del reactivo de Liebermann-Burchard, se agita nuevamente durante 30 s a 1500 Rev/Min, y se deja reposar por 30 min a temperatura ambiente.
- Se realiza el barrido de la muestra entre 200 y 600 nm, a una velocidad de 1 nm/s. y se identifica el máximo de la longitud de Onda, obteniendo una longitud de 528,2 nm que concuerda con la longitud de onda máxima Bibliográfica.^{[1], [3]}

b) Protocolo para la elaboración de la curva de calibración:

- ❖ **Preparación de la solución madre:** Se prepara una solución madre de 1000 ppm, para este caso se pesa 25 mg de la saponina purificada (patrón) y se disuelve en agua destilada ultrapurificada, posteriormente se transfiere la solución a un matraz aforado de 25 mL y se afora con agua ultrapurificada.
- ❖ **Preparación del Reactivo de Liebermann-Burchard:** El reactivo se prepara con ácido sulfúrico y anhídrido acético en proporción 5:1, ^{[1], [3]} para el cual inicialmente se mide el Volumen de ácido sulfúrico necesario y se refrigera para soportar la adición de anhídrido acético que produce una reacción exotérmica.
- ❖ **Curva de calibración:** A partir de la solución madre se realizan diluciones de 0, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 ppm.
- ❖ Se transfiere 1 mL de cada dilución a tubos de ensayo con tapa rosca, y se agrega 3,5 mL del reactivo de Liebermann-Burchard.
- ❖ Se agita durante 30 s en un vortex.
- ❖ Se deja en reposo a temperatura ambiente, en un intervalo de 30-40 min hasta la formación del color rosado.
- ❖ Se realiza la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 528,2 nm; de las muestras preparadas anteriormente, con los datos de absorbancia se construye la recta de calibración la cual se empleará para la determinación de saponinas en extractos de quinua.



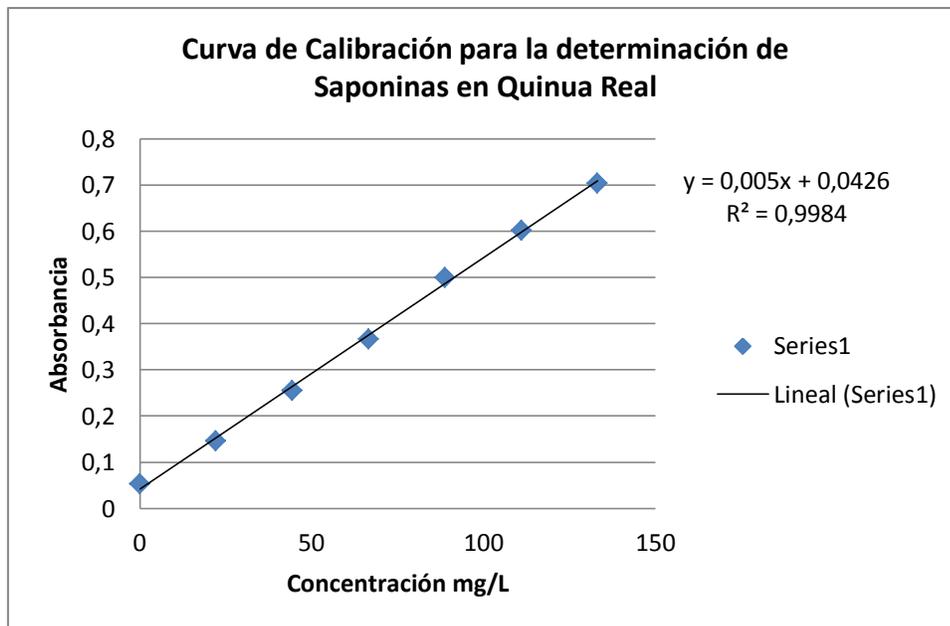


Figura 10. Curva de calibración para la determinación de saponinas en quinoa.

Fuente: Elaboración Propia

3.2.5 CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS TOTALES EN EXTRACTOS ACUOSOS DE QUINUA

a) Protocolo para la extracción de saponinas en muestras de quinoa, y lectura de Absorbancias de los extractos obtenidos.

- ❖ Se pesa 5 g de granos de quinoa en un vaso de precipitados, se agrega 50 mL de Agua destilada. Se agita por el lapso de 30 min a 500 rpm, en un agitador magnético.
- ❖ Se filtra el extracto obtenido.
- ❖ Se toma una alícuota de 1 mL del extracto de saponinas de los granos de quinoa, y se transfiere a los tubos con tapa rosca. Se agrega a cada uno de los tubos 3,5 mL del reactivo de Liebermann-Burchard.
- ❖ Se agita en un vortex a 1500 rpm, durante 30 s y se deja en incubación a temperatura ambiente por 30 min.
- ❖ Posteriormente, realizar la lectura de la absorbancia de las muestras.

El procedimiento se realiza por triplicado.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE SECADO POR ASPERSIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SAPONINAS.

Antes de evaluar los parámetros para el secado del extracto de saponina, se tomó como referencia los parámetros de secado para una muestra de café de cebada, los cuales son: temperatura de entrada de 180°C, tiempo de inyección de la muestra de 5 s, velocidad de la bomba peristáltica de 10 R/min y ciclones de soplado de 25 Hz. ^[5] Se realizaron pruebas con estos parámetros pero se observó quemaduras en el secador por aspersión por la temperatura de 180 °C y debido a una velocidad mayor de la bomba peristáltica, que ocasionó que la muestra no se secará por completo, quedando la muestra húmeda que se queda en las paredes del secador por aspersión y se va quemando; además los ciclones del soplado no son lo suficientemente fuertes para llevar la muestra seca al frasco de recolección del producto.

Por lo cual se fueron variando los parámetros de secado, que se presentan en la tabla 9:

Tabla 9. Variación de parámetros realizados en el equipo de secado por Aspersión

N° de Prueba	T _E /T _S de la Muestra (°C)	Tiempo de inyección de la Muestra (s)	Velocidad de la Bomba Peristáltica (rpm)	Ciclones de Soplado de la Muestra Seca (Hz)
1	90/20	5	10	30
2	90/20	10	30	20
3	100/25	10	20	30
4	115/27	10	20	10
5	120/30	5	10	30
6	130/35-40	5	20	30
7	150/55-65	10	10	20
8	150/55-65	5	4	30
9	175/70	10	15	40
10	180/75	10	15	40

En las pruebas de secado entre las temperaturas de entrada de 90 a 130 °C, no se produce un buen secado, quedándose una parte de la muestra húmeda en el secador. En las pruebas que se realizaron a temperaturas de entrada mayores a 150 °C, se observó que la muestra se quema, excediendo también la temperatura de salida que provoca la degradación de las moléculas de saponinas, que son termolábiles.

