



# METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN QUINUA



PERÚ

Ministerio  
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

EL PERÚ PRIMERO

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO  
INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA-INIA  
DIRECCIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS Y BIOTECNOLOGÍA  
SUBDIRECCIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS



# METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN QUINUA

Proyecto PNIA 069\_PI

“Caracterización poscosecha de quinuas comerciales del INIA en condiciones productivas de la región Lima para promover su consumo en el mercado nacional e internacional”



# **METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN QUINUA**

## Metodologías analíticas en quinua

Ministerio de Agricultura y Riego

Ministro de Agricultura y Riego  
Ing. Jorge Luis Montenegro Chavesta

Viceministro de Desarrollo e Infraestructura Agraria y Riego  
Econ. Carlos Alberto Ynga La Plata

Viceministra de Políticas Agrarias  
Econ. Paula Rosa Carrión Tello

Jefe del INIA  
Jorge Luis Maicelo Quintana, Ph. D.

© Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA

### Autores:

Fredy Quispe Jacobo  
Hans Amao Castilla  
Carlos Medina Saldivar  
Karina Ccapa Ramirez

### Editado por:

Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA  
Equipo Técnico de Edición y Publicaciones  
Av. La Molina 1981, Lima- Perú  
(51 1) 240-2100 / 240-2350  
www.inia.gob.pe

### Editor general:

Eliana Alviárez Gutierrez, D. Sc.

### Revisión de contenido:

Gabriela Salazar Alvarez  
Betty Flores Gonzales  
Heillen Calderón Castillo

### Diseño y diagramación:

Abner Fernando Mío Torrejón  
Luis Carlos Arévalo Mercado  
Jeams López Acaro

### Publicado:

Diciembre 2019  
Primera edición: Diciembre 2019  
Tiraje: 2 000 ejemplares

### Impreso en:

Vayu Advertising & Communications S.A.C  
De los Ingenieros 110 – Dpto 102 – Surco  
Correo electrónico: ventas@vayucomunicaciones.com  
Teléfono: 964 389 548

ISBN: 978-9972-44-045-8.

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2019-19280

Prohibida la reproducción de este libro por cualquier medio, total o parcialmente, sin permiso expreso.

# Tabla de CONTENIDO

AGRADECIMIENTO .....	9
PRESENTACIÓN .....	10
<b>1. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE SEMILLAS/GRANOS DE QUINUA.....</b>	<b>13</b>
1.1. Longitud, diámetro, área, radio y peso de semillas y granos de quinua.....	13
1.1.1. Fundamento .....	13
1.1.2. Materiales y equipos .....	13
1.1.3. Muestreo .....	13
1.1.4. Preparación de la muestra .....	13
1.1.5. Procedimiento experimental .....	13
1.1.6. Referencias .....	14
Anexo .....	14
1.2. Color de semillas/granos de quinua .....	15
1.2.1. Fundamento .....	15
1.2.2. Materiales y equipos .....	15
1.2.3. Muestreo .....	15
1.2.4. Preparación de la muestra .....	15
1.2.5. Procedimiento .....	15
1.2.6. Referencias .....	15
Anexo .....	16
<b>2. COMPOSICIÓN QUÍMICO-PROXIMAL DE SEMILLAS Y PROCESADOS DE QUINUA.....</b>	<b>17</b>
2.1. Análisis de humedad y materia seca.....	17
2.1.1. Fundamento .....	17
2.1.2. Materiales y equipos .....	17
2.1.3. Muestreo .....	17
2.1.4. Preparación de la muestra .....	17
2.1.5. Procedimiento .....	17
2.1.6. Referencias .....	18
2.2. Análisis de cenizas .....	19
2.2.1. Fundamento .....	19
2.2.2. Materiales y equipos .....	19
2.2.3. Muestreo .....	19
2.2.4. Preparación de la muestra .....	19
2.2.5. Procedimiento .....	19
2.2.6. Referencias .....	20
2.3. Análisis de proteínas.....	21
2.3.1. Fundamento .....	21
2.3.2. Reactivos, materiales y equipos .....	21
2.3.3. Muestreo .....	21
2.3.4. Preparación de la muestra .....	21
2.3.5. Preparación de reactivos .....	21
2.3.6. Procedimiento .....	22
2.3.7. Referencias .....	24
Anexo .....	25

2.4.	Estandarización de la solución de ácido clorhídrico .....	26
2.4.1.	Fundamento .....	26
2.4.2.	Reactivos, materiales y equipos .....	26
2.4.3.	Preparación de los reactivos .....	26
2.4.4.	Procedimiento .....	26
2.4.5.	Referencias .....	27
2.5.	Análisis de grasa .....	28
2.5.1.	Fundamento .....	30
2.5.2.	Reactivos, materiales y equipos .....	30
2.5.3.	Muestreo .....	30
2.5.4.	Preparación de la muestra .....	30
2.5.5.	Preparación de los reactivos .....	28
2.5.6.	Procedimiento .....	28
2.5.7.	Referencias .....	30
2.6.	Análisis de fibra cruda .....	31
2.6.1.	Fundamento .....	31
2.6.2.	Reactivos, materiales y equipos .....	31
2.6.3.	Muestreo .....	31
2.6.4.	Preparación de la muestra .....	31
2.6.5.	Preparación de los reactivos .....	31
2.6.6.	Procedimiento .....	31
2.6.7.	Referencias .....	33
	Anexo .....	34

### 3. COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE SEMILLAS Y PROCESADOS DE QUINUA ..... 35

3.1.	Análisis de compuestos fenólicos totales .....	35
3.1.1.	Fundamento .....	35
3.1.2.	Reactivos, materiales y equipos .....	35
3.1.3.	Muestreo .....	35
3.1.4.	Preparación de la muestra .....	35
3.1.5.	Preparación de los reactivos .....	35
3.1.6.	Procedimiento .....	36
3.1.7.	Referencias .....	37
3.2.	Análisis de flavonoides totales.....	38
3.2.1.	Fundamento .....	38
3.2.2.	Reactivos, materiales y equipos .....	38
3.2.3.	Muestreo .....	38
3.2.4.	Preparación de la muestra .....	38
3.2.5.	Preparación de los reactivos .....	38
3.2.6.	Procedimiento .....	39
3.2.7.	Referencias .....	40
3.3.	Capacidad antioxidante según ABTS.....	41
3.3.1.	Fundamento .....	41
3.3.2.	Reactivos, materiales y equipos .....	41
3.3.3.	Muestreo .....	41
3.3.4.	Preparación de la muestra .....	41
3.3.5.	Preparación de los reactivos .....	41
3.3.6.	Procedimiento .....	41
3.3.7.	Referencias .....	43
3.4.	Capacidad antioxidante según DPPH.....	44
3.4.1.	Fundamento .....	44
3.4.2.	Reactivos, materiales y equipos .....	44
3.4.3.	Muestreo .....	44
3.4.4.	Preparación de la muestra .....	44
3.4.5.	Preparación de reactivos .....	44
3.4.6.	Procedimiento .....	44
3.4.7.	Referencias .....	46

### 4. SAPONINAS EN SEMILLAS/ GRANOS DE QUINUA ..... 47

4.1.	Análisis de saponinas por el método afrosimétrico.....	47
4.1.1.	Fundamento .....	47
4.1.2.	Materiales y equipos .....	47
4.1.3.	Muestreo .....	47
4.1.4.	Preparación de la muestra .....	47
4.1.5.	Procedimiento .....	47
4.1.6.	Referencias .....	48
4.2.	Análisis de saponinas por el método espectrofotométrico UV- Vis.....	49
4.2.1.	Fundamento .....	49
4.2.2.	Reactivos, materiales y equipos .....	49
4.2.3.	Muestreo .....	49
4.2.4.	Preparación de la muestra .....	49
4.2.5.	Preparación de reactivos .....	49
4.2.6.	Procedimiento .....	49
4.2.7.	Referencias .....	51
4.3.	Análisis de saponinas según el método de cromatografía de capa delgada (TLC).....	52
4.3.1.	Fundamento .....	52
4.3.2.	Reactivos, materiales y equipos .....	52
4.3.3.	Muestreo .....	52
4.3.4.	Preparación de la muestra .....	52
4.3.5.	Preparación de los reactivos .....	52
4.3.6.	Procedimiento .....	53
4.3.7.	Referencias .....	54
	Anexo .....	55

### 5. ALMIDÓN DE QUINUA ..... 56

5.1.	Extracción del almidón .....	56
5.1.1.	Fundamento .....	56
5.1.2.	Reactivos, materiales y equipos .....	56
5.1.3.	Muestreo .....	56
5.1.4.	Preparación de la muestra .....	56
5.1.5.	Preparación de los reactivos .....	56
5.1.6.	Procedimiento .....	57
5.1.7.	Referencias .....	57
5.2.	Análisis del contenido de amilosa.....	58
5.2.1.	Fundamento .....	58
5.2.2.	Reactivos, materiales y equipos .....	58
5.2.3.	Muestreo .....	58
5.2.4.	Preparación de la muestra .....	58
5.2.5.	Preparación de los reactivos .....	58
5.2.6.	Procedimiento .....	58
5.2.7.	Referencias .....	60
5.3.	Análisis de solubilidad y poder de hinchamiento .....	61
5.4.	5.3.1. Fundamento .....	61
	5.3.2. Materiales y equipos .....	61
	5.3.3. Muestreo .....	61
	5.3.4. Preparación de la muestra .....	61
	5.3.5. Procedimiento .....	61
	5.3.6. Referencias .....	63

# AGRADECIMIENTO

Al Programa Nacional de Innovación Agraria – PNIA por el financiamiento del Proyecto de Investigación “Caracterización poscosecha de quinuas comerciales del INIA en condiciones productivas de la región Lima para promover su consumo en el mercado nacional e internacional”.

Especialmente dedicamos este trabajo a los investigadores del Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA por su dedicación a la investigación agraria en nuestro país.

5.4. Análisis de las propiedades de pasta .....	64
5.4.1. Fundamento .....	64
5.4.2. Materiales y equipos .....	64
5.4.3. Muestreo .....	64
5.4.4. Preparación de la muestra .....	64
5.4.5. Procedimiento .....	64
5.3.6. Referencias .....	66
<b>6. COMPUESTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA -HPLC .....</b>	<b>67</b>
6.1. Fundamento .....	67
6.2. Reactivos, materiales y equipos .....	67
6.3. Muestreo .....	67
6.4. Preparación de la muestra.....	67
6.5. Preparación de los reactivos.....	67
6.6. Procedimiento .....	68
6.7. Referencias .....	73
<b>7. PLAGUICIDAS EN SEMILLAS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA GC-ECD .....</b>	<b>75</b>
7.1. Fundamento .....	75
7.2. Reactivos, materiales y equipos .....	75
7.3. Muestreo .....	75
7.4. Preparación de la muestra.....	75
7.5. Procedimiento .....	75
7.6. Referencias .....	79
<b>8. MINERALES EN SEMILLAS Y PROCESADOS DE QUINUA POR ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR Y ATÓMICA.....</b>	<b>81</b>
8.1. Análisis de fósforo .....	81
8.1.1. Fundamento .....	81
8.1.2. Reactivos, materiales y equipos .....	81
8.1.3. Muestreo .....	81
8.1.4. Preparación de la muestra .....	81
8.1.5. Preparación de reactivos .....	82
8.1.6. Procedimiento .....	82
8.1.7. Referencias .....	84
8.2. Análisis de potasio, calcio, magnesio, zinc, cobre y hierro .....	85
8.2.1. Fundamento .....	85
8.2.2. Reactivos, materiales y equipos .....	85
8.2.3. Muestreo .....	85
8.2.4. Preparación de la muestra .....	85
8.2.5. Preparación de reactivos .....	85
8.2.6. Procedimiento .....	85
8.2.7. Referencias .....	88
Anexo .....	89



# PRESENTACIÓN

En la actualidad se ha desarrollado, validado y publicado una extensa cantidad de métodos analíticos en quinua dirigidos a la evaluación cualitativa y cuantitativa de analitos en diferentes matrices como semillas, granos crudos, escarificados, cocidos, extruidos, barras energéticas, panes, fideos, entre otros. Esta extensa cantidad de publicaciones y las particularidades de la matriz, su preparación y análisis, representan un reto para todo investigador que desea evaluar analitos de naturaleza primaria, secundaria, mineral o propiedades inherentes a la composición y funcionalidad de la matriz. Por este motivo, el documento técnico “Metodologías analíticas en quinua”, se constituye en un documento de consulta para la aplicación de los diferentes métodos analíticos disponibles en quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*).

El libro “Metodologías analíticas en quinua”, es el resultado de la implementación y validación de métodos analíticos en quinua durante la ejecución del Proyecto “Caracterización poscosecha de quinas comerciales del INIA en condiciones productivas de la región Lima para promover su consumo en el mercado nacional e internacional”, por lo que está dirigido a estudiantes, docentes e investigadores que deseen conocer e implementar metodologías en quinua.

El documento, presenta metodologías analíticas utilizadas en la evaluación de características físicas, color, composición nutricional, fenólicos totales, flavonoides totales, actividad antioxidante, saponinas, almidones y sus propiedades reológicas; así como métodos de cromatografía líquida (HPLC) para el análisis de compuestos fenólicos y cromatografía gaseosa para el análisis de los plaguicidas dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y cipermetrina. En la parte final del documento, se describen los métodos utilizados en la evaluación de minerales, utilizando técnicas espectroscópicas de absorción molecular para el fósforo y absorción atómica (AAS) para el potasio, calcio, magnesio, zinc, cobre y hierro.

Esperamos que la información presentada en el documento, contribuya al análisis de la diversidad de la quinua y los granos andinos, así como su investigación, innovación y puesta en valor.

Los autores





# 1. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE SEMILLAS/GRANOS DE QUINUA

## 1.1. Longitud, diámetro, área, radio y peso de semillas y granos de quinua

### 1.1.1. Fundamento

La determinación de longitud, diámetro, área, radio y peso de las semillas/granos de quinua es importante para controlar su calidad y tecnologías utilizadas dentro de los procesos y operaciones poscosecha de la quinua. Entre estos se encuentran la limpieza, escarificado, lavado, clasificado, transporte, secado y almacenamiento. El conocimiento de la morfología y el tamaño de las semillas/granos de quinua es esencial para el diseño adecuado de los equipos para la limpieza, clasificación y separación (Vilche, Gely, y Santalla, 2003). Los granos de quinua presentan valores de diámetro entre 1.0 mm a 3.0 mm y se considera como un criterio de calidad para los consumidores finales (Gómez y Aguilar, 2016). Según la NTP 205.062, la semilla escarificada de quinua (grano) se clasifica en tres categorías por su diámetro: tamaño grande (mayores a 1.70 mm), tamaño mediano (1.40 mm a 1.70 mm) y tamaño pequeño (menores a 1.40 mm) (INACAL, 2014).

### 1.1.2. Materiales y equipos

*Materiales:* pinzas y espátulas de acero.

*Equipos:* balanza de precisión (Sartorius, TE6101), balanza analítica (AND, HR-250AZ) y microscopio digital de mano (Dino-Lite, AM3113T).

### 1.1.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

### 1.1.4. Preparación de la muestra

Ventear las semillas/granos de forma manual para eliminar restos de paja, tierra y otros materiales extraños. Retirar manualmente los granos defectuosos, tales como semillas/granos quebrados, granos recubiertos (con perigonio) y otros defectos indicados en la NTP 205.062 (INACAL, 2014).

### 1.1.5. Procedimiento experimental

#### *Características morfológicas*

- Seleccionar en forma aleatoria 20 unidades y con la ayuda del microscopio digital (Dino-Lite, AM3113T), tomar fotografías individuales de cada uno de las semillas/granos sobre una superficie blanca.
- Guardar las fotografías tomadas con el microscopio digital en formato JPEG.
- Registrar las medidas de la circunferencia (mm), área (mm<sup>2</sup>) y radio (mm) de las semillas/granos con el software DinoCapture (versión 2.0)
- Calcular el diámetro de las semillas/granos de quinua de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Diámetro (mm)} = \text{radio} * 2$$

Peso de 1 000 semillas/granos (g)

- Seleccionar en forma aleatoria 25 gramos de muestra y con la ayuda de pinzas y espátulas hacer el conteo manual de 1 000 unidades de semillas/granos de quinua. Realizar el conteo por quintuplicado.
- Realizar el pesado de 1 000 semillas/granos en una balanza analítica y registrar los valores obtenidos.

1.1.6. Referencias

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.

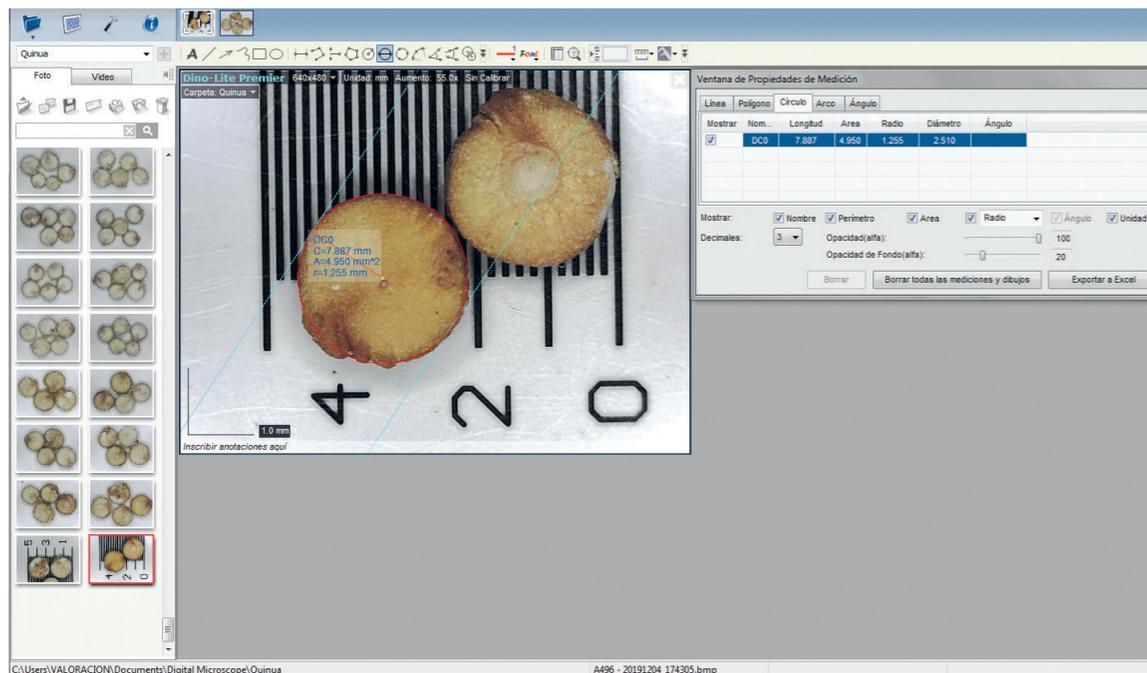
Gómez, L. y Aguilar, E. (2016). Guía de cultivo de la quinua (2nd ed.). Lima: FAO-Universidad Nacional Agraria La Molina.

INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima: INACAL.

Vilche, C., Gely, M. y Santalla, E. (2003). Physical properties of quinoa seeds. *Biosystems Engineering*, 86(1), 5 9–65. doi: 10.1016/S1537-5110(03)00114-4

Anexo

Anexo 1. Características morfológicas de las semillas de quinua



1.2. Color de semillas/granos de quinua

1.2.1. Fundamento

El color es el primer parámetro sensorial de calidad que evalúan los consumidores y es importante para la aceptabilidad de un producto. La evaluación del color mediante inspección visual se caracteriza por ser subjetiva, por ello se recomienda determinar el color mediante el uso de instrumentos que midan el color (León, Mery, Pedreschi, y León, J., 2006). El espacio de color  $L^*a^*b^*$  o CIELab es un estándar internacional, adoptado por la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), para la medición del color y es el más utilizado en alimentos frescos y procesados (Pathare, Opara y Al-Said, 2013). Las semillas de quinua expresan una amplia variedad de colores: blanco, crema, amarillo, anaranjado, rosado, rojo, púrpura, café y negro (Rojas y Pinto, 2015); que se deben a la existencia de moléculas con grupos cromóforos como las betalainas, carotenoides, compuestos fenólicos, entre otros.

1.2.2. Materiales y equipos

**Materiales:** espátulas de acero, placa de vidrio óptico (CM-A128) y placa de calibración (CR-A43).

**Equipos:** colorímetro (Konica Minolta, CR400) y balanza de precisión (Sartorius, TE6101).

1.2.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

1.2.4. Preparación de la muestra

Ventear las semillas/granos de forma manual para eliminar restos de paja, tierra y otros materiales extraños. Retirar de forma manual los granos defectuosos, tales como semillas/granos quebrados, granos recubiertos (con perigonio) y otros defectos indicados en la NTP 205.062 (INACAL, 2014).

1.2.5. Procedimiento

- Calibrar el colorímetro utilizando la placa estándar de color blanco (CR-A43).
- Colocar las semillas/granos de quinua en la placa de vidrio óptico (CM-A128), llenarlo con aproximadamente 10 g de muestra.
- Colocar la placa de vidrio óptico en el accesorio para materiales granulares.
- Registrar los valores triestímulo en el espacio de color  $L^*a^*b^*$ , así como los valores Chroma ( $C^*$ ) y Hue (h).

1.2.6. Referencias

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.

INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima: INACAL.

León, K., Mery, D., Pedreschi, F. y León, J. (2006). Color measurement in  $L^*a^*b^*$  units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(10), 1084–1091. doi: 10.1016/j.foodres.2006.03.006

Pathare, P. B., Opara, U. L. y Al-Said, F. A. J. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36–60. doi: 10.1007/s11947-012-0867-9

Rojas, W. y Pinto, M. (2015). Ex Situ conservation of quinoa: the Bolivian experience. En K. Murphy y J. Matanguiban (Eds.), *Quinoa: Improvement and Sustainable Production* (pp. 125–160). New Jersey: John Wiley & Sons.

Anexo

Anexo 2. Medición del color en espacio CIELab en semillas de quinua



## 2. COMPOSICIÓN QUÍMICO-PROXIMAL DE SEMILLAS Y PROCESADOS DE QUINUA

### 2.1 Análisis de humedad y materia seca

#### 2.1.1. Fundamento

La determinación del contenido de humedad es una de las mediciones más utilizadas e importantes en los procesos de molienda y almacenamiento de cereales. El contenido de humedad se determina según el método 930.15 (AOAC, 1990). Este método se basa en la pérdida del peso debido a la evaporación del agua en el punto de ebullición, hasta llegar al peso constante (Kirk, Sawyer, y Egan, 2008). Por otra parte, la materia seca de un alimento, se entiende como la suma de todos los componentes no volátiles del mismo, incluyéndose lípidos, carbohidratos, proteínas y minerales, entre otros, que se determina en % como la diferencia con respecto al peso total.

#### 2.1.2. Materiales y equipos

*Materiales:* placas y pinzas de acero inoxidable, campana desecadora, gel de sílice y mortero de porcelana.

*Equipos:* balanza analítica (AND, HR-250AZ), estufa (Mettler, UFE 500) y molino ultracentrífugo (Restch, ZM 200).

#### 2.1.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

#### 2.1.4. Preparación de la muestra

##### *Semillas/granos crudos*

Ventear las semillas/granos crudos de forma manual para eliminar restos de paja, tierra y otros materiales extraños y luego, retirar de forma manual los granos defectuosos indicados en la NTP 205.062 (INACAL, 2014). Finalmente, moler las semillas en molino ultracentrífugo a velocidad de 18 000 r.p.m., hasta tamaño de partícula menor de 0.5 mm de diámetro.

##### *Granos procesados (extruidos y cocidos)*

Realizar la molienda de los granos procesados en un molino ultracentrífugo a velocidad de 18 000 r.p.m., hasta tamaños de partícula menores de 0.5 mm de diámetro.

##### *Almidón nativo*

Realizar la molienda de forma manual con un mortero, hasta tamaños de partícula menores de 0.5 mm de diámetro.

#### 2.1.5. Procedimiento

- Pesar 2 g de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) en una placa de acero previamente secada a 98 °C – 100 °C. Registrar el peso de la placa vacía y el peso de la muestra.
- Introducir la placa de acero con la muestra en la estufa a 135 °C a presión atmosférica. Es necesario que la estufa tenga una salida de aire constante.
- Secar el material hasta alcanzar una masa constante.

- Retirar las placas de la estufa y dejar enfriar a temperatura ambiente en la campana desecadora.
- Registrar el peso de la placa más la muestra seca.

#### Cálculo

Reportar la pérdida de peso, como el contenido de humedad y el peso del residuo, como materia seca:

$$\text{Humedad (\%)} = \left( \frac{Pt - Pf}{W} \right) * 100$$

Donde:

$Pt$  = Peso de la placa + peso de la muestra (g)

$Pf$  = Peso de la placa + peso de la muestra seca (g)

$W$  = Peso de la muestra (g)

El contenido de materia seca se calcula por diferencia de (100 %) menos el porcentaje de humedad encontrada.

$$\text{Materia Seca (\%)} = 100 \% - \text{Humedad (\%)}$$

Ejemplo:

Muestra: Almidón de quinua

$W = 2.0000$  g

$Pt = 43.2995$  g

$Pf = 43.0933$  g

$$\text{Humedad (\%)} = \left( \frac{43.2295 - 43.0933}{2.0000} \right) * 100$$

$$\text{Humedad (\%)} = 10.31$$

$$\text{Materia Seca (\%)} = 89.69$$

#### 2.1.6. Referencias

AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed.). Arlington: Association of Analytical Chemists.

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.

INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.

Kirk, R. S., Sawyer, R. y Egan, H. (2008). Composición y análisis de alimentos de Pearson. México D.F.: Grupo Editorial Patria.

## 2.2 Análisis de cenizas

### 2.2.1. Fundamento

El concepto de cenizas se refiere al residuo inorgánico que queda después de la ignición u oxidación completa de la materia orgánica y representa el contenido de sales y minerales de un producto alimenticio (Nielsen, 2010). Las cenizas se determinan según el método 942.05 (AOAC, 1990), el cual se calcula como el residuo que queda luego de calcinar la muestra a 600 °C en una mufla. En el caso de la quinua, el contenido de cenizas es variable, reportándose valores entre 2.12 % y 5.21 % (Rojas y Pinto, 2015).

### 2.2.2. Materiales y equipos

**Materiales:** crisoles de porcelana, espátulas y pinzas de acero, campana desecadora, gel de sílice y mortero de porcelana.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), estufa (Memmert, UFE 500), mufla eléctrica (Thermo Scientific, FB1410M) y molino ultracentrífugo (Restch, ZM 200).

### 2.2.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

### 2.2.4. Preparación de la muestra

Preparar la muestra como se describe en el procedimiento del método "Análisis de humedad y materia seca".

### 2.2.5. Procedimiento

- Pesar 2 g de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) en un crisol de porcelana, previamente secado a 98 °C – 100 °C. Registrar el peso del crisol vacío y el peso de la muestra.
- Introducir el crisol en la mufla eléctrica, encender el equipo y ajustar la temperatura a 600 °C.
- Incinerar las muestras por 2 horas o hasta completar la incineración (residuo final blanco/gris). Apagar la mufla y retirar los crisoles cuando la temperatura al interior de la mufla sea menor a 250 °C.
- Colocar los crisoles en la campana desecadora y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Registrar el peso del crisol más el residuo de la incineración.

#### Cálculo

Reportar el peso del residuo de la ignición como el contenido de ceniza:

$$\text{Cenizas (\%)} = \left( \frac{Pc - Pv}{W} \right) * 100$$

Donde:

$Pv$  = Peso del crisol vacío (g)

$Pc$  = Peso del crisol + cenizas (g)

$W$  = Peso de la muestra (g)

Ejemplo:

Muestra: Semilla de quinua

$P_v = 42.0905$  g

$P_c = 42.1379$  g

$W = 2.0000$  g

$$\text{Cenizas (\%)} = \left( \frac{42.1379 - 42.0905}{2.0000} \right) * 100$$

$$\text{Ceniza (\%)} = 2.37$$

### Observaciones

En el caso del almidón nativo, realizar el calentamiento de la muestra por 1-2 horas a 250 °C y luego subir la temperatura a 600 °C.

### 2.2.6. Referencias

- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed.). Arlington: Association of Analytical Chemists.
- CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.
- INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.
- Nielsen, S. S. (2010). Food analysis (4th ed.). New York: Springer Science+Business Media.
- Rojas, W. y Pinto, M. (2015). Ex Situ conservation of quinoa: the Bolivian experience. En K. Murphy, K. y J. Matanguiban (Eds.), Quinoa: Improvement and Sustainable Production (pp. 125–160). New Jersey: John Wiley & Sons.

## 2.3. Análisis de proteínas

### 2.3.1. Fundamento

El contenido de proteínas se determina según el método 984.13 (AOAC, 1990) con ciertas modificaciones, el cual se fundamenta en el método Kjeldahl. Dentro del método, las proteínas y los demás compuestos orgánicos se digieren con ácido sulfúrico caliente en presencia de catalizadores hasta convertir el nitrógeno orgánico de la muestra en sulfato de amonio. La solución digerida se neutraliza con una solución alcalina y se destila el amonio sobre una solución de ácido bórico. Los aniones borato formados se titulan con una solución ácida estandarizada y se calcula el contenido de nitrógeno de la muestra. El contenido de proteínas de los granos de quinua, en general, son superiores a los reportados en cereales y se encuentran en el rango de 10.21 % a 18.39 % (Rojas y Pinto, 2014), caracterizándose por presentar un alto valor biológico debido a su alto contenido de lisina, el principal aminoácido limitante en los cereales (D'Amico, Schoenlechner, Tömöskösi, y Langó, 2017).

### 2.3.2. Reactivos, materiales y equipos

**Reactivos:** ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, ácido bórico, ácido clorhídrico, sulfato de cobre, sulfato de potasio, etanol absoluto, rojo de metilo y verde de bromocresol. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Merck® y J.T. Baker®.

**Materiales:** espátulas de acero, tubos de digestión, vasos de precipitado, fiolas, matraces, buretas, pipetas graduadas, soporte universal, bombilla de succión y probetas graduadas.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), digestor múltiple (Büchi, K439), destilador automático (Büchi, K355), bomba de aspiración de gases (Velp Scientifica, JP), neutralizador de gases (Velp Scientifica, SMS), campana extractora de gases (Labconco, Premier) y molino ultracentrífugo (Restch, ZM 200).

### 2.3.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

### 2.3.4. Preparación de la muestra

Preparar la muestra como se describe en el procedimiento del método "Análisis de humedad y materia seca".

### 2.3.5. Preparación de reactivos

*Indicador verde de bromocresol-rojo de metilo*

Mezclar 25 mL de solución de verde de bromocresol (0.2 %) diluido en alcohol con 5 mL de solución de rojo de metilo (0.2 %) diluido en alcohol.

*Solución de hidróxido de sodio (30 %)*

Pesar 300 g de hidróxido de sodio en un vaso de precipitado de 1 000 mL, agregar 800 mL de agua destilada y disolver el soluto en una campana extractora de gases. Una vez que el soluto esté completamente disuelto, esperar que la solución se enfríe. Finalmente, trasvasar la solución a una fiola de 1 000 mL y enrasar con agua destilada.

*Solución de ácido bórico (4 %)*

Pesar 4 g de ácido bórico en un vaso de precipitado de 250 mL, agregar 80 mL de agua destilada y calentar la mezcla a 80 °C en un agitador magnético con calefacción. Una vez que el soluto esté completamente disuelto, esperar que la solución se enfríe, luego, trasvasar a una fiola de 100 mL y enrasar con agua destilada.

Solución estandarizada de ácido clorhídrico (0.05 N)

Véase el método “Estandarización de la solución de ácido clorhídrico” detallado en el siguiente método de análisis.

Catalizador sulfato de potasio-sulfato de cobre

Pesar 0.25 g de sulfato de cobre y moler finamente en mortero, agregar 100 g de sulfato de potasio y mezclar hasta homogenizar.

2.3.6. Procedimiento

Digestión

- Pesar 0.25 g de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) en un tubo de digestión Büchi, agregar 1 g de catalizador y luego adicionar 5 mL de ácido sulfúrico concentrado 95 % – 97 %.
- Colocar los tubos en los racks del digestor múltiple y conectar el módulo de aspiración con la bomba y el neutralizador de gases.
- Encender el digestor y crear los métodos de digestión con los perfiles de temperatura indicados en las tablas 1 y 2, de acuerdo a las indicaciones del manual de instrucciones del equipo (BÜCHI, 2017).
- Cargar el método creado para iniciar la digestión de las muestras.

Tabla 1  
Perfil de temperatura para la digestión de semillas y granos crudos/  
procesados de quinua

Etapa	Temperatura	Tiempo
Pre calentamiento	480 °C	-
Etapa 1	480 °C	10 min
Etapa 2	550 °C	10 min
Etapa 3	490 °C	65 min
Etapa 4	50 °C	0 min
Enfriamiento	-	80 min

Tabla 2  
Perfil de temperatura para la digestión de almidón nativo de quinua

Etapa	Temperatura	Tiempo
Pre calentamiento	300 °C	-
Etapa 1	300 °C	100 min
Etapa 2	420 °C	65 min
Etapa 3	50 °C	0 min
Enfriamiento	-	80 min

- Finalizado el proceso de digestión, desconectar el sistema de neutralización de gases y retirar los tubos con las muestras digeridas.

Destilación

- Verificar el nivel de llenado de los tanques de abastecimiento (NaOH (30 %) y agua destilada) y abrir la llave principal del agua para refrigeración.
- Encender el equipo y esperar que culmine la verificación automática del funcionamiento del generador de vapor.
- Ajustar el tiempo de destilación en 5 minutos y la potencia de vapor de destilación (100 %) en el panel de control del destilador.
- Agregar cuidadosamente 15 mL de agua destilada en el tubo de digestión con la muestra digerida y colocar el tubo en la unidad de destilación. Añadir entre 15 mL a 30 mL de solución de hidróxido de sodio (30 %) al tubo de digestión desde el panel de control.
- Colocar 5 mL de solución de ácido bórico (4 %) en un matraz, añadir de 2 a 3 gotas del indicador y colocarlo en el tubo de salida del condensador de la unidad de digestión.
- Destilar la muestra digerida pulsando el botón START del panel de control.
- Finalizado el proceso de destilación, retirar el tubo de digestión y el matraz donde se colectó el destilado.

Titulación

- Titular el destilado obtenido con una solución estandarizada de ácido clorhídrico (0.05 N) hasta que la solución vire de un color verde esmeralda a rojo.
- Registrar el volumen de gasto de la solución estandarizada.

Cálculo

Reportar el contenido de proteína cruda como el contenido de nitrógeno multiplicado por un factor de conversión. En este caso utilizar el factor de conversión de 6.25

$$\text{Nitrógeno (\%)} = \left( \frac{G * N * mPeq N}{W} \right) * 100$$

$$\text{Proteína (\%)} = \% \text{ Nitrógeno} * 6.25$$

Donde:

G = Gasto de solución estandarizada de HCl (mL)  
N = Normalidad de la solución estandarizada de HCL (N)  
mPeq N = Peso miliequivalente de nitrógeno (g/mmol)  
W = Peso de la muestra (g)

Ejemplo:

Muestra: Granos extruidos de quinua  
G = 7.8 mL  
N = 0.05032 N  
mPeq N = 0.014007 g/mmol  
W = 0.2500 g

$$\text{Nitrógeno (\%)} = \left( \frac{7.8 * 0.05032 * 0.014007}{0.2500} \right) * 100$$

$$\text{Proteína (\%)} = 2.20 * 6.25$$

$$\text{Proteína (\%)} = 13.78$$

### Observaciones

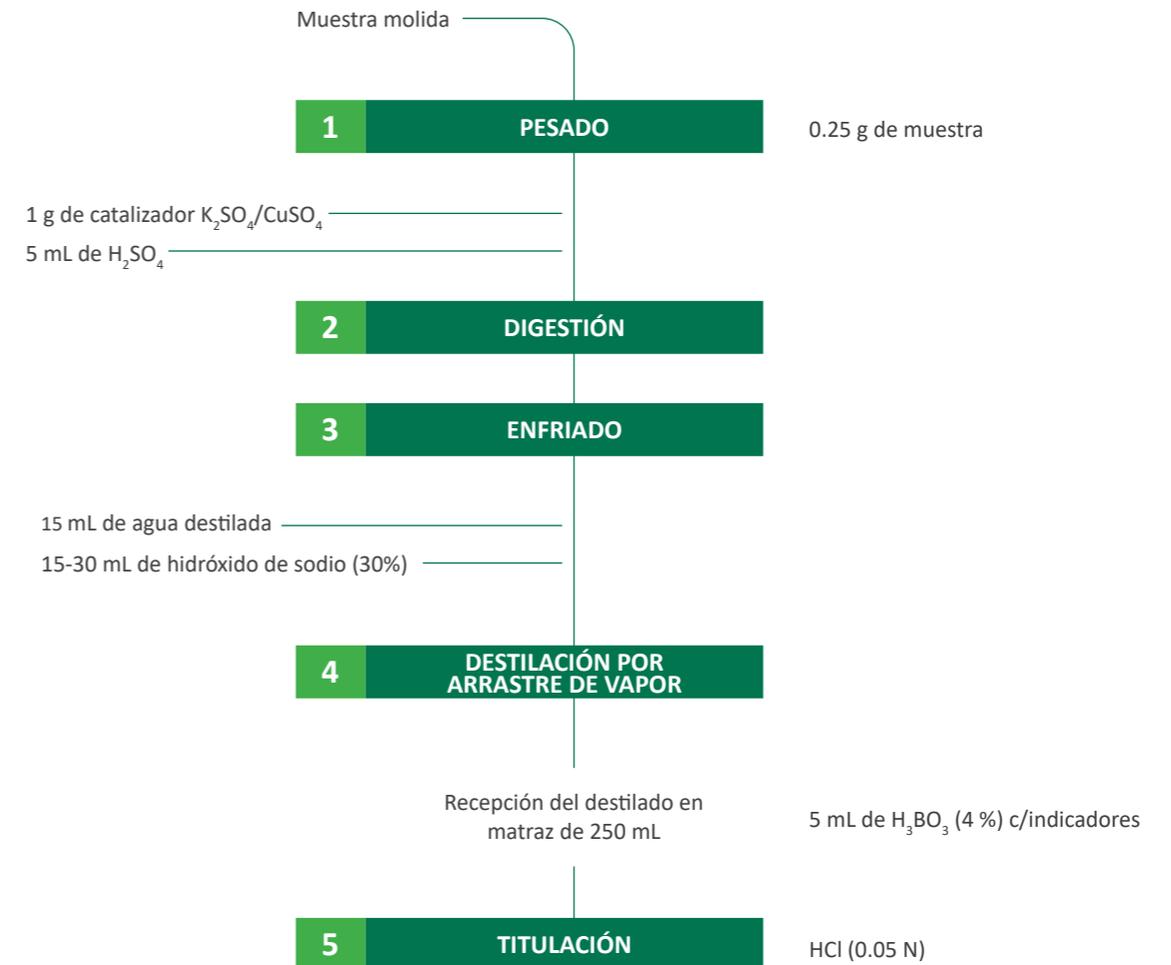
La dilución del hidróxido de sodio genera una reacción exotérmica que genera vapores, por lo que se recomienda utilizar guantes resistentes al calor, para evitar quemaduras y trabajar en la campana extractora de gases.