Respecto a la velocidad de la bomba peristáltica, que nos indica la velocidad de entrada de la muestra al equipo de secado por aspersión, se lo realiza a 6 rpm, durante 10 min; posteriormente la velocidad se aumenta gradualmente hasta las 9 rpm; si la velocidad se incrementa a un valor mayor ocasiona el taponamiento del inyector.

Todos estos parámetros fueron evaluados, para el secado de saponinas de quinua, habiéndose obtenido mejor rendimiento con los datos que se muestran en la tabla 10:

Tabla 10. Parámetros de secado de saponinas.

T_E/T_S de la Muestra (°C)	Tiempo De Soplado De La Muestra (s)	Velocidad De La Bomba Peristáltica (rpm)	Ciclones De Soplado De La Muestra Seca (Hz)
150/55-65	4	6-9	40

4.2 SECADO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SAPONINAS POR EL MÉTODO DE SECADO POR ASPERSIÓN DETERMINADO.

Se realizó el secado de los extractos acuosos de saponinas, con los parámetros descrito en la tabla 6. Y se obtuvo el siguiente rendimiento, empleando la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{m_x}{m_t} * 100 \text{ [Ec. 3]}$$

Dónde:

- m_x : masa de extracto obtenido después del secado.
- m_t : masa de mojuelo utilizado inicialmente en la extracción.

$$\%R = \frac{31,56 \text{ g}}{44,44 \text{ g}} * 100 = 71,02 \%$$

El rendimiento que se obtuvo con estos parámetros es del 71,0 % m/m; observándose un incremento del rendimiento, en comparación a los métodos de extracción por liofilización que tiene 36,0 % hasta 39,4 % m/m en rendimiento. [1], [3]

Además, cabe mencionar que se optimiza también el tiempo de extracción, ya que por la técnica de secado por aspersion se emplea de 1 a 2 horas y en la técnica de liofilización se emplea 72 horas para su secado.

4.3 OBTENCIÓN DEL ESTÁNDAR EXTRACTO DE SAPONINAS DE QUINUA MEDIANTE MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PUREZA.

Como ya se mencionó anteriormente el extracto seco obtenido puede contener minerales, ácidos grasos, proteínas, colorantes, azúcares libres y saponinas. [1], [6]

- a) **Eliminación de grasas y ácidos grasos.** Para la eliminación de grasas y ácidos grasos se pesó 40 g del extracto seco de saponina y se realizó el desengrasado por la técnica de Soxhlet utilizando como solvente extractor Éter de Petróleo fracción 40-60, terminada la extracción se llevó a secar nuevamente el extracto desengrasado a 45 °C, en una estufa por 24 Hrs hasta la evaporación completa del éter de petróleo y se vuelve a pesar obteniendo un peso de 38,675 g, y con estos datos podemos calcular el porcentaje de ácidos grasos eliminados con la ecuación [3]:

$$R = \frac{m_x}{m_t} * 100\%$$

Dónde:

- m_x : masa de extracto obtenido después del desengrasado.
- m_t : masa del extracto seco utilizado inicialmente en la extracción.

Por lo que tenemos finalmente:

$$\%R = \frac{38,675 \text{ g}}{40,0 \text{ g}} * 100\% = 96,69 \%$$

El porcentaje total del extracto seco desengrasado es el 96,69 %. Y el porcentaje de ácidos grasos eliminados en el proceso de desengrasado es del 3,31 %.

b) **Eliminación de proteínas.** La eliminación de proteínas se realizó mediante su precipitación isoeléctrica cambiando el pH de la muestra. También se realizó un cálculo del porcentaje eliminado en la precipitación isoeléctrica de proteínas utilizando la Ec. 3:

$$R = \frac{m_x}{m_t} * 100\%$$

Dónde:

- m_x : masa del precipitado.

- m_t : masa del extracto seco utilizado inicialmente en la extracción.

Por lo que tenemos finalmente:

$$\%R = \frac{0,948 \text{ g}}{38,68 \text{ g}} * 100\% = 2,45 \%$$

Y el porcentaje de proteínas eliminadas por precipitación isoeléctrica es de 2,45 %.

c) Eliminación de colorantes, micronutrientes y otros componentes de menor peso molecular: Finalmente, para eliminar o realizar la separación de las saponinas de los colorantes, oligosacáridos y demás constituyentes de menor peso molecular, se empleó la técnica de la cromatografía de exclusión molecular Sephadex G-25 realizando un control por CCF, como se mencionó en el apartado 3.2.3, La técnica de fraccionamiento se realizó por quintuplicado obteniendo 5 columnas, donde se observa que en la fracción n° 2 (figura 9), es donde se obtiene mayor cantidad de saponinas. Por lo que de las 5 columnas se obtuvieron 5 fracciones con mayor cantidad de saponinas a continuación se muestra algunas de las placas cromatográficas, que se realizaron en placas de sílica gel de fase reversa de las fracciones N°2 de las placas anteriores (figura 9):

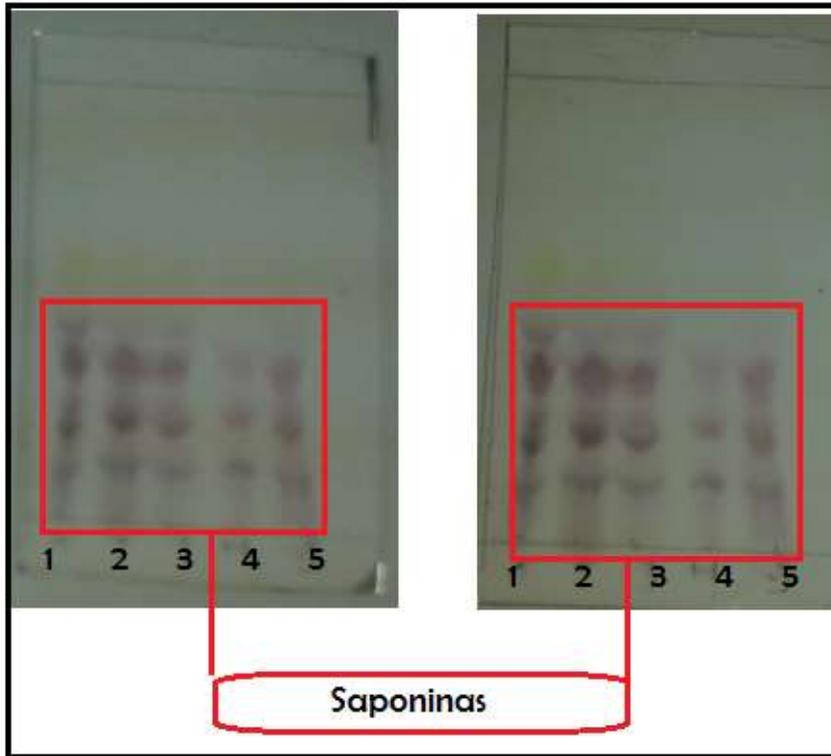


Figura 11. Placas en fase reversa de extractos de saponinas fracciones N° 2.