### 2.3.7. Referencias

- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed.). Arlington: Association of Analytical Chemists.
- BÜCHI. (2016). Manual de instrucciones. Unidad de destilación K-355. Flawil: Büchi Labortechnik AG.
- BÜCHI. (2017). Manual de instrucciones. SpeedDigester K-439. Flawil: Büchi Labortechnik AG.
- CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.
- D'Amico, S., Schoenlechner, R., Tömöskösz, S. y Langó, B. (2017). Proteins and amino acids of kernels. En C. M. Haros & R. Schoenlechner (Eds.), Pseudocereals: Chemistry and Technology (1st ed., pp. 94–118). Oxford, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Rojas, W. y Pinto, M. (2015). Ex Situ conservation of quinoa: the Bolivian experience. In K. Murphy y J. Matanguiban (Eds.), Quinoa: Improvement and Sustainable Production (pp. 125–160). New Jersey: John Wiley & Sons.

### Anexo

Anexo 3. Diagrama de flujo para la determinación del contenido de proteína



## 2.4. Estandarización de la solución de ácido clorhídrico

### 2.4.1. Fundamento

La estandarización de soluciones se basa en la adición de una cantidad de estándar primario, que estequiométricamente sea equivalente a la sustancia objeto de la determinación, con la cual reacciona (Harvey, 1999). La corrección de la normalidad del ácido clorhídrico se realiza según el método 936.15f (AOAC, 1990) con ciertas modificaciones. El punto final de la titulación se produce cuando el indicador cambia a su color característico en medio básico debido a un pequeño exceso de iones OH<sup>-</sup> (Skoog, West, Holler, y Crouch, 2013).

### 2.4.2. Reactivos, materiales y equipos

**Reactivos:** carbonato de sodio, etanol absoluto, rojo de metilo y ácido clorhídrico. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Merck® y J.T. Baker®.

**Materiales:** pinzas y espátulas de acero, vasos de precipitado, matraces, bureta, pipetas y probetas graduadas, fioles, campana desecadora y gel de sílice.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), estufa (Mettler, UF 160), campana extractora de gases (Labconco, Premier) y plancha de calentamiento (Thermo Scientific, SP131530).

### 2.4.3. Preparación de los reactivos

#### Carbonato de sodio anhidro

Secar previamente el carbonato de sodio en una estufa por dos horas a 120 °C y enfriar en una campana desecadora antes de su uso.

#### Indicador rojo de metilo (0.2 %)

Pesar 0.2 g de rojo de metilo en un vaso de precipitado de 250 mL y adicionar 80 mL de etanol absoluto. Agitar la muestra en un agitador magnético hasta disolver por completo el soluto, trasvasar a una fiola de 100 mL y enrasar con el mismo solvente.

#### Solución de ácido clorhídrico (0.05 N)

Medir 250 mL de agua destilada en una fiola de 500 mL, añadir lentamente 2.1 mL de ácido clorhídrico concentrado (ρ = 1.19 g/mL, 36.5 % p/p) por las paredes de la fiola y mezclar la solución. Finalmente, enrasar con agua destilada.

### 2.4.4. Procedimiento

- Pesar 0.02 g de carbonato de sodio (con precisión de 0.1 mg) en un matraz de 125 mL. Registrar el peso de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
- Agregar 30 mL de agua destilada, disolver el soluto y añadir 3 gotas de indicador rojo de metilo.
- Enrasar la bureta con la solución preparada de ácido clorhídrico (0.05 N).
- Titular la solución contenida en el matraz hasta que vire de color amarillo a color rojo.
- Calentar la solución hasta punto de ebullición para remover el CO<sub>2</sub> disuelto. La solución debe virar a color amarillo o anaranjado, porque se tiene una solución diluida sólo con HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.
- Dejar enfriar la solución y continuar con la titulación hasta que la solución vire a color rojo.
- Registrar el volumen de gasto de la solución de HCl.

### Cálculo

Determinar la corrección de la normalidad de acuerdo a la siguiente expresión

$$Normalidad (\%) = \frac{W * 1000}{G * Peq Na_2CO_3}$$

Donde:

W = Peso de carbonato de sodio (g)

G = Gasto del ácido clorhídrico en la titulación (mL)

Peq Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = Peso equivalente del carbonato de sodio (g/mol)

Ejemplo:

W = 0.0205 g

G = 7.6 mL

Peq Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 52.994 g/mol

$$Normalidad = \frac{0.0205 * 1000}{7.6 * 52.994}$$

$$Normalidad = 0.0509$$

### 2.4.5. Referencias

- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed.). Arlington: Association of Analytical Chemists.
- Harvey, D. T. (1999). Modern Analytical Chemistry. New York: McGraw-Hill.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. y Crouch, S. R. (2013). Fundamentals of Analytical Chemistry (9th ed.). Boston: Cengage Learning.

## 2.5. Análisis de grasa

### 2.5.1. Fundamento

El término grasa comprende un amplio grupo de compuestos químicamente diversos que se caracterizan por ser solubles en solventes orgánicos, incluyéndose los triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos, esteroides, ácidos grasos libres, vitaminas liposolubles, carotenoides, clorofila, entre otros. La determinación del contenido de grasa se realiza según los métodos 920.39 y 922.06 (AOAC, 1990) con ciertas modificaciones, los cuales se basan en la extracción directa de la grasa con solventes lipofílicos (Aurand, Woods, y Wells, 1987). El contenido de grasa de la quinua es superior a los reportados en cereales y se encuentra en el rango de 4.0 % a 9.7 % (Rojas y Pinto, 2015), caracterizándose por su alto contenido de ácidos grasos insaturados compuestos principalmente por los ácidos linoleico y oleico (Wood, Lawson, Fairbanks, Robison y Andersen, 1993).

### 2.5.2. Reactivos, materiales y equipos

**Reactivos:** éter de petróleo, etanol absoluto y ácido clorhídrico. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Merck® y J.T. Baker®.

**Materiales:** balones de fondo plano, vasos de precipitado, espátulas y pinzas de acero, lunas de reloj, probetas graduadas, cartuchos de celulosa, extractor Soxhlet, tubos de extracción Mojonnier, campana desecadora, gel de sílice, alcoholímetro y embudos.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), plancha calefactora (Stuart, SB162-3), estufa (Memmert, UFE 500), molino ultracentrífugo (Restch, ZM 200), baño maría (Memmert, WNE 14) y recirculador para refrigeración (VWR, 1167P).

### 2.5.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

### 2.5.4. Preparación de la muestra

Preparar la muestra como se describe en el procedimiento del método "Análisis de humedad y materia seca".

### 2.5.5. Preparación de los reactivos

**Solución etanólica (95 %)**

En una fiola de 500 mL añadir un volumen de 25 mL de agua y enrasar al volumen con etanol absoluto.

**Solución de ácido clorhídrico (25+11)**

Medir 110 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 1000 mL con una probeta graduada y trasvasarlo a un vaso de precipitado de 1 L. En otra probeta graduada, medir 250 mL de ácido clorhídrico y añadir cuidadosamente al vaso de precipitado que contiene agua destilada. Mezclar y dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente.

### 2.5.6. Procedimiento

**Extracción en semillas y granos crudos: Método 920.39 (AOAC, 1990)**

- Pesar 2.5 g de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) en un cartucho de celulosa.
- Introducir el cartucho dentro del extractor Soxhlet. Colocar el balón, que debe estar seco y previamente pesado, al sifón y al condensador del extractor Soxhlet.

- Acercar el balón sobre la plancha de calentamiento y agregar 170 mL de éter de petróleo por la parte superior del sifón, lentamente, hasta que todo el solvente pase a través del sifón. Encender la plancha de calentamiento y programar la temperatura según reflujo del solvente.
- Realizar la extracción entre 6 horas a 8 horas por reflujo, a una velocidad de condensación de 5 a 6 gotas por segundo.
- Transcurrido el tiempo de extracción, retirar el cartucho del sifón, recuperar el éter del sifón, retirar el balón cuando no contenga solvente y prácticamente este se haya recuperado en el sifón.
- Desecar el balón en la estufa a 100 °C durante 30 minutos y enfriar en campana desecadora.
- Registrar el peso del balón seco.

**Extracción en procesados de quinua y almidón nativo: Método 922.06 (AOAC, 1990)**

- Pesar 2.0 g de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) en un vaso de precipitado de 50 mL.
- Añadir 2 mL de alcohol etílico (95 %) asegurándose de humedecer toda la superficie de la muestra, luego añadir 10 mL de la solución de ácido clorhídrico (25+11) y mezclar bien.
- Colocar la mezcla en un baño maría a 80 °C durante 40 minutos, luego enfriar a temperatura ambiente y añadir 10 mL de alcohol etílico (95 %).
- Transferir la mezcla a un tubo de extracción Mojonnier, añadir 50 mL de éter de petróleo y agitar vigorosamente por 1 minuto. Dejar reposar el tubo durante 30 minutos y trasvasar la fase orgánica, previamente filtrado con un cartucho de algodón, a un balón que debe estar seco y previamente pesado.
- Repetir dos veces más la extracción de la mezcla remanente en el tubo con 30 mL de éter de petróleo y decantar. Luego, proceder a juntar la fase orgánica de todas las extracciones en un balón.
- Evaporar el solvente sobre la plancha de calentamiento y retirar el balón cuando no contenga más solvente. Realizar este proceso en el extractor Soxhlet para recuperar el solvente.
- Desecar el balón en la estufa a 100 °C durante 30 minutos, enfriar y pesar.
- Registrar el peso del balón seco.

### Cálculo

Reportar el peso del residuo seco del balón como el contenido de grasa:

$$\text{Grasa (\%)} = \left( \frac{Pf - Pb}{W} \right) * 100$$

Donde:

$Pb$  = peso del balón vacío (g)  
 $Pf$  = peso del balón + grasa (g)  
 $W$  = Peso de la muestra (g)

Ejemplo:

Muestra: Semillas de quinua  
 $Pb = 113.7323$  g  
 $Pf = 113.9062$  g  
 $W = 2.5191$  g

$$\begin{aligned} \text{Grasa (\%)} &= \left( \frac{113.9062 - 113.7323}{2.5191} \right) * 100 \\ \text{Grasa (\%)} &= 6.90 \end{aligned}$$

#### Observaciones

No añadir agua directamente al ácido clorhídrico concentrado pues se genera una reacción exotérmica que puede provocar la proyección del ácido causando quemaduras. Usar equipos de protección personal durante la preparación de la solución y medir el ácido dentro de una campana extractora de gases.

#### 2.5.7. Referencias

- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed., Vol. 2). Arlington: Association of Analytical Chemists.
- Aurand, L. W., Woods, A. E., y Wells, M. R. (1987). Food Composition and Analysis. New York: Springer Science+Business Media.
- CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.
- INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.
- Rojas, W. y Pinto, M. (2015). Ex Situ conservation of quinoa: the Bolivian experience. En K. Murphy, K. y J. Matanguiban, (Eds.). Quinoa: Improvement and Sustainable Production (pp. 125–160). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Wood, S. G., Lawson, L. D., Fairbanks, D. J., Robison, L. R. y Andersen, W. R. (1993). Seed lipid content and fatty acid composition of three quinoa cultivars. Journal of Food Composition and Analysis, 6(1), 41–44. doi: 10.1006/jfca.1993.1005

## 2.6. Análisis de fibra cruda

### 2.6.1. Fundamento

El contenido de fibra cruda se determinó usando el método 962.09 (AOAC, 1990) con ciertas modificaciones. El término fibra cruda se define como la porción que se pierde en la incineración del residuo seco obtenido tras la digestión de las muestras con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.25 %) (p/v) y NaOH (1.25 %) (p/v) bajo condiciones específicas, donde la mayor parte del residuo está constituido por celulosa, hemicelulosa y lignina (Aurand, Woods y Wells, 1987). Este procedimiento permite recuperar del 50 % al 80 % del contenido total de celulosa, 10 % a 50 % del contenido total de lignina y 20 % del contenido total de hemicelulosa (Spiller, 2001). En el caso de la quinua, el contenido de fibra cruda se encuentra en el rango de 3.46 % a 9.68 % (Rojas y Pinto, 2015).

### 2.6.2. Reactivos, materiales y equipos

Reactivos: ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, etanol absoluto y celite. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Megazyme® y J.T. Baker®.

Materiales: espátulas y pinzas de acero, pipetas graduadas, fiolas, vasos de precipitado, crisoles Gooch con disco fritado (tamaño de poro: 40 µm - 60 µm), matraz Kitasato, campana desecadora, gel de sílice, embudos, alcoholímetro, baguetas y condensador de bola.

Equipos: balanza analítica (AND, HR-250AZ), plancha calefactora (Thermo Scientific, SP131530), estufa (Mettler, UFE 500), molino ultracentrífugo (Restch, ZM 200), bomba de vacío (Büchi, V700) y recirculador para refrigeración (VWR, 1167P).

### 2.6.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

### 2.6.4. Preparación de la muestra

Preparar la muestra como se describe en el procedimiento del método “Análisis de humedad y materia seca”.

### 2.6.5. Preparación de los reactivos

#### Solución etanólica (95 %)

En una fiola de 500 mL añadir un volumen de 25 mL de agua y enrasar al volumen con etanol absoluto.

#### Solución de ácido sulfúrico (0.255 N)

Medir 500 mL de agua destilada en una fiola de 1 000 mL, añadir cuidadosamente 7.1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (ρ = 1.84 g/mL, 98 % p/p) y mezclar la solución. Enrasar con agua destilada.

#### Solución de hidróxido de sodio (0.313 N)

Pesar 12.52 g de hidróxido de sodio, agregar el contenido a una fiola de 1 000 mL que contiene un volumen de 400 mL de agua destilada, agitar vigorosamente hasta que se disuelva por completo el soluto y esperar que se enfríe. Enrasar con agua destilada

### 2.6.6. Procedimiento

- Pesar 2.0 g de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) y desengrasar si el contenido de grasa es mayor al 1 %, de acuerdo al método de extracción 920.39 (AOAC, 1990).

- Transferir la muestra desengrasada a un vaso de precipitado de 600 mL, agregar 0.3 g de celite y 200 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.255 N). Colocar los refrigerantes tipo bola en cada vaso de precipitado para la condensación de los vapores ácidos durante la ebullición.
- Llevar la solución a ebullición durante 30 minutos en la plancha de calentamiento. Girar el vaso de precipitado cada 10 minutos para recuperar las partículas que se adhieran a las paredes.
- Retirar el vaso de precipitado de la plancha de calentamiento y filtrar a través de un crisol Gooch con la bomba de vacío. Incinerar el crisol previamente a 525 °C durante 6 horas.
- Lavar el residuo tres veces con 50 mL de agua destilada caliente y apagar la bomba de vacío.
- Trasvasar el residuo al vaso de precipitado y agregar 200 mL de NaOH (0.313 N). Colocar los refrigerantes tipo bola en cada vaso de precipitado para la condensación de los vapores del medio básico durante la ebullición.
- Llevar la solución a ebullición durante 30 minutos en la plancha de calentamiento. Girar el vaso de precipitado cada 10 minutos para recuperar las partículas que se adhieran a las paredes.
- Retirar el vaso de precipitado de la plancha de calentamiento y filtrar a través del mismo crisol Gooch utilizado anteriormente con la bomba de vacío.
- Lavar el residuo con 25 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.255 N) caliente, luego, tres veces con 50 mL de agua destilada caliente y finalmente, lavar el residuo con 25 mL de solución etanólica (95 %).
- Secar el crisol Gooch con el residuo de la digestión a 130 °C por 2 horas, enfriar en un desecador. Registrar el peso del crisol con el residuo seco.
- Incinerar el crisol Gooch con el residuo seco a 525 °C durante 5 horas, enfriar en un desecador. Registrar el peso del crisol con el residuo incinerado.