Fuente: Elaboración Propia

Como se puede observar en las placas cromatograficas en fase reversa, se ven los mismos componentes en las 5 fracciones, por lo que se procedió a unirlas en una sola fracción.

La fracción se llevó a análisis por cromatografía líquida de alta resolución HPLC, el cromatograma se observa en la figura 12:

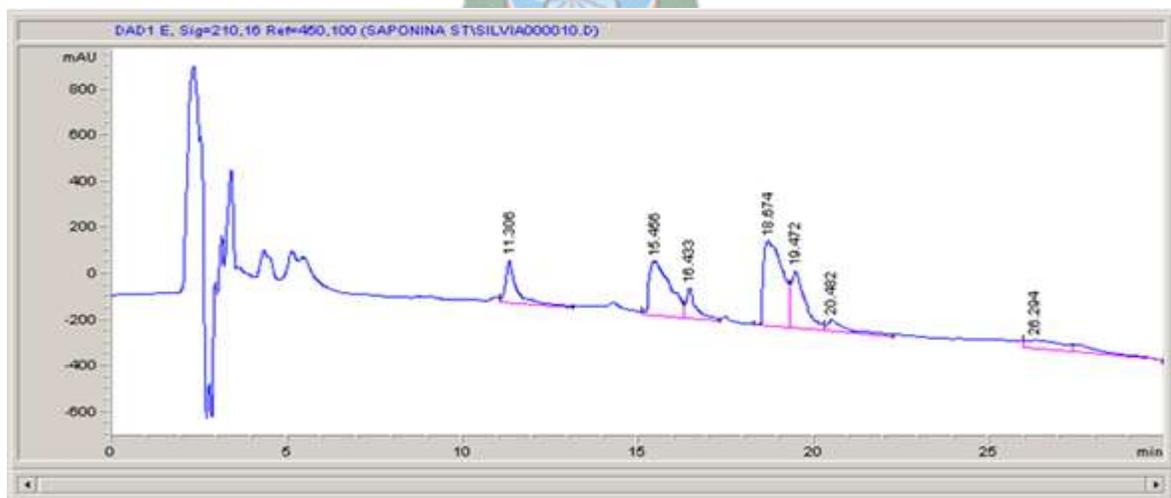


Figura 12. Cromatograma del extracto purificado de Saponinas

Elaboración Propia

Se realiza la comparación con un cromatograma de un extracto al 80 % de pureza, figura 12:

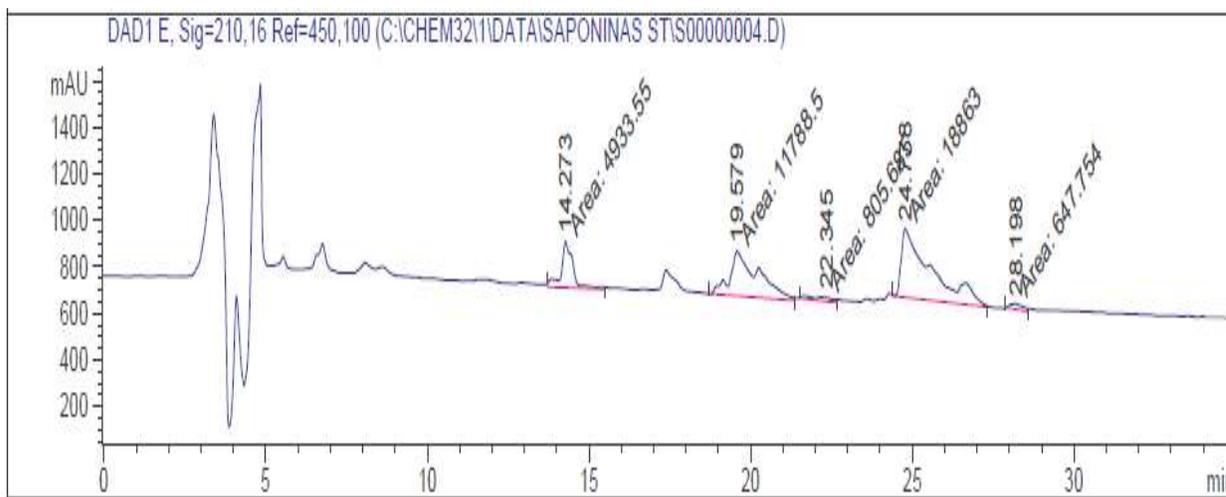


Figura 13. Cromatograma de extracto de saponinas al 80 % de Pureza.

se puede observar una similitud en ambas cromatografías por lo que podemos asumir que el extracto obtenido es aproximadamente del 80 % de pureza.