#### Cálculo

Reportar la diferencia de peso entre el residuo seco y el residuo incinerado de las muestras digeridas como el contenido de fibra cruda:

$$Fibra\ cruda\ (\%) = \left( \frac{Pe - Pm}{W} \right) * 100$$

Donde:

Pe = Peso del crisol con el residuo seco (g)

Pm = Peso del crisol con el residuo incinerado (g)

W = Peso de la muestra (g)

Ejemplo:

Muestra: Semillas de quinua

Pe = 24.6827 g

Pm = 24.6189 g

W = 2.5000 g

$$Fibra\ cruda\ (\%) = \left( \frac{24.6827 - 24.6189}{2.5000} \right) * 100$$

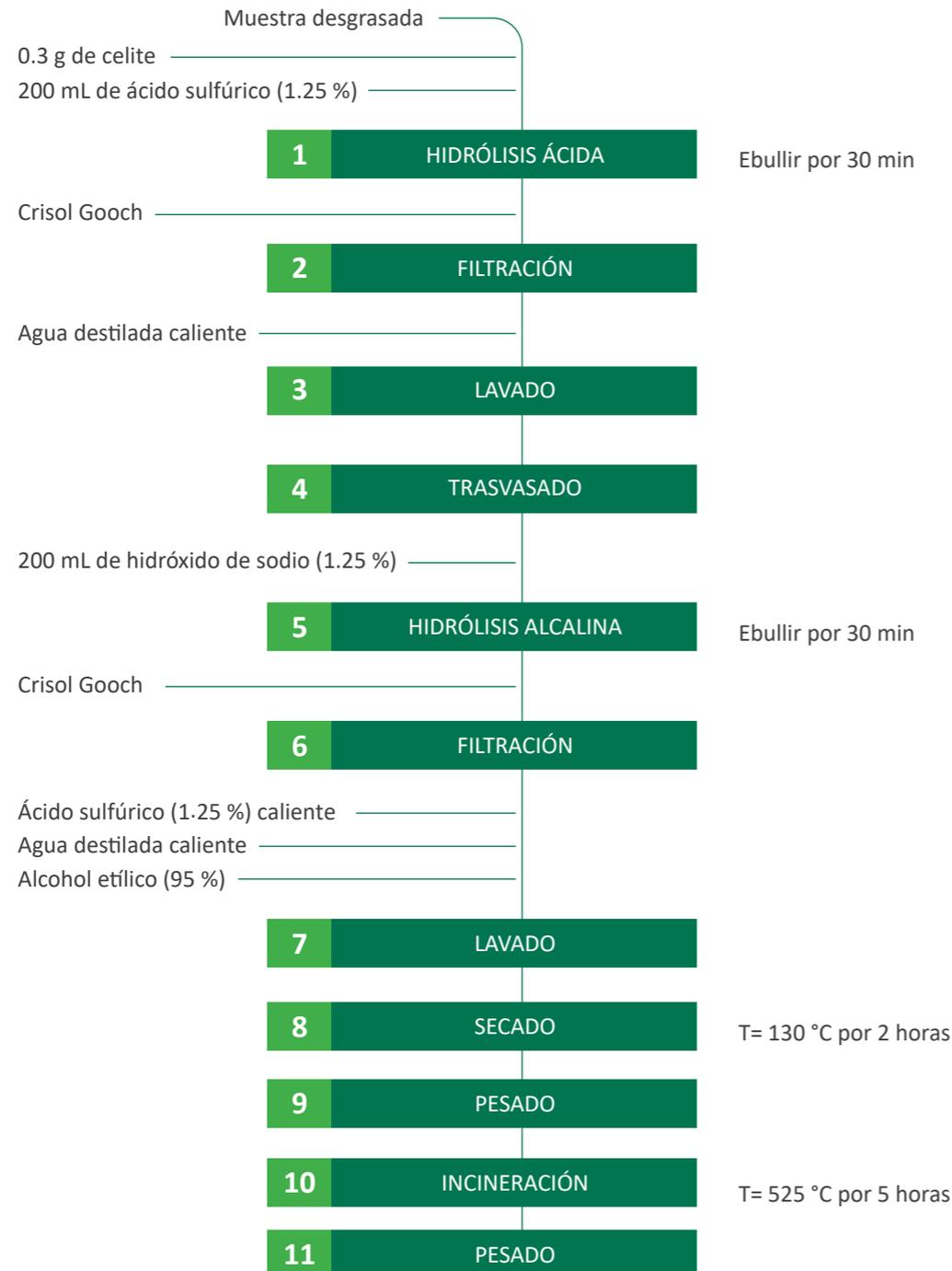
$$Fibra\ cruda\ (\%) = 2.55$$

#### 2.6.7. Referencias

- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed., Vol. 2). Arlington: Association of Analytical Chemists.
- Aurand, L. W., Woods, A. E. y Wells, M. R. (1987). Food Composition and Analysis. New York: Springer Science+Business Media.
- CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.
- INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinoa. Requisitos. Lima, Perú.
- Rojas, W. y Pinto, M. (2015). Ex Situ conservation of quinoa: the Bolivian experience. En K. Murphy y J. Matanguiban (Eds.), Quinoa: Improvement and Sustainable Production (p. 235). New Jersey, USA: John Wiley & Sons Ltd.
- Spiller, G. A. (2001). Handbook of dietary fiber in human nutrition (3rd ed.). Boca Raton: CRC Press.

Anexo

Anexo 4. Diagrama de flujo para la determinación del contenido de fibra cruda



### 3. COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE SEMILLAS Y PROCESADOS DE QUINUA

#### 3.1 Análisis de compuestos fenólicos totales

##### 3.1.1. Fundamento

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales fuentes de metabolitos secundarios de los vegetales, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Están compuestos por fenoles simples, ácidos fenólicos, derivados del ácido hidroxibenzoico y cinámico, flavonoides, cumarinas, estilbenos, taninos y lignanos, entre otros (Ho, Rafi y Ghai, 2008). La extracción de los compuestos fenólicos se realiza según el método propuesto por Hirose, Fujita, Ishii, y Ueno (2010) con ciertas modificaciones, mientras que la detección y cuantificación se realiza por método colorimétrico propuesto por Singleton y Rossi (1965). En este método, el ácido fosfomolibdotúngstico (formado por tungstato sódico y molibdato sódico en medio ácido), de color amarillo, se reduce en medio alcalino por los grupos fenólicos dando lugar a la formación de un complejo de color azul intenso el cual se cuantifica a 760 nm (Naczky y Shahidi, 2004).

##### 3.1.2. Reactivos, materiales y equipos

**Reactivos:** ácido gálico anhidro, metanol, reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Merck® y J.T. Baker®.

**Materiales:** espátulas de acero, vasos de precipitado, fiolas, tubos de vidrio con tapa rosca, gradillas, micropipetas, puntas para micropipeta, baguetas y probetas graduadas.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), molino ultracentrífugo (Restch, ZM 200), baño maría (Memmert, WNE14), agitador de tubos (Thermo Scientific M37610-33), cronómetro (Kenko, KK-5898) y espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S).

##### 3.1.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

##### 3.1.4. Preparación de la muestra

###### Semillas/granos crudos

Ventear las semillas de forma manual para eliminar restos de paja, tierra y otros materiales extraños, retirar de forma manual los granos defectuosos indicados en la NTP 205.062 (INACAL, 2014). Finalmente, realizar la molienda de las semillas en molino ultracentrífugo a velocidad de 18 000 r.p.m., hasta tamaños de partícula menor de 0.5 mm de diámetro.

###### Granos procesados (extruidos y cocidos)

Moler los granos procesados en un molino ultracentrífugo a la velocidad de 18 000 r.p.m., hasta obtener tamaños de partícula menores de 0.5 mm de diámetro.

##### 3.1.5. Preparación de los reactivos

###### Solución de metanol (2:1)

Añadir en una probeta graduada de 500 mL un volumen de 200 mL de metanol, luego, añadir 100 mL de agua destilada y mezclar con una bagueta.

*Solución del reactivo Folin-Ciocalteu (1:4)*

Medir 20 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (2 N) con una pipeta graduada y trasvasar a una fiola de 100 mL. Enrasar con agua destilada, homogeneizar y almacenar la solución en un frasco ámbar.

*Solución de carbonato de sodio (10 %)*

Pesar 10 g de carbonato de sodio, agregar el contenido a una fiola de 100 mL que contiene un volumen de 40 mL de agua destilada, agitar vigorosamente hasta que se disuelva por completo la sal y enrasar con agua destilada.

3.1.6. Procedimiento

*Extracción*

- Pesar 200 mg de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) en un tubo cónico de plástico para centrífuga de 15 mL.
- Agregar 5 mL de la solución de metanol (2:1) y agitar por 15 segundos en el agitador de tubos.
- Colocar los tubos con las muestras en el baño maría a 50 °C por 60 minutos. Durante este tiempo, agitar las muestras con el agitador de tubos cada 15 minutos.
- Retirar del baño maría los tubos con las muestras y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Centrifugar los tubos con las muestras a 6 000 r.p.m., a 25 °C por 10 minutos.
- Filtrar el extracto con un filtro de membrana de 0.45 µm en una fiola de 10 mL y enrasar con la solución de metanol (2:1).

*Determinación*

- Extraer 1 mL del extracto obtenido y trasvasar a un tubo de vidrio de 13 mm x 100 mm.
- Agregar 3 mL de agua destilada y 1 mL de solución del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:4). Agitar durante 15 segundos en el agitador de tubos
- Agregar 1 mL de solución de carbonato de sodio (10 %) y agitar durante 15 segundos en el agitador de tubos.
- Dejar en reposo los tubos en oscuridad por 60 minutos a temperatura ambiente.
- Medir las absorbancias de las muestras en las celdas de cuarzo a 760 nm en el espectrofotómetro.

*Preparación de la curva estándar con ácido gálico*

- Preparar una solución stock de ácido gálico 1 mg/mL. Pesar 10 mg de ácido gálico y llevar a un volumen final de 10 mL con solución de metanol (2:1).
- Preparar una solución intermedia de 0.1 mg/mL de ácido gálico extrayendo una alícuota de 1 mL de la solución stock y llevar a un volumen final de 10 mL con solución de metanol (2:1).
- Preparar soluciones con seis diferentes niveles de concentración para la curva de calibración, siendo las concentraciones seleccionadas de 5, 10, 15, 20, 30 y 40 mg/L, extraer alícuotas de 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 mL de la solución intermedia y llevar a un volumen final de 5 mL con solución de metanol (2:1).
- Elaborar la curva de calibración, verificar que el rango de absorbancias se encuentre aproximadamente entre 0.1 y 0.8.

**Cálculos**

- Graficar la concentración de cada solución estándar versus los valores de absorbancia.
- Interpolarse en la curva de calibración el valor de la absorbancia y calcular la concentración de la muestra.

Calcular la cantidad de compuestos fenólicos totales como equivalente mg de ácido gálico/g de muestras (mg GAE/g), u la ecuación de la curva estándar ( $r^2=0.9998$ ,  $y=0.018x+0.0152$ ).

$$\frac{\text{Compuestos Fenólicos Totales (mg GAE/g)}}{W * 1000} = \frac{[A-b/m] * V}{W * 1000}$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra obtenidas después de la reacción a 760 nm  
 b = Constante intercepción en eje Y de la curva de calibración  
 m = Pendiente de la curva de calibración  
 V = Volumen a diluir la muestra en la primera dilución (10 mL)  
 W = Peso de la muestra (g)

Ejemplo:

Muestra: Semillas de quinua  
 A = 0.538  
 V = 10 mL  
 W = 0.2000  
 m = 0.0180  
 b = 0.0152

$$\frac{\text{Compuestos Fenólicos Totales (mg GAE/g)}}{0.2000 * 1000} = \frac{[(0.538 - 0.0152 / 0.018) * 10]}{0.2000 * 1000}$$

$$\frac{\text{Compuestos Fenólicos Totales (mg GAE/g)}}{2000} = 1.45$$

**Observaciones**

Los valores de la curva de calibración corresponden a la información presentada en el documento.

3.1.7. Referencias

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.

Hirose, Y., Fujita, T., Ishii, T. y Ueno, N. (2010). Antioxidative properties and flavonoid composition of Chenopodium quinoa seeds cultivated in Japan. Food Chemistry, 119(4), 1300–1306. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.09.008

Ho, C. T., Rafi, M. M. y Ghai, G. (2007). Bioactive substances: nutraceuticals and toxicants. In Fennema's Food Chemistry (pp. 763-794). CRC Press.

INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.

Naczk, M. y Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography, 1054(1), 95–111. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.059

Singleton, V. L. y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16(3), 144–158.

## 3.2. Análisis de flavonoides totales

### 3.2.1. Fundamento

Los flavonoides son compuestos fenólicos presentes en casi todos los tejidos vegetales. Sobre los 8 000 fenólicos identificados en plantas se identificaron al menos 5 000 flavonoides. Estos compuestos dependiendo de la posición del anillo  $\beta$  se clasifican como: flavonoides, isoflavonoides y neoflavonoides. En el caso de los flavonoides estos se dividen según su grado de oxidación y saturación del anillo C en: flavanonas, flavonas, flavonoles, dehidroflavonoles, flavan-3-ol, flavan-4-ol, flavano-3,4-dioles (leucoantocianidinas) y antocianidinas (Santana-Gálvez y Jacobo-Velásquez, 2018). La detección y cuantificación de flavonoides totales se realizó usando el método colorimétrico propuesto por Dini, Tenore y Dini (2010) con ciertas modificaciones. Este método se basa en la formación de un complejo de los iones aluminio con los flavonoides que en medio alcalino presentan un color rojo intenso el cual se cuantifica a 510 nm (Pękal y Pyrzyńska, 2014).

### 3.2.2. Reactivos, materiales y equipos

**Reactivos:** catequina, metanol, nitrito de sodio, cloruro de aluminio e hidróxido de sodio. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Merck® y J.T. Baker®.

**Materiales:** espátulas de acero, vasos de precipitado, fioles, tubos de vidrio con tapa rosca, gradillas, micropipetas y puntas para micropipeta.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), molino ultracentrífugo (Restch, ZM 200), baño maría (Mettler, WNE14), agitador de tubos (Thermo Scientific M37610-33), cronómetro (Kenko, KK-5898) y espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S).

### 3.2.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

### 3.2.4. Preparación de la muestra

Preparar la muestra como se describe en el procedimiento del método "Análisis de compuestos fenólicos totales".

### 3.2.5. Preparación de los reactivos

#### Solución de metanol (2:1)

Añadir en una probeta graduada de 500 mL un volumen de 200 mL de metanol, luego, añadir 100 mL de agua destilada y mezclar con una bagueta.

#### Solución de nitrito de sodio (5 %)

Pesar 5 g de nitrito de sodio y agregar el contenido a una fiola de 100 mL que contiene un volumen de 40 mL de agua destilada. Agitar vigorosamente la solución hasta que se disuelva por completo el soluto y enrasar con agua destilada.

#### Solución de cloruro de aluminio (10 %)

Pesar 10 g de cloruro de aluminio en un vaso de precipitado de 250 mL en la campana extractora de gases (tener cuidado) y agregar lentamente 40 mL de agua destilada. Colocar el vaso de precipitado en un baño de agua helada debido a que la reacción es altamente exotérmica. Una vez que la muestra esté fría y haya cesado la generación de vapores, trasvasar la solución a una fiola de 100 mL y enrasar con agua destilada.

#### Solución de hidróxido de sodio (1 M)

Pesar 4 g de hidróxido de sodio y agregar el contenido a una fiola de 100 mL que contiene un volumen de 40 mL de agua destilada. Agitar vigorosamente la solución hasta que se disuelva por completo el soluto y enrasar con agua destilada.

### 3.2.6. Procedimiento

#### Extracción

- Pesar 200 mg de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) en un tubo cónico de plástico para centrifuga de 15 mL.
- Agregar 5 mL de la solución de metanol (2:1) y agitar por 15 segundos en el agitador de tubos.
- Colocar los tubos con las muestras en el baño maría a 50 °C por 60 minutos. Durante este tiempo, lagitar las muestras en el agitador de tubos cada 15 minutos.
- Retirar del baño maría los tubos con las muestras y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Centrifugar los tubos con las muestras a 6 000 r.p.m., a 25 °C por 10 minutos.
- Filtrar el extracto con un filtro de membrana de 0.45  $\mu$ m en una fiola de 10 mL y enrasar con la solución de metanol (2:1).

#### Determinación

- Extraer 0.5 mL del extracto obtenido y trasvasar a un tubo de vidrio de 13 mm x 100 mm.
- Agregar 2 mL de agua destilada y 0.15 mL de solución de  $\text{NaNO}_2$  (5 %), agitar durante 15 segundos en el agitador de tubos y dejar en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 0.15 mL de solución de  $\text{AlCl}_3$  (5 %), agitar durante 15 segundos en el agitador de tubos y dejar en reposo durante 6 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 1 mL de solución de NaOH (1 N) y 1.2 mL de agua destilada y agitar durante 15 segundos en el agitador de tubos.
- Medir las absorbancias de las muestras en celdas de cuarzo a 510 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

#### Preparación de la curva estándar con catequina

- Preparar una solución stock de catequina 1 mg/mL pesando 10 mg de catequina y llevar a un volumen final de 10 mL con solución de metanol (2:1).
- Preparar una solución intermedia de 0.1 mg/mL de catequina, extraer una alícuota de 1 mL de la solución stock y llevar a un volumen final de 10 mL con solución de metanol (2:1).
- Preparar soluciones con seis diferentes niveles de concentración para la curva de calibración siendo las concentraciones seleccionadas de 2, 5, 10, 20, 40 y 60 mg/L, extraer alícuotas de 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mL de la solución intermedia y llevar a un volumen final de 5 mL con solución de metanol (2:1).
- Elaborar la curva de calibración, verificar que el rango de absorbancias se encuentre aproximadamente entre 0 y 0.2

### Cálculos

- Graficar la concentración de cada solución estándar versus valores de absorbancia
- Interpolarse en la curva de calibración el valor de la absorbancia y calcular la concentración de la muestra.
- Calcular la cantidad de flavonoides totales como mg equivalente de catequina/g de muestra (mg CE/g), utilizar la ecuación de la curva estándar ( $r^2 = 0.9998$ ,  $y = 0.0024x + 0.0001$ ).

$$\frac{\text{Flavonoides totales (mg CE/g)}}{W * 1000} = \frac{[A - b / m] * V}{W * 1000}$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra obtenida después de la reacción a 510 nm

b = Constante intercepción en eje Y de la curva de calibración

m = Pendiente de la curva de calibración

V = Volumen a diluir la muestra en la primera dilución (10 mL)

W = Peso de la muestra (g)

Ejemplo:

Muestra: Semillas de quinua

A = 0.049

V = 10 mL

W = 0.2000

m = 0.0024

b = 0.0001

$$\frac{\text{Flavonoides Totales (mg CE/g)}}{0.2000 * 1000} = \frac{[(0.049 - 0.0001 / 0.0024) * 10]}{0.2000 * 1000}$$

$$\frac{\text{Flavonoides Totales (mg CE/g)}}{0.2000 * 1000} = 1.02$$

### Observaciones

Los valores de la curva de calibración corresponden a la información presentada en el documento.

### 3.2.7. Referencias

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.

Dini, I., Tenore, G. C. y Dini, A. (2010). Antioxidant compound contents and antioxidant activity before and after cooking in sweet and bitter Chenopodium quinoa seeds. LWT - Food Science and Technology, 43(3), 447–451. doi: 10.1016/j.lwt.2009.09.010

INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.

Pękal, A. y Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. Food Analytical Methods, 7(9), 1776–1782. doi: 10.1007/s12161-014-9814-x

Santana-Gálvez, J. y Jacobo-Velazquez, D. A. (2018). Classification of Phenolic Compounds. En L. M. L. Nollet y J. A. Gutierrez (Eds.), Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis (pp. 3–20). Boca Raton: CRC Press.

## 3.3. Capacidad antioxidante según ABTS

### 3.3.1. Fundamento

Actualmente diferentes métodos se proponen para medir la capacidad antioxidante de los alimentos. Los métodos describen la habilidad de moléculas de origen natural o sintético para intervenir en procesos redox que estabilicen radicales libres (Floegel, Kim, Chung, Koo, y Chun, 2011). La cuantificación de la capacidad antioxidante con el radical ABTS ((2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) se realiza según el método colorimétrico propuesto por Re, Pellegrini, Proteggenete, Pannala, Yang, y Rice-Evans (1999), con ciertas modificaciones. Este método se basa en la formación del radical ABTS el cual se genera por oxidación con persulfato de potasio y su posterior reducción por los antioxidantes presentes en la muestra, cuya reacción genera una decoloración debido a la estabilización del radical el cual se cuantifica a 734 nm (Domínguez, Ruiz, Pacheco, Villegas y González, 2018).

### 3.3.2. Reactivos, materiales y equipos

**Reactivos:** ABTS, metanol, etanol absoluto, persulfato de potasio y Trolox. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Sigma-Aldrich®, Merck® y J.T. Baker®.

**Materiales:** espátulas de acero, vasos de precipitado, fioles, tubos de vidrio con tapa rosca, gradillas, micropipetas y puntas para micropipeta.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), molino ultracentrífugo (Restch, ZM 200), baño maría (Memmert, WNE14), agitador de tubos (Thermo Scientific M37610-33), cronómetro (Kenko, KK-5898), y espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S).

### 3.3.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

### 3.3.4. Preparación de la muestra

Preparar la muestra como se describe en el procedimiento del método “Análisis de compuestos fenólicos totales”.

### 3.3.5. Preparación de los reactivos

#### Solución de metanol (2:1)

Añadir en una probeta graduada de 500 mL, un volumen de 200 mL de metanol, luego, añadir 100 mL de agua destilada y mezclar con una bagueta.

#### Solución de ABTS

Pesar 19.2 mg de ABTS y 3.3 mg de persulfato de potasio en un frasco ámbar, agregar 10 mL de agua destilada y agitar la solución hasta disolver los solutos. Incubar en la oscuridad entre 12 a 16 horas a temperatura ambiente para que se genere el radical cromóforo ABTS. Posterior a la incubación, extraer 1 mL de la solución stock de ABTS y añadir 50 mL de etanol absoluto. Finalmente, ajustar la absorbancia de la solución diluida de ABTS a un valor de  $0.7 \pm 0.02$  a la longitud de onda de 734 nm con la adición de solvente, antes de su uso.

### 3.3.6. Procedimiento

#### Extracción

- Pesar 200 mg de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) en un tubo cónico de plástico para centrifuga de 15 mL.
- Agregar 5 mL de la solución de metanol (2:1) y agitar por 15 segundos en el agitador de tubos.

- Colocar los tubos con las muestras en el baño maría a 50 °C por 60 minutos. Durante este lapso, agitar las muestras en el agitador de tubos cada 15 minutos.
- Retirar del baño maría los tubos con las muestras y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Centrifugar los tubos con las muestras a 6 000 r.p.m., a 25 °C por 10 minutos.
- Filtrar el extracto con un filtro de membrana de 0.45 µm en una fiola de 10 mL y enrasar con la solución de metanol (2:1).

#### Determinación

- Extraer 0.3 mL del extracto obtenido y trasvasar a un tubo de vidrio de 13 mm x 100 mm.
- Adicionalmente, colocar 0.3 mL de solución de metanol:agua (2:1) en otro tubo de vidrio para corregir la absorción del solvente.
- Agregar 3 mL de la solución de ABTS a cada tubo, agitar durante 15 segundos en el agitador de tubos y dejar en reposo durante 7 minutos a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia de las muestras en celdas de cuarzo a 734 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

#### Preparación de la curva estándar con Trolox

- Preparar una solución stock de Trolox 1 mg/mL. Pesar 10 mg de trolox y llevar a un volumen final de 10 mL con solución de metanol (2:1).
- Preparar una solución intermedia de 0.2 mg/mL de Trolox. Extraer una alícuota de 2 mL de la solución stock y llevar a un volumen final de 10 mL con solución de metanol (2:1).
- Preparar soluciones con seis diferentes niveles de concentración para la curva de calibración siendo las concentraciones seleccionadas de 5, 10, 15, 20, 30 y 40 mg/L, extraer alícuotas de 0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 0.75 y 1.0 mL de la solución intermedia y enrasar a un volumen final de 5 mL con solución de metanol (2:1).
- Elaborar la curva de calibración, verificando que el rango de absorbancias sea mayor a 0.1.

#### Cálculo

- Graficar la concentración de cada solución estándar versus valores de absorbancia.
- Interpolarse en la curva de calibración el valor de la absorbancia y calcular la concentración de la muestra.
- Calcular la variación de la absorbancia debido al efecto del extracto antioxidante.

$$\Delta A = A_d - A_m$$

Donde:

$\Delta A$  = Variación de la absorbancia de la solución de ABTS después de la reacción a 734 nm

$A_d$  = Absorbancia de la solución de ABTS con el solvente a 734 nm

$A_m$  = Absorbancia de la solución ABTS después de la reacción a 734 nm

- Calcular la capacidad antioxidante como mmol equivalente de trolox/g de muestras (mmol TEAC/g), utilizar la ecuación de la curva estándar ( $r^2=0.9991$ ,  $y=0.0105x+0.0042$ ).

$$\text{Capacidad antioxidante} \left( \frac{\mu\text{mol TEAC}}{100\text{g}} \right) = \frac{[\Delta A - b/m] * V * Fd}{W * PM} * 100$$

Donde:

$\Delta A$  = Variación de la absorbancia de la solución obtenida después de la reacción a 734 nm

$b$  = Constante intercepción en eje Y de la curva de calibración

$m$  = Pendiente de la curva de calibración

$V$  = Volumen de enrase del extracto (10 mL)

$Fd$  = Factor de dilución del extracto

$W$  = Peso de la muestra (g)

$PM$  = Peso molecular del Trolox (g/mol)

Ejemplo:

Muestra: Semillas de quinua

$A_d = 0.630$

$A_m = 0.260$

$V = 10$  mL

$W = 0.2000$

$m = 0.0105$

$b = 0.0042$

$Fd = 2$

$PM = 250.29$  g/mol

$$\Delta A = 0.630 - 0.260 = 0.370$$

$$\text{Capacidad antioxidante} \left( \frac{\mu\text{mol TEAC}}{100\text{g}} \right) = \frac{[(0.370 - 0.0042 / 0.0105) * 10 * 2]}{0.2000 * 250.29} * 100$$

$$\text{Capacidad antioxidante} \left( \frac{\mu\text{mol TEAC}}{100\text{g}} \right) = 1391.91$$

#### Observaciones

Si los valores de absorbancia de la muestra son menores a 0.1 realizar la dilución del extracto antes de la reacción con la solución diluida de ABTS.

Los valores de la curva de calibración corresponden a la información presentada en el documento.

#### 3.3.7. Referencias

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.

Domínguez, J. A., Ruiz, J., Pacheco, R., Villegas, M. A. y González, G. A. (2018). Antioxidant Power. En L. M. L. Nollet y J. A. Gutierrez (Eds.), Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis (pp. 261–287). Boca Raton: CRC Press.

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I. y Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. Journal of Food Composition and Analysis, 24(7), 1043–1048. doi: 10.1016/j.jfca.2011.01.008

NACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggenete, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9), 1231–1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3

### 3.4. Capacidad antioxidante según DPPH

#### 3.4.1. Fundamento

La cuantificación de la capacidad antioxidante con el radical DPPH se realiza según el método colorimétrico propuesto por Brand-Williams, Cuvelier, y Berset (1995) con ciertas modificaciones. Este método se basa en la reducción del radical DPPH por efecto de los antioxidantes presentes en la muestra, cuya reacción genera una decoloración debido a la estabilización del radical que se cuantifica a 517 nm (Domínguez, Ruiz, Pacheco, Villegas y González, 2018).

#### 3.4.2. Reactivos, materiales y equipos

**Reactivos:** DPPH, metanol y Trolox. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Sigma-Aldrich®, Merck® y J.T. Baker®.

**Materiales:** espátulas de acero, vasos de precipitado, fioles, tubos de vidrio con tapa rosca, gradillas, micropipetas y puntas para micropipeta.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), molino ultracentrífugo (Restch, ZM 200), baño maría (Mettler, WNE14), agitador de tubos (Thermo Scientific M37610-33), cronómetro (Kenko, KK-5898) y espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S).

#### 3.4.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

#### 3.4.4. Preparación de la muestra

Preparar la muestra como se describe en el procedimiento del método "Análisis de compuestos fenólicos totales".

#### 3.4.5. Preparación de reactivos

**Solución de metanol (2:1)**

Añadir en una probeta graduada de 500 mL un volumen de 200 mL de metanol, luego, añadir 100 mL de agua destilada y mezclar con una bagueta.

**Solución de DPPH**

Pesar 13.8 mg de DPPH en un frasco ámbar y agregar 500 mL de metanol. Agitar la solución hasta disolver completamente el radical DPPH. Finalmente, ajustar la absorbancia de la solución diluida de DPPH añadiendo más solvente a un valor de  $0.7 \pm 0.02$  a 517 nm antes de su uso.

#### 3.4.6. Procedimiento

**Extracción**

- Pesar 200 mg de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) en un tubo cónico de plástico para centrifuga de 15 mL.
- Agregar 5 mL de la solución de metanol (2:1) y agitar por 15 segundos en el agitador de tubos.
- Colocar los tubos con las muestras en el baño maría a 50 °C por 60 minutos. Durante este lapso, agitar las muestras en el agitador de tubos, cada 15 minutos.
- Retirar del baño maría los tubos con las muestras y dejar enfriar a temperatura ambiente.

- Centrifugar los tubos con las muestras a 6 000 r.p.m., a 25 °C por 10 minutos.
- Filtrar el extracto con un filtro de membrana de 0.45 µm en una fiola de 10 mL y enrasar con la solución de metanol (2:1).

**Determinación**

- Extraer 0.3 mL del extracto obtenido y trasvasar a un tubo de vidrio de 13 mm x 100 mm.
- Adicionalmente, colocar 0.3 mL de solución de metanol:agua (2:1) en otro tubo de vidrio para corregir la absorción del solvente.
- Agregar 2.7 mL de la solución de DPPH a cada tubo, agitar durante 15 segundos en el agitador de tubos y dejar en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Medir las absorbancias de las muestras en celdas de cuarzo a 517 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

**Preparación de la curva estándar con Trolox**

- Preparar una solución stock de Trolox 1 mg/mL. Pesar 10 mg de Trolox y llevar a un volumen final de 10 mL con solución de metanol (2:1).
- Preparar una solución intermedia de 0.2 mg/mL de Trolox. Extraer una alícuota de 2 mL de la solución stock y llevar a un volumen final de 10 mL con solución de metanol (2:1).
- Preparar soluciones con seis diferentes niveles de concentración para la curva de calibración siendo las concentraciones seleccionadas de 5, 10, 15, 20, 30 y 40 mg/L, extraer alícuotas de 0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 0.75 y 1.0 mL de la solución intermedia y llevar a un volumen final de 5 mL con solución de metanol (2:1).
- Elaborar la curva de calibración, verificar que el rango de absorbancias sea mayor a 0.1.

**Cálculo**

- Graficar la concentración de cada solución estándar versus valores de absorbancia
- Interpolar en la curva de calibración el valor de la absorbancia y calcular la concentración de la muestra.
- Calcular la variación de la absorbancia debido al efecto del extracto antioxidante.

$$\Delta A = A_d - A_m$$

Donde:

$\Delta A$  = Variación de la absorbancia de la solución de DPPH después de la reacción a 517 nm

$A_d$  = Absorbancia inicial de la solución de DPPH con el solvente a 517 nm

$A_m$  = Absorbancia de la solución DPPH después de la reacción a 517 nm

- Calcular la capacidad antioxidante como mmol equivalente de trolox/g de muestra (mmol TEAC/g), usar la ecuación de la curva estándar ( $r^2=0.9991$ ,  $y=0.0093x+0.0028$ ).

$$\text{Capacidad antioxidante } (\mu\text{mol TEAC/g}) = \frac{[\Delta A - b/m] * V}{W * PM} * 100$$

Donde:

$\Delta A$  = Variación de la absorbancia de la solución de DPPH después de la reacción a 517 nm

$b$  = Constante del intercepto en eje Y de la curva de calibración

$m$  = Pendiente de la curva de calibración

$V$  = Volumen de enrase del extracto (10 mL)

$W$  = Peso de la muestra (g)

$PM$  = Peso molecular del trolox (g/mol)

Ejemplo:

Muestra: Semillas de quinua

$A_d = 0.638$

$A_m = 0.281$

$V = 10$  mL

$W = 0.2000$

$m = 0.0093$

$b = -0.0028$

$PM = 250.29$  g/mol

$$\Delta A = 0.638 - 0.281 = 0.357$$

$$\text{Capacidad antioxidante} \quad (\mu\text{mol TEAC/g}) = \frac{[0.357 - 0.0028 / 0.0093] * 10}{0.2000 * 250.29} * 100$$

$$\text{Capacidad antioxidante} \quad (\text{mmol TEAC/g}) = 760.84$$

#### Observaciones

Si los valores de absorbancia de la muestra son menores a 0.1 realizar la dilución del extracto antes de la reacción con la solución diluida de DPPH.

Los valores de la curva de calibración corresponden a la información presentada en el documento.

#### 3.4.7. Referencias

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.

Domínguez, J. A., Ruiz, J., Pacheco, R., Villegas, M. A. y González, G. A. (2018). Antioxidant Power. En Nolle, L y J. A. Gutierrez (Eds.), *Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis* (pp. 261–287). Boca Raton: CRC Press.

INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.

## 4. SAPONINAS EN SEMILLAS/ GRANOS DE QUINUA

### 4.1 Análisis de saponinas por el método afrosimétrico

#### 4.1.1. Fundamento

Las saponinas son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal y su denominación se relaciona con la capacidad para formar espumas estables similares al jabón en soluciones acuosas (Sparg, Light, y Van Staden, 2004). Químicamente, las saponinas son glicósidos formados por una aglicona policíclica (triterpénica o esteroidea), unidos a una cadena lateral de azúcares (Troisi et al., 2014). El método afrosimétrico constituye un método rápido y sencillo para realizar el análisis del contenido de saponinas y se basa en la propiedad de la saponina de formar espumas estables en agua (Kozioł, 1991).

#### 4.1.2. Materiales y equipos

**Materiales:** tubos de ensayo 160 mm x 16 mm con tapa rosca, probetas graduadas, regla métrica, gradillas, espátulas de acero y tamices.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), balanza de precisión (Sartorius, TE6101), tamizador vibratorio (Retsch AS 200) y cronómetro (Kenko, KK-5898).

#### 4.1.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

#### 4.1.4. Preparación de la muestra

Ventear las semillas/granos de forma manual para eliminar restos de paja, tierra y otros materiales extraños. Retirar de forma manual los granos defectuosos, tales como semillas/granos quebrados, granos recubiertos (con perigonio) y otros defectos indicados en la NTP 205.062 (INACAL, 2014).

#### 4.1.5. Procedimiento

- Pesar 25 g de semillas/granos de quinua y colocar en el tamizador vibratorio que contiene la serie de tamices N° 10, 12 y 14 ASTM.
- Tamizar la muestra durante 5 minutos con un valor de amplitud del 50 % y seleccionar las semillas/granos de quinua retenidas en el tamiz N° 12 ASTM para el análisis.
- Pesar 0.50 g de semillas/granos de quinua seleccionada (con precisión de 20 mg) en un tubo de ensayo, añadir 5 mL de agua destilada y tapar el tubo.
- Poner en marcha el cronómetro y sacudir vigorosamente el tubo durante 30 segundos.
- Dejar el tubo en reposo durante 30 minutos, luego volver a sacudir otra vez durante 30 segundos.
- Dejar el tubo en reposo durante 30 minutos adicionales, luego volver a sacudir otra vez durante 30 segundos.
- Dejar el tubo en reposo 5 minutos, medir la altura de la espuma con aproximación a 0.1 cm.

### Cálculo

Aplicar la siguiente ecuación para calcular el contenido de saponina de las semillas/granos de quinua, expresar en porcentaje.

$$\text{Saponina (\%)} = \frac{(0.64 * h) - 0.104}{W * 10}$$

Donde:

$h$  = Altura de la espuma (cm)

$W$  = Peso de la muestra (g)

Ejemplo:

Muestra: Semillas de quinua

$h$  = 2.8 cm

$W$  = 0.5014 g

$$\text{Saponina (\%)} = \frac{(0.64 * 2.8) - 0.104}{0.5014 * 10}$$

$$\text{Saponina (\%)} = 0.34$$

### 4.1.6. Referencias

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.

INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.

Koziol, M. J. (1991). Afrosimetric estimation of threshold saponin concentration for bitterness in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(2), 211–219. doi: 10.1002/jsfa.2740540206

Sparg, S. G., Light, M. E. y Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2), 219–243. doi: 10.1016/j.jep.2004.05.016

Troisi, J., Di Fiore, R., Pulvento, C., D'Andria, R., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., ... Lavini, A. (2014). Saponinas. En D. Bazile, D. Bertero, y C. Nieto (Eds.), *Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013* (pp. 317–330). Montpellier: FAO-CIRAD.

## 4.2. Análisis de saponinas por el método espectrofotométrico UV- Vis

### 4.2.1. Fundamento

La detección y cuantificación de saponinas totales de semillas y granos de quinua se realizan según el método colorimétrico de vainillina – ácido sulfúrico propuesto por Hiai, Oura, Hamanaka y Odaka (1975) para saponinas de núcleo esteroideal. Las saponinas reaccionan con vainillina en medio ácido sulfúrico y generan una coloración entre rojo oscuro – púrpura y pardo (este último por la reacción del ácido sulfúrico con los azúcares del extracto) que se cuantifican a 531 nm.

### 4.2.2. Reactivos, materiales y equipos

**Reactivos:** ácido oleanólico, etanol absoluto, ácido sulfúrico y vainillina. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Sigma-Aldrich® y J.T. Baker®.

**Materiales:** espátulas de acero, tubos cónicos para centrifuga, gradillas, micropipetas, puntas para micropipeta y probetas graduadas.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), baño de ultrasonido (Branson, 3510), baño maría (Memmert, WNE14), centrifuga (Eppendorf, 5430R), molino ultracentrífugo (Retsch, ZM 200), agitador de tubos (Thermo Scientific, M37610-33) y espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys10S).