4.4 ADAPTACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS EN QUINUA.

Se realizó el Barrido de la muestra purificada de saponina, obteniendo una longitud de onda máxima de 528.21 nm, que corresponde al valor del dato Bibliográfico ^{[1]. [3]. [6]}. El barrido de la muestra se realizó por triplicado:

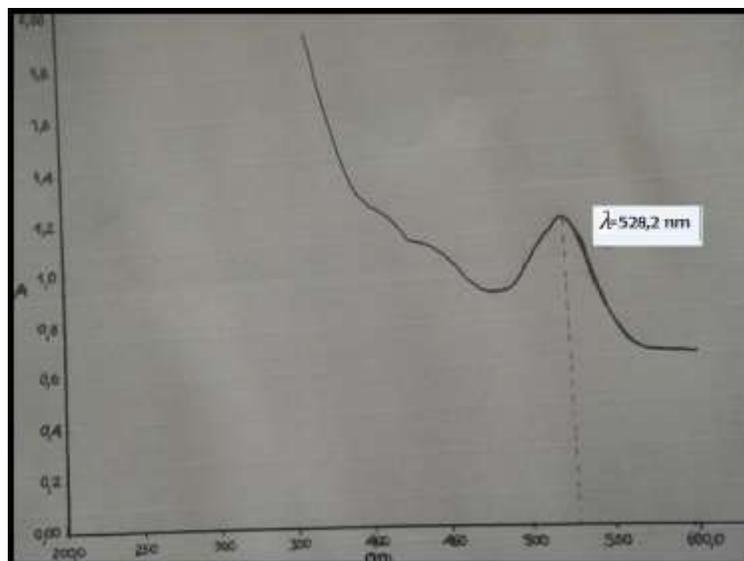


Figura 14. Espectro de barrido del estándar de saponinas, obtención de la longitud máxima de Onda.

Fuente: Elaboración Propia

Para realizar la construcción de la curva de calibración se tomó el dato de la longitud máxima de onda de 528,2 nm.

De la solución madre de 1000 ppm se tomaron diferentes alícuotas y se aforaron con agua destilada en matraces de 5 mL en la siguiente tabla se observan los datos de las concentraciones:

Tabla 11. Diluciones para la construcción de la curva de calibración, para la cuantificación de saponinas en Quinoa Real.

N°	Concentración [ppm]	Volumen de Dilución 5 mL
1	0	0
2	100	0,5
3	200	1,0
4	300	1,5
5	400	2,0
6	500	2,5
7	600	3,0

Como se tomó 1 ml de estas diluciones para posteriormente agregar 3,5 mL del reactivo de Liebermann-Burchard y realizar la lectura de las absorbancias se tiene la siguiente ecuación que será el factor de dilución:

$$FD = \frac{V_m}{V_T} \text{ [Ec. 4]}$$

Dónde:

FD: Factor de Dilución

V_m : Volumen de la muestra (1 mL).

V_T : Volumen de la muestra+ volumen del reactivo LB (4,5 mL).

$$FD = \frac{1 \text{ mL}}{4,5 \text{ mL}} = 0,222$$

Las concentraciones serán:

Tabla 12. Concentraciones reales de las diluciones multiplicadas por el factor de dilución:

N°	Concentración [ppm]	Concentración [ppm] multiplicados por el Factor de Dilución 0,222
1	0	0
2	100	22,2
3	200	44,4
4	300	66,6
5	400	88,8
6	500	111
7	600	133,2

Con estas concentraciones se realizó las lecturas de absorbancias de las diluciones, el procedimiento se realizó por triplicado los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 13. Absorbancias obtenidas en las muestras por triplicado:

N°	Concentración [ppm]	Abs 1.	Abs 2.	Abs 3.	Promedio	Desviación Estándar
1	0	0,0539	0,0533	0,051	0,05273	0,001530
2	22,2	0,146	0,1412	0,1443	0,1438	0,002437
3	44,4	0,2557	0,2501	0,2427	0,2495	0,006521
4	66,6	0,3669	0,3673	0,3515	0,3619	0,009009
5	88,8	0,5003	0,4755	0,5124	0,4961	0,01881
6	111	0,6016	0,6184	0,5911	0,6037	0,01377
7	133,2	0,7047	0,7436	0,705	0,7178	0,02237

Tabla 14. Datos de la concentración y promedio de las absorbancias para la construcción de la curva de calibración.

N°	Concentración [ppm]	Promedio de Abs.
1	0	0,05273
2	22,2	0,1438
3	44,4	0,2495
4	66,6	0,3619
5	88,8	0,4961
6	111	0,6037
7	133,2	0,7178

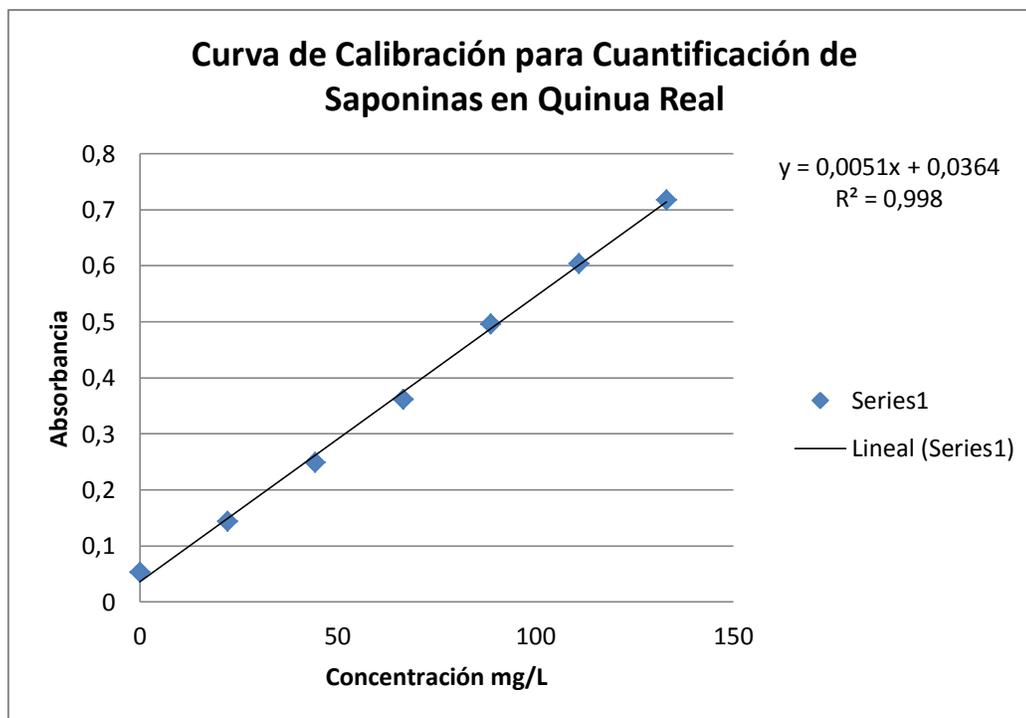


Figura 15. Curva de Calibración para la determinación de saponinas en Quinoa.

Fuente: Elaboración Propia

Como se puede observar en la Curva de Calibración, los resultados muestran una linealidad con un coeficiente de correlación R igual a 0,998. Por lo que podemos mencionar que se cumple la Ley de Beer.

Con respecto a la curva de calibración citada en la referencia [1], realizada desde los 0,0; 22,2; 33,3; 44,4; 55,5; 66,6; hasta 77,7 ppm, se modificaron las concentraciones de las diluciones de la muestra de saponinas. En el presente trabajo se prepararon las diluciones desde los 0,0; 22,2; 44,4; 66,6; 88,8; 111,0; hasta los 133,2 ppm de concentración de saponinas.

4.5 CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS TOTALES EN EXTRACTOS ACUOSOS DE QUINUA

Se realizó la cuantificación de saponinas en 3 muestras de quinoa, los resultados obtenidos se observan en la tabla 15:

Tabla 15. Datos de absorbancias obtenidas del análisis de saponinas por espectrofotometría UV/Vis, en muestras de quinua.

Código	Abs 1	Abs2	Abs3	Promedio de Abs.	Desviación Estándar
QB1	0,3300	0,3280	0,3310	0,3297	0,001527
QB2	0,4330	0,3940	0,3950	0,4073	0,02223
QB3	0,3060	0,3000	0,3020	0,3027	0,003055

Para el cálculo de la concentración de saponinas de las muestras descritas en la tabla 13. Se utiliza la Ec. 5, que se obtuvo de la curva de Calibración:

$$y = 0,0051x + 0,0364 \quad [\text{Ec. 5}]$$

Despejando x tenemos:

$$x = \frac{y-0,0364}{0,0051} \quad [\text{Ec.6}]$$

Dónde:

x: Es la concentración de saponinas en 1 mL de extracto expresado en [ppm].

y: Es la absorbancia de la lectura de la muestra.

Tabla 16. Concentración de saponinas en muestras de quinua.

Código	Promedio de Abs.	x [ppm]	C ₁ [mg/ml]	C ₂ [mg Sap/5g Quinoa]	C ₃ [mg Sap./100g Quinoa]
QB1	0,3297	57,5037	0,2588	12,9382	258,7647
QB2	0,4073	72,7320	0,3273	16,3647	327,2941
QB3	0,3027	52,2092	0,2349	11,7471	234,9412

Aplicando la Norma Boliviana y Norma Andina, para Quinoa que nos indica que el límite máximo de saponinas es de 120 mg de Saponina/100 g de Quinoa. Podemos mencionar que las muestras que fueron evaluadas, sobrepasan el límite permitido.

También se debe mencionar que para la extracción de saponinas se utiliza como solvente extractor agua destilada ^[12], por el hecho de que las saponinas son muy solubles en ella pero se pueden extraer algunos compuestos más que talvez también reacciones con el reactivo empleado.

En la literatura ^{[1], [3], [6]} citan como solventes extractivos principalmente mezclas de agua y etanol o metanol, pero debido a los granos de quinua tienen como componentes a los flavonoides y antioxidantes, que son solubles en estos alcoholes, se utilizó como solvente extractor agua destilada, que también puede extraer azúcares, proteínas y otros elementos que son solubles en agua, pero el reactivo de Liebermann- Burchard sólo reacciona en la presencia de saponinas por lo que no será un interferente en la determinación por UV/Vis.



Capítulo 5

CONCLUSIONES

- ✓ Los parámetros óptimos de secado por aspersion de extractos acuosos de saponinas son temperatura de entrada 150 °C, temperatura de salida 55-65 °C, tiempo de soplado de la muestra de 4 s, velocidad de la bomba peristáltica 6-9 rpm y ciclones de soplado de la muestra seca 40 Hz.
- ✓ El rendimiento de extracto seco de saponinas obtenido con estos parámetros fue el mejor de todas las pruebas realizadas, que tiene un valor de 71% en masa, con un tiempo de secado de 1 a 2 horas. Al comparar este resultado con el obtenido por la técnica de liofilización, se mejora el rendimiento y el tiempo de extracción.
- ✓ La pureza del extracto de saponinas obtenida por medio de las técnicas de separación, es aproximadamente del 80 % de pureza, realizando la comparación con la cromatografía de referencia.
- ✓ El extracto purificado de saponinas se utilizó como estándar para la obtención de la longitud máxima de onda y la construcción de la Curva de calibración.
- ✓ Se realizó la adaptación del método de Cuantificación de Saponinas en muestras de quinua, obteniendo una ecuación lineal que cumple con la ley de Beer-Lambert, con una pendiente igual a 0,0051, intercepto igual a 0,0364 y con un coeficiente de correlación $R=0,998$.
- ✓ Habiéndose realizado el análisis de tres muestras de Quinua, se observó que las muestras analizadas no cumplen con la Norma Boliviana NB-657, que indica que el límite máximo permisible es de 120 mg de saponina/100g de Quinua. Situación que obliga a realizar un tratamiento de eliminación de saponinas antes de su consumo.

Capítulo 6

RECOMENDACIONES

Durante el proceso de secado por aspersión se recomienda filtrar los extractos a secar, ya que cualquier sólido en suspensión ocasiona el taponamiento de la boquilla de aspersión. También se recomienda observar la temperatura de salida de la muestra, puesto que las saponinas se degradan a temperaturas mayores a los 90 °C ^{[1], [3]}.

Se recomienda realizar un análisis cromatográfico de colorantes en el extracto seco obtenido por la técnica de secado por aspersión, ya que los posibles colorantes que contiene el extracto acuoso de saponinas, que son las betainas ^[1] se degradan a los 60 °C. Y durante el secado por aspersión se llega a temperaturas de salida de 55 a 65 °C, y del extracto acuoso de color rojo se obtiene un extracto seco de color amarillo blanquecino, al finalizar el secado, (Ver anexo I. a,b,c,d) por lo cual podrían los colorantes que existiría en el extracto se habrían degradado.

En el preparado del Reactivo de Liebermann-Burchard, se debe medir el volumen necesario de ácido sulfúrico y refrigerar por lo menos 10 min, debido a que cuando se realiza el agregado de Anhídrido acético la reacción es fuertemente exotérmica y también se debe realizar bajo campana, pues al realizar la mezcla de ambos reactivos desprende vapores que son irritantes para el tracto respiratorio ocasionando dolores de garganta, hipoxemia, broncoespasmos, neumonitis y también edema pulmonar. ^{[26], [27]}

Al preparar la solución madre y diluciones para la curva de calibración se recomienda realizarlo cuidadosamente, primero disolver la masa necesaria de estándar de saponina en un vaso de precipitados y posteriormente transferir al matraz erlenmeyer por las paredes del matraz, de manera que no exista espuma antes de realizar el aforado con agua destilada, ya que arrastraría errores al momento de realizar la lectura de las absorbancias, y al realizar la adición del reactivo de Liebermann-Burchard realizarlo con mucho cuidado, pues la reacción es muy exotérmica ^[3].