### 4.2.3. Muestreo

Extraer muestras representativas del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

### 4.2.4. Preparación de la muestra

Ventear las semillas/granos de forma manual para eliminar restos de paja, tierra y otros materiales extraños y luego retirar manualmente los granos defectuosos indicados en la NTP 205.062 (INACAL, 2014). Finalmente, moler las semillas en un molino ultracentrífugo a la velocidad de 18 000 r.p.m., hasta tamaños de partícula menores a 0.5 mm de diámetro.

### 4.2.5. Preparación de reactivos

*Solución etanólica (90 %)*

Añadir en una fiola de 500 mL un volumen de 50 mL de agua y enrasar al volumen con etanol absoluto.

*Solución de vainillina (8 %)*

Pesar 800 mg de vainillina y disolver en una fiola de 10 mL con etanol absoluto. Proteger la solución de la luz y utilizar el día que se prepara.

*Solución de ácido sulfúrico etanólico (70 %)*

Medir 30 mL de etanol absoluto en un vaso precipitado, colocar el vaso en baño de hielo, agregar lentamente por las paredes del recipiente 70 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitando suavemente.

### 4.2.6. Procedimiento

- Pesar 100 mg de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) en una fiola de 5 mL.
- Enrasar a 5 mL con solución etanólica de 90 % y agitar por 15 segundos en el agitador.
- Colocar las fiolas con muestra en el baño de ultrasonido por 60 minutos a 40 °C. Durante ese lapso, agitar las muestras cada 20 minutos, al término, trasvasar el extracto a tubos de centrifuga.

- Centrifugar los tubos con las muestras a 6 000 r.p.m., a 25 °C por 10 minutos.
- Extraer 0.15 mL de extracto obtenido y trasvasar a un tubo de ensayo.
- Agregar 0.15 mL de vainillina (8 %) y 1.50 mL de ácido sulfúrico (70 %) y agitar en el vórtex.
- Colocar los tubos con los extractos en el baño maría a 60 °C por 10 minutos.
- Retirar los tubos del baño maría y colocarlos en un recipiente con agua a temperatura ambiente para enfriar.
- Con cuidado, colocar las muestras en las celdas de cuarzo y leer la absorbancia a 531 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

#### Preparación de la curva estándar con ácido oleanólico

- Preparar una solución stock de 1 mg/mL de ácido oleanólico. Pesar 5 mg de ácido oleanólico y disolver en 5 mL de solución etanólica (90 %).
- Preparar soluciones con seis diferentes niveles de concentración para la curva de calibración, siendo las concentraciones seleccionadas 50, 100, 150, 200, 300, 350, 400 y 500 mg/L, extraer alícuotas de 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.35, 0.40 y 0.50 mL de la solución stock y se enrazan a un volumen final de 1 mL con solución etanólica (90 %).
- Elaborar la curva de calibración y verificar que el rango de absorbancias se encuentren aproximadamente entre 0.072 y 0.740.

#### Cálculos

- Graficar la concentración de cada solución estándar versus valores de absorbancia
- Interpolar en la curva de calibración, el valor de la absorbancia y calcular la concentración de la muestra.
- Calcular la cantidad de saponinas como ácido oleanólico expresado como mg equivalentes de ácido oleanólico/g de muestra (mg AOE/g), usar la ecuación de la curva estándar ( $r^2=0.999$ ,  $y=0.0015x+0.0117$ ).

$$\text{Saponinas (mg AOE/100g)} = \frac{([A - b/m] * V)}{W * 1000}$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra obtenida después de la reacción a 531 nm  
 b = Constante intercepción en eje Y de la curva de calibración  
 m = Pendiente de la curva de calibración  
 V = Volumen a diluir la muestra (5 mL)  
 W = Peso de la muestra (g)

Ejemplo:

Muestra: Semillas de quinua  
 A = 0.714  
 V = 5 mL  
 W = 0.1006 g  
 m = 0.0015  
 b = -0.0117

$$\begin{aligned} \text{Saponinas} &= \frac{([0.714 + 0.0117/0.0015] * 5)}{0.1006 * 1000} \\ \text{Totales (mg AOE/g)} &= 24.05 \end{aligned}$$

#### Observaciones

Obtener absorbancias de las muestras dentro del rango de linealidad del método espectrofotométrico, requiriendo en algunos casos realizar una nueva dilución, considerar en la fórmula del cálculo del contenido de saponinas totales.

Los valores de la curva de calibración corresponden a la información presentada en el documento.

#### 4.2.7. Referencias

- CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.
- Hiai, S., Oura, H., Hamanaka, H. y Odaka, Y. (1975). A color reaction of panaxadiol with vainillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 28(6), 131–138. doi: 10.1055/s-0028-1097841
- INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.

### 4.3. Análisis de saponinas según el método de cromatografía de capa delgada (TLC)

#### 4.3.1. Fundamento

La cromatografía en capa delgada (TLC) es una técnica cualitativa utilizada en la identificación de metabolitos primarios y secundarios a través de reacciones específicas sobre determinados grupos químicos de la molécula de interés. El método revela la presencia de estos metabolitos a través de reacciones con vainilla en medio ácido sulfúrico. El procedimiento de extracción se realiza según Chen, Liang, Liu, Wei, Tan, y Zhu (2017), la resolución de los componentes en los extractos se realiza según sistemas propuestos en Wagner, Bauer, Melchart, Xiao, y Staudinger (2011), para estos metabolitos, y su revelado según Hiai, Hamanaka y Odaka (1975).

#### 4.3.2. Reactivos, materiales y equipos

**Reactivos:** cloroformo, ácido acético glacial, acetato de etilo, ácido oleanólico, etanol absoluto, ácido sulfúrico, vainillina y metanol. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Sigma-Aldrich® y J.T. Baker®.

**Materiales:** espátulas de acero, tubos de ensayo, fiolas, tubos cónicos para centrífuga, pipetas graduadas, microtubos con tapa, vasos de precipitado, probetas, baguetas, micropipetas, cámara cromatográfica y hojas de aluminio TLC Sílica gel.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), estufa (Memmert, UF 160), centrífuga (Eppendorf, 5430 R), baño de ultrasonido (Branson, 3510), agitador de tubos (Thermo Scientific, M37610-33), baño maría (Memmert, WNB 14) y rotavapor (Büchi, R11).

#### 4.3.3. Muestreo

Extraer muestras representativas del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

#### 4.3.4. Preparación de la muestra

Ventear las semillas/granos de forma manual para eliminar restos de paja, tierra y otros materiales extraños y luego retirar de forma manual los granos defectuosos indicados en la NTP 205.062 (INACAL, 2014). Finalmente, moler las semillas en molino ultracentrífugo a velocidad de 18 000 r.p.m., hasta tamaños de partícula menor de 0.5 mm de diámetro.

#### 4.3.5. Preparación de los reactivos

##### *Solución etanólica (90 %)*

Añadir en una fiola de 500 mL, un volumen de 50 mL de agua y enrasar al volumen con etanol absoluto.

##### *Solución de ácido sulfúrico etanólico (5 %)*

Para obtener 100 mL de solución de ácido sulfúrico etanólico (5 %), medir 95 mL de etanol absoluto y agregar lentamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitar suavemente hasta homogenizar la mezcla.

##### *Sistema de solvente N° 1: Cloroformo - Ácido acético - Metanol - Agua destilada (64: 32: 12: 8)*

Preparar 23.3 mL del sistema de solvente N° 1, para lo cual, mezclar 1.6 mL de agua destilada con 2.4 mL de metanol y luego, agregar lentamente 6.4 mL de ácido acético glacial. Luego de mezclar completamente los solventes polares, agregar lentamente 12.8 mL de cloroformo y agitar hasta obtener una solución sin presencia de burbujas o dos fases inmiscibles.

##### *Sistema de solvente N° 2: Cloroformo - Acetato de etilo - Metanol (4: 3: 0.4)*

Preparar 22.2 mL del sistema de solvente N° 2, para lo cual, mezclar 1.2 mL de metanol con 9.0 mL de acetato de etilo y agregar lentamente 12.0 mL de cloroformo, agitar la mezcla hasta obtener una solución sin la presencia de burbujas o dos fases inmiscibles.

##### *Solución reveladora de vainillina (1 %)*

Pesar 100 mg de vainillina y disolver en 10 mL de metanol. Proteger de la luz y usar el día que se prepara.

#### 4.3.6. Procedimiento

- Pesar 0.1 g de muestra en un tubo de plástico de 15 mL y agregar 5 mL de solución etanólica (90 %).
- Colocar las muestras en baño de ultrasonido por 60 minutos a la temperatura de 40 °C.
- Agitar las muestras con un vortex cada 20 minutos.
- Luego del tiempo de extracción, centrifugar por 10 minutos a 7 800 r.p.m.
- Analizar el extracto obtenido directamente si se desea analizar saponinas glicosiladas, o proceder por un paso adicional de hidrólisis ácida para el análisis de saponinas.
- Para hidrolizar los extractos de saponinas glicosiladas, trasvasar 1.5 mL de extracto y agregar 1.0 mL de ácido sulfúrico etanólico (5 %).
- Llevar la mezcla a baño maría a 70 °C por 2 horas.
- Evaporar a sequedad el extracto hidrolizado empleando un rotavapor a 60 °C por 10 minutos a una presión de 80 mbar.
- Reconstituir con 0.5 mL de cloroformo.

##### **Preparación estándar de ácido oleanólico (0.01 mg/mL)**

- Preparar una solución stock de 0.1 mg/mL. Para ello, pesar 1 mg de ácido oleanólico en un tubo de vidrio de 15 mL y agregar 10 mL de cloroformo.
- Trasvasar 0.5 mL de solución stock y agregar 4.5 mL de cloroformo. Rotular y proteger de la luz.

##### **Desarrollo de cromatografía en capa delgada**

- Acondicionar la cámara cromatográfica colocando suficiente solvente como para alcanzar una altura de 0.5 cm desde la base de la cámara y dejar reposar por 30 minutos.
- Introducir la placa cromatográfica sin sembrar y esperar a que el frente de solvente ascienda hasta el extremo superior.
- Retirar la placa y secarla con ayuda de una secadora de cabello.
- Acondicionar la cámara cromatográfica y la placa cromatográfica, luego, proseguir con el sembrado de muestras.
- Empleando un capilar de vidrio de 10 µL, sembrar las muestras en puntos marcados a una distancia de 1 cm desde el extremo inferior de la placa cromatográfica. Sembrar al menos un blanco y dos estándares (al inicio y al final de la placa).

- Luego de sembrar y secar la placa, introducirla dentro de la cámara cromatográfica y permitir el avance del frente de solvente hasta 1 cm antes de llegar al extremo superior de la placa.
- Retirar la placa con cuidado, empleando pinzas para evitar deteriorar la sílica. Secar completamente con ayuda de la secadora de cabello.
- Observar la exposición de la placa a luz ultravioleta de 254 nm y 365 nm en una cámara oscura para identificar posibles manchas a nivel del estándar.
- Aplicar, con ayuda de un aspersor, la solución reveladora de vainillina (1 %) en toda la placa. Luego, aplicar ácido sulfúrico etanólico (5 %) y secar la placa con ayuda de la secadora de cabello.
- Colocar la placa cromatográfica en una plancha de calentamiento a 105 °C por aproximadamente 5 minutos. Anotar las observaciones.

#### Cálculo

- El factor de retardo (RF) es el cociente entre la distancia recorrida por el centro de la mancha y la distancia recorrida simultáneamente por la fase móvil. La presencia de un RF en la muestra similar al RF del estándar, indica la posible presencia del compuesto analizado.

$$RF = \frac{(a) \text{ distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación}}{(b) \text{ distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente}}$$

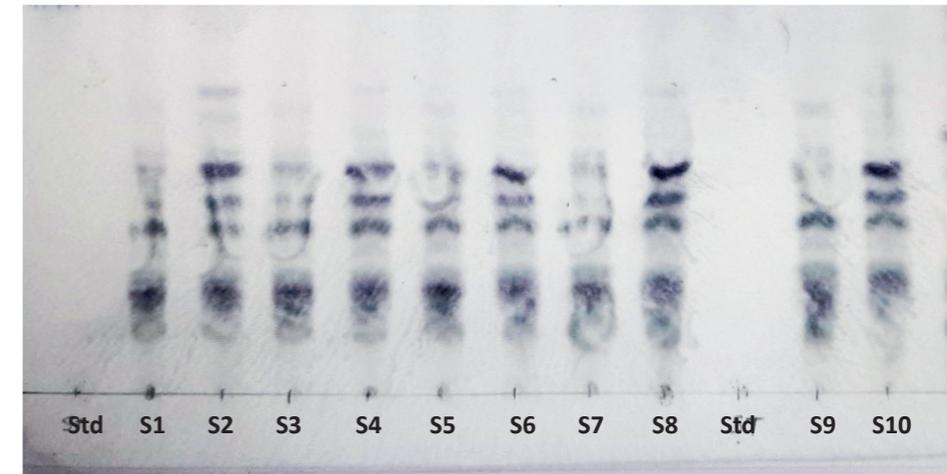
- La técnica de cromatografía en capa delgada es una técnica cualitativa utilizada en la identificación presuntiva de grupos químicos.

#### 4.3.7. Referencias

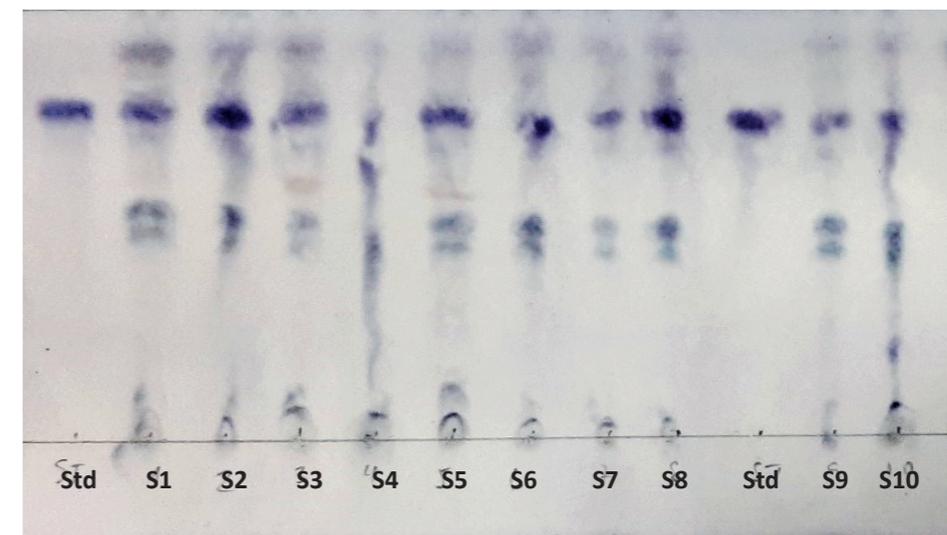
- Chen, X., Liang, L. S., Liu, Q. Z., Wei, H. R., Tan, Y. y Zhu, D. Z. (2017). Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruit. *Acta Horticulturae*, 1180, 71–76. doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1180.10
- CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.
- Hiai, S., Oura, H., Hamanaka, H. y Odaka, Y. (1975). A color reaction for panaxadiol with vainillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 28(6), 131–138. doi: 10.1055/s-0028-1097841
- INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.
- Wagner, H., Bauer, R., Melchart, D., Xiao, P.-G. y Staudinger, A. (2011). Chromatographic fingerprint analysis of herbal medicines. doi: 10.1007/978-3-7091-0763-8.

#### Anexo

**Anexo 5.** Cromatogramas de capa delgada de saponinas de quinua revelados con vainillina – ácido sulfúrico.



Cromatografía en capa delgada de extractos etanólicos no hidrolizados de semillas de quinua (S1-S10) y ácido oleanólico (Std) según sistema cloroformo-ácido acético-metanol-agua (64:32:12:8).



Cromatografía en capa delgada de extractos etanólicos hidrolizados de semillas de quinua (S1-S10) y ácido oleanólico (Std) según sistema cloroformo-acetato de etilo-metanol (4:3:0.4).

## 5. ALMIDÓN DE QUINUA

### 5.1. Extracción del almidón

#### 5.1.1. Fundamento

El almidón es la molécula de reserva predominante en las plantas, y representa entre los 70 % y 80 % de las calorías consumidas por la humanidad, constituyéndose como el principal carbohidrato digerible en la dieta humana (BeMiller y Huber, 2017). En las semillas de quinua, el almidón constituye el mayor componente, representando aproximadamente del 53.5 % al 69.2 % del contenido de materia seca (Repo-Carrasco y Valdez, 2017) y para su extracción se propone el método propuesto por Jan, Panesar, y Singh (2017) que consiste en macerar las semillas molidas en una solución alcalina diluida seguido de una etapa de neutralización con una solución de ácido diluido y lavados sucesivos con agua destilada para purificar el almidón de otros componentes.

#### 5.1.2. Reactivos, materiales y equipos

**Reactivos:** ácido clorhídrico e hidróxido de sodio. Todos los reactivos son de grado analítico de las marcas Merck® y J.T. Baker®.

**Materiales:** fiolas, espátulas de acero, probetas graduadas, pipetas graduadas, tubos cónicos para centrifuga, mortero de porcelana, magnetos, baguetas y tamices.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), balanza de precisión (Sartorius, TE6101), agitador magnético (Velp, MST), potenciómetro (Schott, Lab 850), centrifuga (Eppendorf, 5810R), molino ultracentrífugo (Restch, ZM 200) y estufa (Mettler, UF500).

#### 5.1.3. Muestreo

Extraer muestras representativas del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

#### 5.1.4. Preparación de la muestra

Ventear las semillas de quinua de manera manual para eliminar los restos de paja, tierra y otros materiales extraños y luego se retiran manualmente los granos defectuosos indicados en la NTP 205.062 (INACAL, 2014). Finalmente, moler las semillas en molino ultracentrífugo a velocidad de 18 000 r.p.m., hasta tamaños de partícula menor de 0.5 mm de diámetro.

#### 5.1.5. Preparación de los reactivos

*Solución de hidróxido de sodio (0.25 %) (p/v)*

Pesar 5.0 g de hidróxido de sodio, agregar el contenido a una fiola de 2 000 mL, que contiene un volumen de 800 mL de agua destilada, agitar vigorosamente hasta que se disuelva el soluto y esperar a que se enfríe la mezcla. Finalmente, enrasar al volumen a 2 000 mL.

*Solución de ácido clorhídrico (0.1 N)*

Medir 0.4 mL de HCl concentrado con una pipeta graduada y con la ayuda de una bombilla succionar el ácido, agregar el volumen a una fiola de 100 mL que contiene un volumen de 50 mL de agua destilada, agitar y enrasar al volumen de 100 mL para preparar HCl (0.1 N).

#### 5.1.6. Procedimiento

- Pesar 100 g de muestra molida (con precisión de 0.1 g) y transferir la muestra a un recipiente plástico de 4 L.
- Agregar 600 mL de NaOH (0.25 %), mezclar con ayuda de una bagueta y agitar a 1 000 r.p.m. por 30 minutos en el agitador magnético, para dispersar la muestra.
- Dejar en reposo la muestra por 24 horas a 4 °C.
- Tamizar la mezcla en los tamices N° 100, 270 y 325 mesh, enjuagar con agua destilada los residuos retenidos en los tamices y recuperar el filtrado.
- Centrifugar el filtrado del tamizado a 4 000 r.p.m. por 15 minutos a 10 °C, descartar el sobrenadante y retirar cuidadosamente la capa amarilla formada en la parte superior del sedimento con ayuda de una espátula.
- Dispersar el material sedimentado en 500 mL de agua destilada y neutralizar con HCl (0.1 N), hasta obtener un pH de 7.0
- Centrifugar la suspensión de almidón a 4 000 r.p.m. por 15 minutos a 10 °C, descartar el sobrenadante y dispersar el material sedimentado nuevamente en 500 mL de agua destilada. Repetir esta misma operación cuatro veces más.
- Secar el sedimento obtenido a 38 °C por 24 horas.

#### 5.1.7. Referencias

- BeMiller, J. N. y Huber, K. C. (2017). Carbohydrates. En S. Damodaran, K. L. Parkin, y O. R. Fennema (Eds.), *Fennema's Food Chemistry* (4th ed., pp. 83–154). Boca Raton: CRC Press.
- CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.
- INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.
- Jan, K. N., Panesar, P. S. y Singh, S. (2017). Process standardization for isolation of quinoa starch and its characterization in comparison with other starches. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(4), 1919–1927. doi: 10.1007/s11694-017-9574-6
- Repo-Carrasco, R. y Valdez, J. (2017). Carbohydrates of kernels. En C. M. Haros y R. Schoenlechner (Eds.), *Pseudocereals: Chemistry and Technology* (1st ed., pp. 49–70). Oxford, UK: John Wiley & Sons Ltd.

## 5.2. Análisis del contenido de amilosa

### 5.2.1. Fundamento

En la naturaleza, el almidón contenido en las diferentes fuentes vegetales y tejidos se encuentra constituido principalmente por los polímeros amilosa y amilopectina. La proporción de amilosa/amilopectina en los gránulos de almidón, así como su estructura molecular, determinan los principales parámetros de calidad, textura y estabilidad (Schirmer, Höchstötter, Jekle, Arendt, y Becker, 2013). Para el caso del almidón de quinua se reportan contenidos de amilosa en el rango de 0.3 % a 27.7 % (Li y Zhu, 2018), y su determinación se realiza según el método colorimétrico (Hoover y Ratnayake, 2001) que se fundamenta en la formación del complejo amilosa-yodo de color azul, cuya absorbancia se relaciona directamente con el contenido de amilosa en la muestra.

### 5.2.2. Reactivos, materiales y equipos

**Reactivos:** dimetilsulfóxido, yodo resublimado, yoduro de potasio, amilosa y amilopectina de almidón de papa. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Sigma-Aldrich®, Merck® y J.T. Baker®.

**Materiales:** tubos semiesféricos para centrifuga, espátulas de acero, fioles, pipetas graduadas, probetas graduadas, gradillas, micropipetas, puntas para micropipeta, mortero con pilón de porcelana y alcoholímetro.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), agitador de tubos (Thermo Scientific, M37610), baño maría (Mettler, WNE 14), centrífuga (Eppendorf, 5430 R) y espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific, Genesys 10S)

### 5.2.3. Muestreo

Extraer muestras representativas del lote a evaluar de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin la presencia de daño físico o biológico.

### 5.2.4. Preparación de la muestra

Moler las muestras con la ayuda de un mortero, hasta tamaños de partícula menores de 0.5 mm de diámetro.

### 5.2.5. Preparación de los reactivos

**Solución de dimetilsulfóxido (90 %)**

En una probeta de 500 mL, añadir 450 mL de dimetilsulfóxido y luego 50 mL, de agua destilada, proceder a mezclar con la ayuda de una bagueta.

**Solución de yodo: (0.0025 M I<sub>2</sub>)/ (0.0065 M KI)**

Para una solución de 100 ml, disolver 0.1079 g de yoduro de potasio en 1 ml de agua destilada en una fiola de 100 ml. Añadir 0.0315 g de yodo, agitar hasta que todo el yodo se disuelva en la solución de yoduro de potasio. Ajustar el volumen a 100 mL y almacenar en una botella oscura.

### 5.2.6. Procedimiento

- Pesar 20 mg de almidón (con precisión de 0.1) en un tubo para centrifuga.
- Añadir 8 mL de dimetilsulfóxido (90 %) y agitar con vortex vigorosamente durante 2 minutos.
- Colocar el tubo en baño maría a temperatura de 85 °C durante 15 minutos, realizar agitaciones en el vortex cada 5 minutos.

- Retirar el tubo del baño maría, dejar enfriar por 30 minutos a temperatura ambiente y verificar la presencia de un gel transparente, en caso contrario, volver a repetir el ensayo.
- Trasvasar la solución dispersa del almidón a una fiola de 25 mL y enrasar con agua destilada.
- Medir 1 mL de la solución diluida y colocar en una fiola de 50 mL, añadir 5 mL de la solución de yodo y proceder a enrasar con agua destilada. Dejar en reposo durante 15 minutos.
- Medir la absorbancia a 600 nm contra un blanco (el blanco contiene todos los reactivos en las cantidades indicadas anteriormente, pero no se agrega muestra).

### Preparación de la curva estándar

- Preparar soluciones estándar de amilosa de 0 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % y 50 % en tubos de centrifuga con los estándares de amilosa y amilopectina de papa de acuerdo a lo indicado en la tabla 3.

Tabla 3  
Pesos de las mezclas de amilosa-amilopectina para construir la curva de calibración

Contenido de amilosa (%)	Amilosa (mg)	Amilopectina (mg)
0	0	20
10	2	18
20	4	16
30	6	14
40	8	12
50	10	10

- Elaborar la curva de calibración, graficar los valores de absorbancia versus el porcentaje de amilosa de las soluciones estándar.

### Cálculo

- Graficar la concentración de amilosa de cada solución estándar versus valores de absorbancia.
- Interpolación en la curva de calibración el valor de la absorbancia y calcular la concentración de la muestra.
- Calcular el porcentaje de amilosa de las muestras. Usar la ecuación de la curva estándar ( $r^2=0.999$ ,  $y=0.003x + 0.0661$ ).

$$\text{Amilosa (\%)} = \frac{(A - b)}{m}$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra obtenida después de la reacción a 600 nm  
 b = Constante intercepto del eje Y de la curva de calibración  
 m = Pendiente de la curva de calibración

Ejemplo:

Muestra: Almidón de quinua

$A = 0.098$

$m = 0.003$

$b = 0.0661$

$$\text{Amilosa (\%)} = \frac{(0.098 + 0.0661)}{0.003}$$

$$\text{Amilosa (\%)} = 10.63$$

#### Observaciones

Los valores de la curva de calibración corresponden a la información presentada en el documento.

#### 5.2.7. Referencias

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.

Hoover, R. y Ratnayake, W. S. (2001). Determination of total amylose content of starch. En R. E. Wrolstad (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (pp. 1–5). New York, USA: John Wiley & Sons Inc.

Li, G. y Zhu, F. (2018). Quinoa starch: structure, properties, and applications. *Carbohydrate Polymers*, 181, 851–861. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.11.067

Schirmer, M., Höchstötter, A., Jekle, M., Arendt, E. y Becker, T. (2013). Physicochemical and morphological characterization of different starches with variable amylose/amylopectin ratio. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 52–63. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.11.032

### 5.3. Análisis de solubilidad y poder de hinchamiento

#### 5.3.1. Fundamento

El fenómeno de hinchamiento y posterior solubilización de la amilosa y amilopectina, se encuentran entre los cambios estructurales más importantes durante y después de la gelatinización de los gránulos de almidón (Ahmed, Tiwari, Imam, y Rao, 2012). Cuando el almidón se calienta en exceso de agua, la estructura cristalina se altera, provocando un aumento del volumen de los gránulos y la exudación de las macromoléculas (Hoover, 2001). El poder de hinchamiento (SP, por sus siglas en inglés), que es la cantidad de agua que un almidón puede absorber por gramo de almidón a una temperatura determinada, y el índice de la solubilidad (WSI, por sus siglas en inglés), que representan los sólidos lixiviados a una temperatura determinada, se determinaron de acuerdo a la metodología propuesta por Li, Wang, y Zhu (2016) con ciertas modificaciones.

#### 5.3.2. Materiales y equipos

*Materiales:* espátulas y pinzas de acero, tubos con fondo semiesférico para centrifuga, placas de acero inoxidable, pipetas graduadas, campana desecadora y gel de sílice.

*Equipos:* balanza analítica (AND, HR-250AZ), agitador de tubos (Thermo Scientific, M37610), baño maría (Mettler, WNE 14), estufa (Mettler, UFE 500) y centrifuga (Eppendorf, 5430 R).

#### 5.3.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

#### 5.3.4. Preparación de la muestra

Moler las muestras de almidón en un mortero, hasta tamaños de partícula menores de 0.5 mm de diámetro.

#### 5.3.5. Procedimiento

- Pesar 75 mg de almidón en base seca (con precisión de 0.1 mg en base seca) en cinco tubos de fondo semiesférico para centrifuga de 10 mL.
- Añadir 7.5 mL de agua destilada a cada tubo y agitar en el vortex durante 1 minuto.
- Calentar la solución de almidón en baño maría durante 30 minutos, realizar agitaciones en el vortex cada 5 minutos. Colocar uno de los tubos a 55 °C, otro tubo a 65 °C, otro tubo a 75 °C, otro tubo a 85 °C y el último tubo a 95 °C.
- Retirar los tubos del baño maría y dejar enfriar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 3 000 r.p.m. durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar el sobrenadante en recipientes de acero que han sido previamente secos a 98 °C - 100 °C y pesados con precisión de 0.1 mg.
- Colocar los recipientes en la estufa a 100 °C por 5 horas hasta peso constante, dejar enfriar a temperatura ambiente en la campana desecadora y registrar el peso.
- Retirar cuidadosamente el exceso de agua del tubo con ayuda de papel toalla y registrar el peso del tubo más el sedimento obtenido luego del proceso de centrifugado.

**Cálculo**

- Reportar el índice de solubilidad del almidón como el porcentaje de sólidos presentes en el sobrenadante luego de calentar el almidón en exceso de agua a la temperatura específica.

$$\text{Índice de solubilidad (\%)} = \frac{(\text{Peso residuo seco} - \text{Peso recipiente})}{W} * 100$$

Donde:

Peso residuo seco = Peso del recipiente + sobrenadante seco (g)

Peso recipiente = Peso del recipiente vacío (g)

W = Peso de almidón (en base seca) (g)

- Reportar el poder de hinchamiento del almidón como la capacidad de hidratación luego del calentamiento del almidón en exceso de agua a una temperatura específica.

$$\text{Poder de hinchamiento (g/g)} = \frac{(\text{Peso sedimento} - \text{Peso tubo})}{W * (100 - S)} * 100$$

Donde:

Peso sedimento = Peso del sedimento + tubo (g)

Peso tubo = Peso del tubo vacío (g)

W = Peso del almidón (en base seca) (g)

S = Índice de solubilidad del almidón

Ejemplo:

Muestra: almidón de quinua

Resultados	Temperatura				
	55 °C	65 °C	75 °C	85 °C	95 °C
W (g)	0.0752	0.0751	0.0751	0.0751	0.0751
Peso residuo seco (g)	33.0022	32.7437	29.0372	33.7737	32.9708
Peso recipiente (g)	33.0007	32.7420	29.0342	33.7703	32.9665
Peso sedimento (g)	5.1280	5.6631	6.1550	6.5097	6.5095
Peso tubo (g)	4.9422	4.8005	4.8845	4.9422	4.8007

Cálculo del Índice de solubilidad:

$$\text{Índice de solubilidad a 55 °C (\%)} = \frac{(33.0022 - 33.0007)}{0.0752} * 100 = 1.99$$

$$\text{Índice de solubilidad a 65 °C (\%)} = \frac{(32.7437 - 32.7420)}{0.0751} * 100 = 2.26$$

$$\text{Índice de solubilidad a 75 °C (\%)} = \frac{(29.0372 - 29.0342)}{0.0751} * 100 = 3.99$$

$$\text{Índice de solubilidad a 85 °C (\%)} = \frac{(33.7737 - 33.7703)}{0.0751} * 100 = 4.53$$

$$\text{Índice de solubilidad a 95 °C (\%)} = \frac{(32.9708 - 32.9665)}{0.0751} * 100 = 5.73$$

Cálculo del Poder de hinchamiento:

$$\text{Poder de hinchamiento (g/g) a 55 °C} = \frac{(5.1280 - 4.9422)}{0.0752 * (100 - 1.99)} * 100 = 2.52$$

$$\text{Poder de hinchamiento (g/g) a 65 °C} = \frac{(5.6631 - 4.8005)}{0.0751 * (100 - 2.26)} * 100 = 11.75$$

$$\text{Poder de hinchamiento (g/g) a 75 °C} = \frac{(6.1550 - 4.8845)}{0.0751 * (100 - 3.99)} * 100 = 17.61$$

$$\text{Poder de hinchamiento (g/g) a 85 °C} = \frac{(6.5097 - 4.9422)}{0.0751 * (100 - 4.53)} * 100 = 21.88$$

$$\text{Poder de hinchamiento (g/g) a 95 °C} = \frac{(6.5095 - 4.8007)}{0.0751 * (100 - 5.73)} * 100 = 24.14$$

**Observaciones**

Realizar el cálculo del peso del almidón en base seca. Realizar la corrección del peso del muestra tomando en cuenta el contenido de humedad de la muestra.

**5.3.6. Referencias**

Ahmed, J., Tiwari, B. K., Imam, S. H. y Rao, M. A. (2012). Starch-based polymeric materials and nanocomposites: Chemistry, processing, and applications. Boca Raton: CRC Press.

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.

Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. Carbohydrate Polymers, 45(3), 253–267. doi: 10.1016/S0144-8617(00)00260-5

Li, G., Wang, S. y Zhu, F. (2016). Physicochemical properties of quinoa starch. Carbohydrate Polymers, 137, 328–338. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.10.064

## 5.4. Análisis de las propiedades de pasta

### 5.4.1. Fundamento

La mayor parte de los almidones consumidos en el mercado se someten a algún tipo de procesamiento, que generalmente implica el calentamiento en presencia de humedad bajo cizallamiento y luego enfriamiento. Por lo tanto, comprender los fenómenos que ocurren durante la gelatinización y retrogradación de un almidón en particular, permite conocer y predecir las propiedades funcionales del almidón procesado (Copeland, Blazek, Salman, y Tang, 2009). El analizador rápido de viscosidad (RVA) es el equipo utilizado que evaluar las propiedades de pasta de los almidones (Ahmed, Tiwari, Imam, y Rao, 2012). El RVA es un viscosímetro rotacional que mide la viscosidad en continuo de una muestra bajo condiciones controladas de temperatura y velocidad de rotación, produciendo como resultado una curva típica en función de los cambios de viscosidad, producto del calentamiento y del enfriamiento del almidón.

### 5.4.2. Materiales y equipos

**Materiales:** espátulas y pinzas de acero, placas de acero inoxidable, pipetas graduadas, campana desecadora, gel de sílice, canastilla de prueba y paleta agitadora.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), estufa (Memmert, UFE 500) y analizador rápido de viscosidad (Perten Instruments, 4500).

### 5.4.3. Muestreo

Extraer muestras representativas del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

### 5.4.4. Preparación de la muestra

Moler el almidón en un mortero, hasta tamaños de partícula menores de 0.5 mm de diámetro.

### 5.4.5. Procedimiento

- Calcular el contenido de humedad de la muestra según el método “Análisis del contenido de humedad y materia seca”.
- Pesar la cantidad de muestra en la canastilla de prueba, de acuerdo a su contenido de humedad, tal como se describe en la tabla 4.
- Añadir la cantidad de agua destilada, de acuerdo al contenido de humedad de la muestra, como se describe en la tabla 4. Disolver el almidón con ayuda de la paleta giratoria hasta formar una suspensión homogénea, sin presencia de grumos.
- Encender el equipo RVA y seleccionar el método de procesamiento STD1 Pasting Profile (AACC Method 76-21.01, ICC Standard No. 162) desde el software TWC. Los parámetros de temperatura, velocidad de agitación y tiempo del método STD1 se presentan en la tabla 4.

Tabla 4

Peso de muestra y cantidad de agua para realizar la corrección de la humedad final (14 %)

Contenido de humedad (%)	Peso de muestra (14 % bs) (g)	Volumen de agua añadida (mL)	Contenido de humedad (%)	Peso de muestra (14 % bs) (g)	Volumen de agua añadida (mL)
9.0	2.84	25.2	11.0	2.90	25.1
9.2	2.84	25.2	11.2	2.91	25.1
9.4	2.85	25.2	11.4	2.91	25.1
9.6	2.85	25.1	11.6	2.92	25.1
9.8	2.86	25.1	11.8	2.93	25.1
10.0	2.87	25.1	12.0	2.93	25.1
10.2	2.87	25.1	12.2	2.94	25.1
10.4	2.88	25.1	12.4	2.95	25.1
10.6	2.89	25.1	12.6	2.95	25.0
10.8	2.89	25.1	12.8	2.96	25.0

- Colocar la canastilla y la paleta agitadora en el acoplamiento del motor del equipo.
- Iniciar la corrida de la muestra en donde la viscosidad de la mezcla se representa en un gráfico visible en tiempo real a través del monitor del PC conectado al equipo.
- Una vez concluida la corrida, visualizar el informe del análisis en la pantalla de la PC (Tabla 5)

Tabla 5

Parámetros de temperatura, velocidad de agitación y tiempo de análisis del método STD1 Pasting Profile

Etapa	Parámetro	Valor	Tiempo de análisis
1	Temperatura	50 °C	00:00:00
2	Velocidad	960 r.p.m.	00:00:00
3	Velocidad	160 r.p.m.	00:00:10
4	Temperatura	50 °C	00:01:00
5	Temperatura	95 °C	00:04:42
6	Temperatura	95 °C	00:07:12
7	Temperatura	50 °C	00:11:00
Fin de la prueba			00:13:00

### Cálculo

Calcular las propiedades de la pasta con ayuda del software TWC. Los resultados que se obtienen son los siguientes:

- *Pasting temperature*: temperatura mínima en la que se inicia el incremento de la viscosidad de la suspensión.
- *Peak viscosity*: máxima viscosidad alcanzada por la suspensión durante el calentamiento.
- *Minimum viscosity*: mínima viscosidad alcanzada por la suspensión cuando se culmina el ciclo de calentamiento.
- *Breakdown*: diferencia entre los valores de Peak viscosity y Minimum viscosity.
- *Final viscosity*: viscosidad alcanzada por la suspensión cuando se culmina la prueba.
- *Setback*: diferencia entre los valores de Final viscosity y Minimum viscosity.