Antes de desechar el agua de lavado de materiales utilizados para la construcción de la curva de calibración es decir, vasos tubos celdas de vidrio, y otros. Se recomienda neutralizar el pH de las aguas de lavado antes de desecharlas, y evitar contaminación.

Se recomienda realizar un lavado de la Quinoa antes de ser consumido, ya que como se pudo observar en los resultados de las muestras de quinoa, en todos los casos sobrepasan el límite permisible de saponinas. Las saponinas son tóxicas si se ingieren en grandes dosis. ^[28] Según la FAO (Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), el principal efecto de las saponinas es afectar el nivel de colesterol en el hígado y la sangre, con lo que puede producirse un problema en la absorción de nutrientes. ^[29] su capacidad tensoactiva hace que se alteren las membranas celulares aumentando su permeabilidad. ^[30]



Capítulo 7

BIBLIOGRAFÍA

[1] “OBTENCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE SAPONINAS TOTALES DE RESIDUOS DE QUINUA REAL (CHENOPODIUM QUINOA WILL)”, Tesis de grado licenciatura, Licenciada Maribel Lozano, 2011. Universidad Mayor de San Andrés, Laboratorio de Bioorgánica, Instituto de Investigaciones Químicas.

[2] “MICROENCAPSULACIÓN, UN MÉTODO PARA LA CONSERVACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE SUSTANCIAS QUÍMICAS”, Heriberto Castañeta, Rómulo Gemio, Waldo Yapu, Instituto de Investigaciones Químicas-IIQ, UMSA. Revista Boliviana De Química Volumen 28, N°2 -2011.

[3] “EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE SAPONINAS DE SEMILLAS DE Chenopodium quinoa Willd PROVENIENTE DEL NORESTE ARGENTINO”, Tesis Doctoral; Vicente Gianna, 2013 Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

[4] www.opinion.com.bo/opinion/articulos/2013/0611/noticias.php?id=97284.
<http://www.cabolqui.org/es/quinua-real/>

[5] <http://alimentos-andinos.galeon.com/quinua.html>

[6] “ESTUDIO BÁSICO DE LA EXTRACCIÓN DE SAPONINA A PARTIR DEL MOJUELO DE QUINUA”, Tesis de licenciatura, Lic. Edgar Ticona Aranda. UMSA, Instituto de Investigación y Desarrollo de Procesos Químicos- IIDPROQ; Instituto de Investigaciones Químicas-IIQ.

[7] La Quinoa: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial, Oficina Regional para América Latina y el Caribe, Alan Bojanic.

[8] “ESPECTROFOTOMETRÍA: ESPECTROS DE ABSORCIÓN Y CUANTIFICACIÓN COLORIMÉTRICA DE BIOMOLÉCULAS”, Nieves Abril Díaz, J. Antonio Bárcena Ruiz, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

[9] “SECADO POR ASPERSIÓN”, CIMA, Industries Inc. Food and Beverage Equipment, innovando en el proceso de secado.

[10] “SECADO POR ASPERSIÓN: FUNCIONAMIENTO Y VENTAJAS”, <http://www.quiminet.com/articulos/el-secado-por-aspersion-funcionamiento-y-ventajas-2636278.htm>.

[11] “NORMAS TÉCNICAS ANDINAS PARA QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd) Y PRODUCTOS PROCESADOS (hojuelas y harina)”, José Luis Soto, Claudia Kuramoto, Juan Pablo Seleme, Comité Técnico 3.12 Cereales-Quinoa IBNORCA-NOEXPORT. <http://laquinua.blogspot.com/2010/10/normas-tecnicas-andinas-para-quinua.html>.

[12] “ESTUDIO DE UN MÉTODO FÍSICO QUÍMICO DE CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS EN QUINUAS”, Universidad Mayor de San Andrés, Tesis de Licenciatura Pablo Morales Pérez. Departamento de Química.

[13] “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A PARTIR DE LOS DESECHO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa*) UTILIZANDO DOS CEPAS FÚNGICAS AISLADAS DE SUELOS AGRÍCOLAS DE LA CIUDAD DE AREQUIPA-PERÚ”, Viscarra Llenera José, Dongo Martínez Doménica, Vargas Vilca María, Centro de Investigación e Innovación Tecnológica (CICA) Universidad Católica de Santa María, CONCYTEC.

[14] “ESTUDIO DE SECADO POR ASPERSIÓN HASTA ESCALA DE BANCO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *BOERHAAVIA ERECTA* L”. Orestes Darío López Hernández; Leonid Torres Amaroll; María Lidia González Sanabial; Carlos Alberto Rodríguez Ferradá IV, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ciudad de La Habana, Cuba.

[15] “DISEÑO DE UN SECADOR POR ATOMIZACIÓN A NIVEL PILOTO PARA JUGO CONCENTRADO DE TOMATE DE ÁRBOL”, Erik German Yanza Hurtado, Universidad nacional de Colombia Sede Manizales. Departamento de Ingeniería Química, Línea de Profundización alimentos Manizales. <http://www.bdigital.unal.edu.co/1025/1/erickgermanyanzah>.

[16] “MODELADO Y ANÁLISIS DE CONTROLABILIDAD DE UNA TORRE DE SECADO POR ATOMIZACIÓN”, Madalyd Yurani Vera Peña, Hernán Alvarez; <http://aiquruquay.org/congreso/download/TL28.pdf>

[17] “DIMENSIONAMIENTO Y SIMULACIÓN DE UN SECADOR POR ASPERSIÓN DE NIVEL PILOTO” Tesis de Maestro en Ciencias en Bioprocesos, Liliana Ángeles Martínez,

Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, México,D.F., Marzo 2009.

[18] “INTERACCIONES MOLECULARES ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS:SAPONINAS COMO DEFENSAS QUÍMICAS DE LAS PLANTAS Y SU TOLERANCIA A LOS MICROORGNISMOS”, Luz Nelly Díaz Puentes; RET. Revista de Estudios Transdiciplinarios, Vol. 1, julio-diciembre, 2009. Fundación Instituto de Estudios Avanzados Venezuela.

[19] “CONCENTRADOS DE SAPONINA DE CHENOPODIUM QUINOA Y DE CAIPHORA ANDINA: ALTERNATIVAS COMO BIOCONTROLADORES DE HONGOS FITOPATÓGENOS”, Reynaldo Tenorio, Enrique Terrazas, María Teresa Álvarez, José Luis Vila, Patricia Mollinedo, Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, Instituto de Investigaciones en Productos Naturales, Universidad Mayor de San Andrés-UMSA.

[20] “LAS SAPONINAS Y LA BOTÁNICA” J.L.Fontan- Candela, Instituto Español de Fisiología y Bioquímica. C. U. Madrid.

[21] “NUEVOS MÉTODOS EXTRACTIVOS DE SAPONINAS EN SEMILLAS DE QUINOA PARA SU CUANTIFICACIÓN”, Gianna Vicente, Calandri Edgardo, Guzmán Carlos, Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

[22] “MICROENCAPSULACIÓN DE SUSTANCIAS OLEOSAS MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN”, Orestes Darío López Hernández, Ingeniero Químico, Centro de Innovación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Revista Cubana de Farmacia, La Habana, Cuba,2010.

[23] “MICROENCAPSULACIÓN DE JUGO DE CEBADA VERDE MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN”, C. García Gutiérrez, M.B., Gonzales Maldonado, L. A. Ochoa Martínez, H., Ciencia y Tecnología Alimentaria, Vol. 4 diciembre 2004 ;Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos México.

[24] “EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRIMARIA DE SAPONINAS DE *Quillaja Brasiliensis*”. Mauricio Mastrogiovanni, Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados. Motevideo- Uruguay, 2012.

[25] “ELABORACIÓN DE UN EMULSIONANTE COSMÉTICO A BASE DE LAS SAPONINAS DEL AGUA DE LAVADO DE QUINUA (*Chenopodium Quinoa*) EN ERPE”, Tesis de grado, Liliana Jacqueline Gunsha Allauca, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba-Ecuador, 2013.

[26] <https://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/99960-Acidosulfurico.pdf>

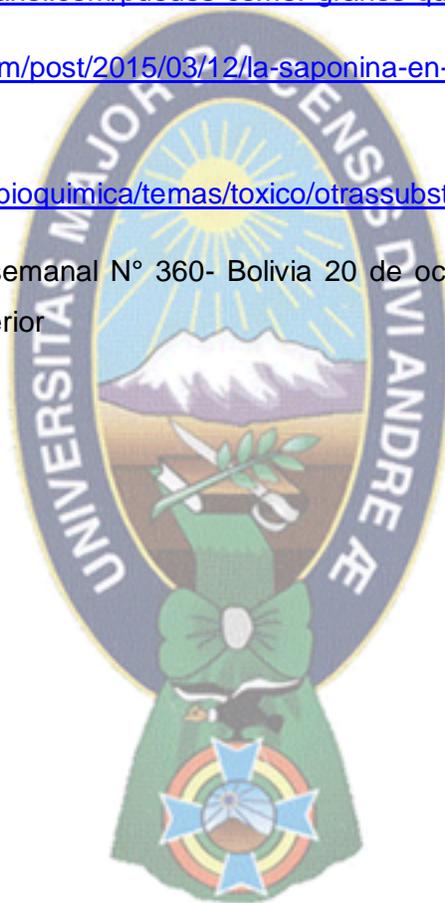
[27] http://147.84.213.10/recursos/ficheros/137907-ANHIDRIDO_ACETICO.pdf.

[28] http://www.ehowenespanol.com/puedes-comer-granos-quinoa-crudos-info_126987/

[29] <http://blog.mumumio.com/post/2015/03/12/la-saponina-en-la-quinoa-que-es-y-como-eliminarla/>

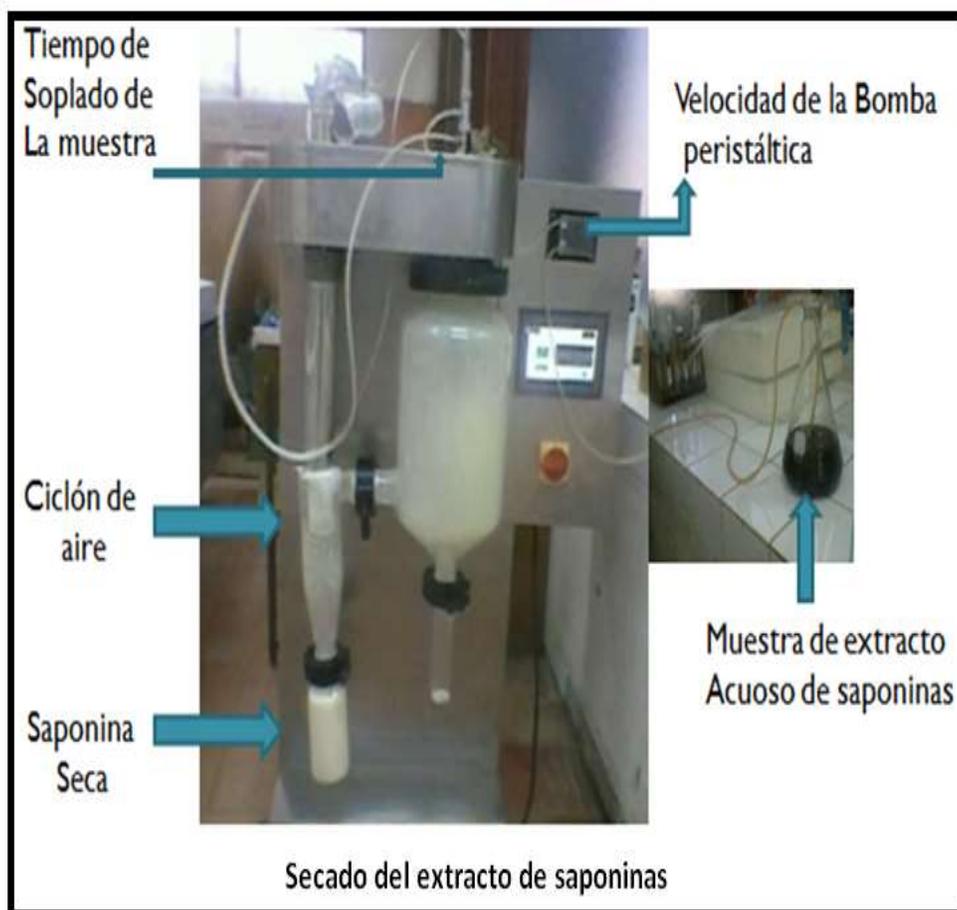
[30] <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/toxico/otrassustancias.html>

[31] Boletín electrónico Bisemanal N° 360- Bolivia 20 de octubre del 2014 (IBCE) Instituto Boliviano de Comercio Exterior



Anexos

Anexo I. Extracción de saponinas



(e) Cascarrilla de Quinoa, obtenida por el proceso de Escarificado

(f) Extracto Acuoso de saponinas.



(a)

(b)

Fuente: Elaboración Propia

(g) Extracto seco de Saponinas obtenido por el método de Secado Por Aspersión.

(h) Extracto Acuoso, preparado a partir del extracto seco de saponinas obtenido por Secado por aspersión.



(c)

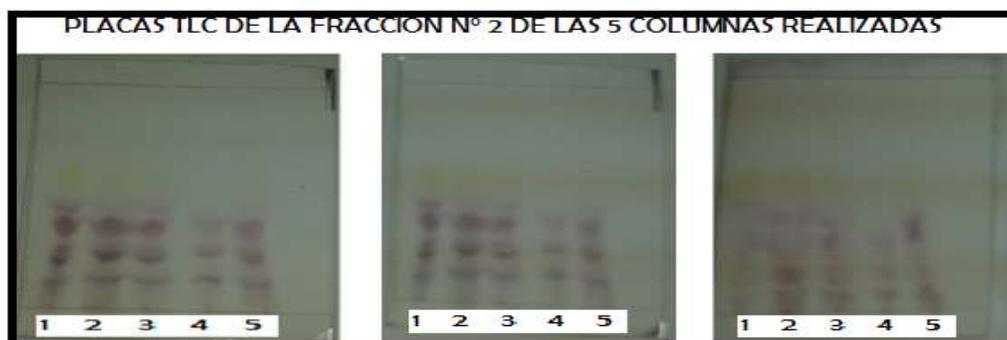
(d)

Fuente: elaboración Propia

Anexo II. Obtención de Saponina Estándar, Desengrasado, Fraccionamiento de Muestras, y Placas TLC en fase reversa de Muestras purificadas de saponinas de Quinua.

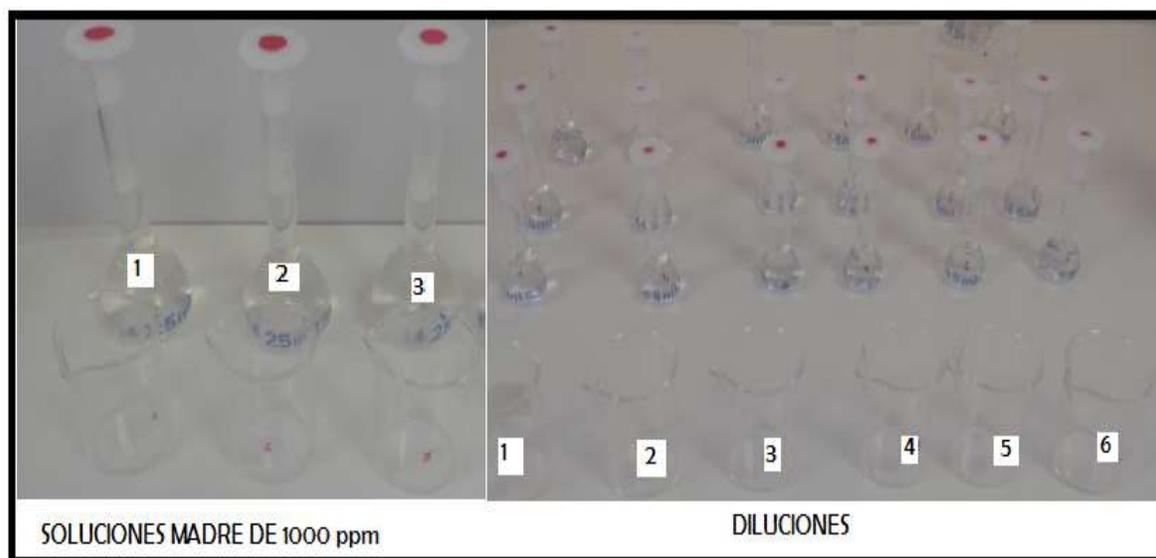
- a) Desengrasado de la muestra seca de saponinas, y obtención de fracciones por cromatografía de exclusión molecular:





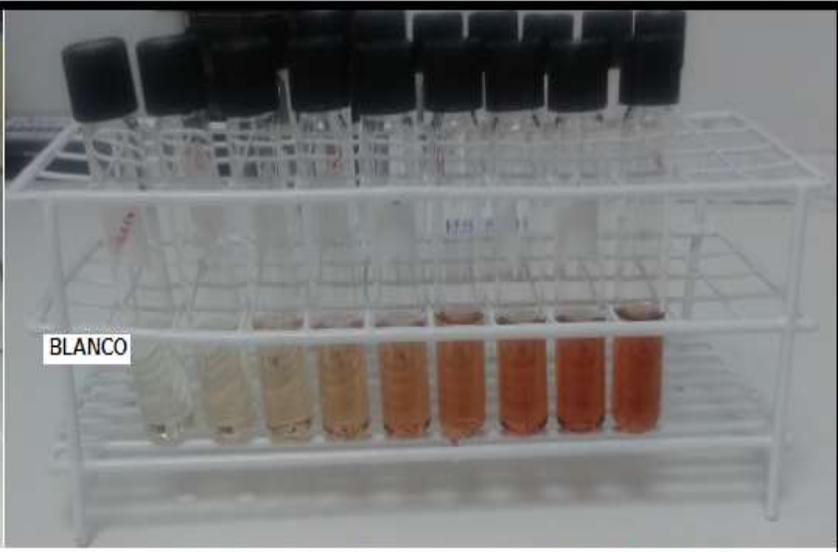
Fuente: Elaboración Propia

Anexo III. Preparación de la Solución Madre, Diluciones y reacción de la muestra con el reactivo de Liebermann-Burchard, para la construcción de la Curva de Calibración.





REACTIVO DE LIEBERMANN-BURCHARD



REACCIÓN DE LAS DILUCIONES CON EL REACTIVO LB

Anexo IV. Extracción de saponinas de muestras de quinua.



EXTRACCION POR AGITACION CONSTANTE



FILTRADO DE EXTRACTO ACUOSO DE SAPONINAS EN QUINUAS