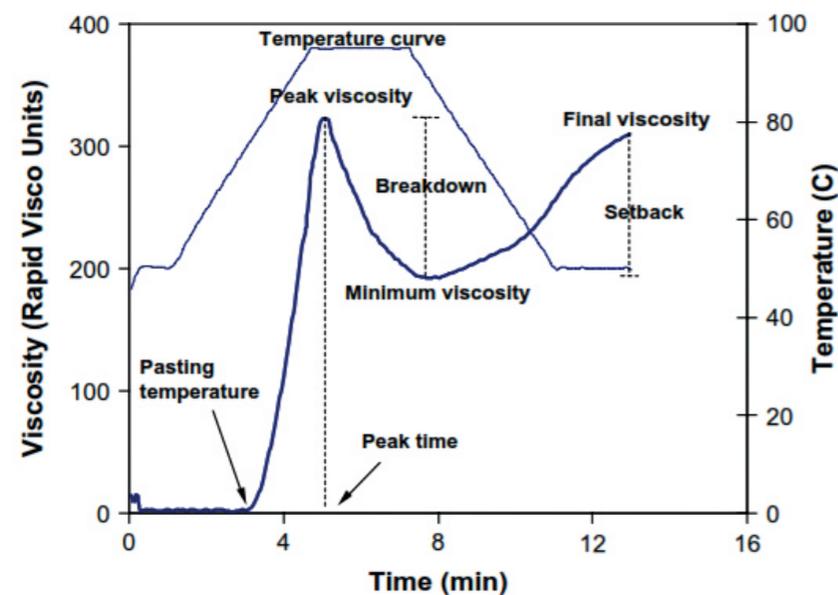


Figura 1. Perfil de viscosidad de pasta de almidón obtenido en el RVA. Adaptado de Copeland, Blazek, Salman y Tang (2009).

### 5.3.6. Referencias

- Ahmed, J., Tiwari, B. K., Imam, S. H. y Rao, M. A. (2012). Starch-based polymeric materials and nanocomposites: Chemistry, processing, and applications. Boca Raton: CRC Press.
- CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H. y Tang, M. C. (2009). Form and functionality of starch. Food Hydrocolloids, 23(6), 1527–1534. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.09.016

## 6. COMPUESTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA -HPLC

### 6.1. Fundamento

El análisis de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) incluye la evaluación de flavonoides y ácidos fenólicos en dos pasos importantes: 1) la hidrólisis de los compuestos fenólicos y 2) la elución y separación de los flavonoides y ácidos fenólicos por cromatografía líquida. Durante la hidrólisis los compuestos fenólicos se separan de su parte glicosídica al reaccionar con un ácido fuerte. El método de hidrólisis se realiza según lo descrito por Mattila y Hellström (2007) con algunas modificaciones. Luego de la hidrólisis, los compuestos fenólicos son identificados y cuantificados por cromatografía líquida (HPLC). La metodología HPLC se adaptó a partir de la investigación de Repo-Carrasco-Valencia, Hellström, Pihlava y Mattila (2010). Debido a que los granos de quinua exhiben un efecto matriz importante, la cuantificación de los compuestos fenólicos se realiza mediante el método de adición de estándar.

### 6.2. Reactivos, materiales y equipos

*Reactivos*: metanol, ácido clorhídrico, ácido ortofosfórico, ter-butilhidroquinona, hidróxido de sodio y acetonitrilo. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico y grado HPLC de las marcas Merck® y J.T. Baker®.

*Estándares*: quercetina, kaempferol, naringenina, epicatequina, catequina, ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido p-coumárico, ácido ferúlico y ácido clorogénico. Todos los estándares son de grado HPLC de la marca Sigma-Aldrich®.

*Materiales*: espátulas de acero, vasos de precipitado, micropipetas, puntas para micropipeta, tubos de vidrio con tapa rosca, gradillas, fiolas, probetas graduadas, viales de color ámbar, columna cromatográfica Kinetex® C18, 150 mm x 2.1 mm, 2.6 µm, precolumna y filtros de membrana de 0.45 µm.

*Equipos*: balanza analítica (Sartorius, Extend), agitador de tubos (Thermo Scientific M37610-33), bomba de vacío (Büchi, V-700), molino ultracentrífugo (Retsch, ZM 200), potenciómetro (Schott, Lab 850), agitador magnético (Velp Scientifica, Arec), baño de ultrasonido (Branson, 3510), baño maría (Mettler, WNE14), centrífuga (Eppendorf 5430 R), cromatógrafo líquido de alta eficiencia (Waters, e2695) y detector de arreglo de diodos (Waters, 2998).

### 6.3. Muestreo

Extraer muestras representativas del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o contaminación biológica.

### 6.4. Preparación de la muestra

Ventear las semillas/granos manualmente para eliminar los restos de paja, tierra y otros materiales extraños y luego, retirar los granos defectuosos indicados en la NTP 205.062 (INACAL, 2014). Realizar la molienda de las semillas en molino ultracentrífugo a 18 000 r.p.m., hasta tamaños de partícula menores de 0.5 mm de diámetro.

### 6.5. Preparación de los reactivos

*Solución de metanol (62.5 %) (2 g/L BHT)*

Medir 156.3 mL de metanol grado HPLC, traspararlo a un recipiente de 250 mL y agregar 500 mg de ter-butilhidroquinona (BHQ). Disolver con ayuda del equipo de baño ultrasonido y agregar 93.7 mL de agua destilada.

*Solución de ácido clorhídrico (6 N)*

Medir 25 mL de agua destilada y colocar en un recipiente de 200 mL. Medir en otra probeta seca 25 mL de HCl (37 %) (ácido clorhídrico concentrado) y transvasar lentamente por las paredes el ácido sobre el medio acuoso.

*Solución A: solución buffer de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM) pH 2.5*

Agregar aproximadamente 400 mL de agua destilada en un vaso de precipitado, adicionar exactamente 1.53 mL de ácido ortofosfórico (85 %) y mezclar con ayuda de un agitador magnético. Mientras se agita la solución, ajustar el pH hasta 2.5±0.05 con gotas de solución de NaOH (8 N). Cuando el pH de la solución esté ajustado, trasvasar a una fiola de 500 mL y enrasar con agua destilada hasta 500 mL. Filtrar la solución preparada con un filtro de membrana de 0.45 µm y degasificar en el equipo de ultrasonido por 10 minutos.

*Solución B: acetonitrilo*

Acetonitrilo grado HPLC. Degasificar por 10 minutos utilizando el equipo de ultrasonido.

*Solución hidróxido de sodio (8 N)*

Pesar 31.99 g de hidróxido de sodio en un beaker de 250 mL de agua destilada y adicionar 80 mL de agua destilada. Utilizar un agitador magnético para facilitar la disolución del hidróxido de sodio. Cuando todo el hidróxido de sodio se haya disuelto, dejar enfriar la solución y luego transvasar a una fiola de 100 mL. Enrasar con agua destilada hasta completar los 100 mL.

**6.6. Procedimiento**

*Extracción y digestión*

- Pesar 500 mg de muestra molida dentro de una fiola de 25 mL. Rotular la fiola y cubrir con papel aluminio.
- Añadir 10 mL de metanol (62.5 %) (2 g/L BHT) y homogeneizar con una agitación suave.
- Llevar la fiola a baño de ultrasonido por 5 minutos a temperatura ambiente. Agitar suavemente para homogeneizar la muestra y evitar que se apelmace en el fondo de la fiola.
- Agregar 3.5 mL de solución estándar final (ver preparación más adelante) para la fortificación de las muestras. Para la preparación de la curva de calibración, el volumen varía según lo descrito en **Preparación de la curva estándar de compuestos fenólicos**.
- Agregar con cuidado 2.5 mL de HCl (6 N) para la digestión y cubrir las fiolas con papel aluminio.
- Colocar las fiolas en baño maría a 70 °C por dos horas. Agitar la fiola cada 30 minutos para asegurar que el solvente de digestión interactúe con toda la muestra.
- Luego de la digestión, retirar las fiolas del baño maría y llevarlas al baño de ultrasonido por 5 minutos.
- Enfriar las fiolas hasta alcanzar la temperatura ambiente.
- Completar el volumen de las fiolas hasta 25 mL utilizando metanol grado p.a.
- Dejar reposar las fiolas por unos minutos hasta que las partículas más grandes precipiten y luego, filtrar usando filtros de jeringa de nylon 0.45 µm.
- Colocar el filtrado en viales para HPLC de 2 mL color ámbar.

**Análisis cromatográfico**

- Realizar el análisis de compuestos fenólicos en una columna cromatográfica Kinetex® C18, 150 mm x 2.1 mm, 2.6 µm, unida a una pre-columna compatible. La fase móvil consiste en elución en gradiente de solvente A (buffer de ácido fosfórico (50 mM) a pH 2.5±0.05) y solvente B (acetonitrilo), cuyo programa se encuentra en la tabla 6. La temperatura de la cámara de columna es de 35 °C. Antes de iniciar el análisis, acondicionar la columna con la fase móvil (proporción inicial) por 30 minutos con un flujo de 0.16 mL/min y luego, realizar tres eluciones de solución blanco. El volumen de inyección tanto para las muestras como las soluciones estándar es de 2 µL.

Tabla 6  
Programa de elución en gradiente para el análisis por HPLC-DAD de compuestos fenólicos en matriz de granos de quinua

Tiempo (minuto)	Flujo (mL/minuto)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Pendiente
-	0.16	95.0	5.0	6
2.55	0.16	95.0	5.0	6
8.65	0.16	85.0	15.0	6
20.36	0.16	85.0	15.0	6
30.55	0.16	50.0	50.0	6
33.09	0.16	50.0	50.0	6
34.11	0.16	95.0	5.0	6
45.00	0.16	95.0	5.0	6

- Para la detección y cuantificación, emplear un detector de arreglo de fotodiodos (Photodiode Array Detector, PDA), configurar en modo lectura fija a 254, 280, 329 y 370 nm.
- Iniciar el análisis con la elaboración de una curva de calibración mediante la inyección por duplicado de diluciones de solución estándar. Calcular las áreas de los picos correspondientes a cada compuesto fenólico y realizar la regresión lineal. La curva de calibración debe ser aceptable y presentar un coeficiente de correlación (R<sup>2</sup> ajustado) mayor a .995 y un porcentaje residual menor a 5 % en cada nivel de la curva.
- Realizar el análisis de las muestras por duplicado, inyectar cada réplica dos veces. Utilizar la ecuación lineal, obtenida de la regresión de la curva de calibración, calcular la concentración de cada compuesto fenólico en quinua.

*Preparación de la curva estándar de compuestos fenólicos*

- Compuestos fenólicos a evaluar: ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido p-coumárico, ácido ferúlico, ácido clorogénico, quercetina, kaempferol, naringenina, epicatequina y catequina. Preparar la solución estándar conteniendo todos estos compuestos.
- La primera solución stock contiene solo los ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido p-coumárico, ácido ferúlico y ácido clorogénico) debido a que son químicamente más estables durante su almacenamiento. Pesar una cantidad exacta de cada estándar (Tabla 7) y colocarla en un frasco ámbar de 50 mL. Agregar exactamente 20 mL de metanol (62.5 %) (2 g/L BHT) con ayuda de una micropipeta y colocar el frasco cerrado al baño de ultrasonido por 5 minutos hasta que todos los sólidos se hayan disuelto.

Tabla 7  
Peso de ácidos fenólicos para la preparación de la solución stock de ácidos fenólicos

Ácido fenólico	Peso (mg)
Ácido gálico	12.0
Ácido 4-hidroxibenzóico	12.0
Ácido vanílico	22.0
Ácido cafeico	15.0
Ácido siríngico	12.0
Ácido p-coumárico	10.0
Ácido ferúlico	10.0
Ácido clorogénico	10.0

- Solución estándar final: preparar la solución estándar final. Pesar en la balanza analítica los flavonoides (quercetina, kaempferol, naringenina, catequina y epicatequina). Pesar exactamente los estándares (Tabla 8) y transferir a una fiola ámbar de 50 mL. Agregar 45 mL de metanol (62.5 %) (2 g/L BHT) y llevar por 5 minutos al baño de ultrasonido, procurando disolver todos los sólidos.
- Transferir 500 µL de la primera solución stock a la segunda solución stock y añadir metanol (62.5 %) (2 g/L BHT) hasta completar el volumen hasta 50 mL. Emplear la solución estándar final para la fortificación de la matriz y las muestras.

Tabla 8  
Peso aproximado de ácidos fenólicos para la preparación de la solución estándar final

Flavonoide	Peso (mg)
Quercetina	4.0
Kaempferol	4.0
Naringenina	12.0
Catequina	12.0
Epicatequina	12.0

- El primer nivel de calibración: seleccionar una muestra representativa de matriz y seguir el procedimiento descrito en extracción y digestión. En vez de agregar 3 mL de solución estándar final, agregar 2.0 mL.
- El segundo nivel de calibración: seleccionar una muestra representativa de matriz y seguir el procedimiento descrito en extracción y digestión. En vez de agregar 3 mL de Solución estándar final, agregar 3.5 mL.
- El tercer nivel de calibración: seleccionar una muestra representativa de matriz y seguir el procedimiento descrito en extracción y digestión. En vez de agregar 3 mL de solución estándar final, agregar 6.0 mL.

### Cálculo

#### Elaboración de curva de calibración

Realizar la curva de calibración para cada compuesto fenólico evaluado. En el eje X colocar la concentración teórica de cada nivel de calibración, mientras que en el eje Y colocar la resta de la señal obtenida de la muestra fortificada con la señal de la matriz.

Ejemplo:

Ácido cafeico

Peso de estándar = 15.0 mg

Factor de dilución (Fd1) = 0.0005

Factor de dilución (Fd2) = X/25 (donde "X" es 2.0, 3.5 o 6.0, según el volumen de solución estándar final añadido al nivel de calibración)

Tabla 9  
Elaboración de curva de calibración de ácido cafeico, siendo el eje X "concentración teórica" y el eje Y "área corregida"

Nivel de calibración	Factor dilución (Fd1 x Fd2)	Concentración teórica (mg/mL)	Área matriz	Área fortificada	Área corregida (diferencia)	RSD (%)
Nivel 1	4 x 10 <sup>-5</sup>	0.0006	159827	85778	74049	1.42
Nivel 1	4 x 10 <sup>-5</sup>	0.0006	158352	85778	72574	
Nivel 2	7x 10 <sup>-5</sup>	0.00105	192342	85778	106564	1.45
Nivel 2	7 x 10 <sup>-5</sup>	0.00105	194564	85778	108786	
Nivel 3	12 x 10 <sup>-5</sup>	0.0018	261505	85778	175727	0.36
Nivel 3	12 x 10 <sup>-5</sup>	0.0018	262342	85778	176564	

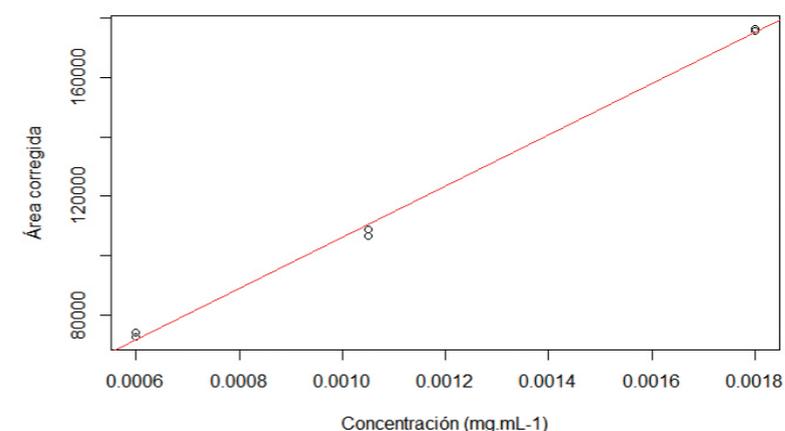


Figura 2. Curva de calibración del ácido cafeico. Pendiente de curva = 86 266 326.53; intercepción de la curva = 19837.72; coeficiente de determinación corregido = 0.9975.

*Cuantificación del compuesto fenólico*

Luego de confirmar que el coeficiente de determinación corregido y la desviación estándar relativa corresponden a una regresión lineal, emplear los valores de "Intercepto" y "Pendiente de curva". Para la cuantificación es necesario restar la señal obtenida de la muestra fortificada con la concentración teórica del estándar agregado.

Ejemplo:

Ácido cafeico en semillas de quinua  
 Peso muestra (Wmp) = 500 mg  
 Factor de dilución (Fdmp) = 0.04  
 Área 1 de matriz = 168692  
 Área 2 de matriz = 167639

$$\text{Concentración curva (mg/mL)} = \frac{(\text{Área de muestra} - \text{Intercepto en curva})}{(\text{Pendiente de la curva})}$$

$$\text{Concentración curva (mg/mL)} = \frac{(168692 - 19837.72)}{86266326.53}$$

$$\text{Concentración curva (mg/mL)} = 0.001726$$

$$\text{Concentración (mg/100g)} = \frac{0.00067 * 1000}{500 * 0.99 * 0.04} * 100$$

$$\text{Concentración (mg/100g)} = 3.38 \text{ mg/100g}$$

**Observaciones**

Los valores de la curva de calibración corresponden a la información presentada en el documento.

**6.7. Referencias**

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.  
 INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.  
 Mattila, P. y Hellström, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. Journal of Food Composition and Analysis, 20(3), 152–160. doi: 10.1016/j.jfca.2006.05.007  
 Repo-Carrasco-Valencia, R., Hellström, J. K., Pihlava, J. M. y Mattila, P. H. (2010). Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (Chenopodium quinoa), kañiwa (Chenopodium pallidicaule) and kiwicha (Amaranthus caudatus). Food Chemistry, 120(1), 128–133. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.09.087

Tabla 10  
 Cuantificación de muestra de granos de quinua usando curva de calibración fortificada

Nivel de calibración	Área	Concentración curva (mg/mL)	Concentración teórica** (mg/mL)	Diferencia (mg/mL)	%RSD
Repetición 1	168692	0.001726	0.00105	0.000676	1.37
Repetición 2	167639	0.001713	0.00105	0.000663	

\*\* Concentración agregada en el proceso de fortificación (concentración de segundo nivel de calibración).

$$\text{Concentración (mg/100g)} = \frac{D * 1000 * 100}{W * Pot * Fd}$$

Donde:

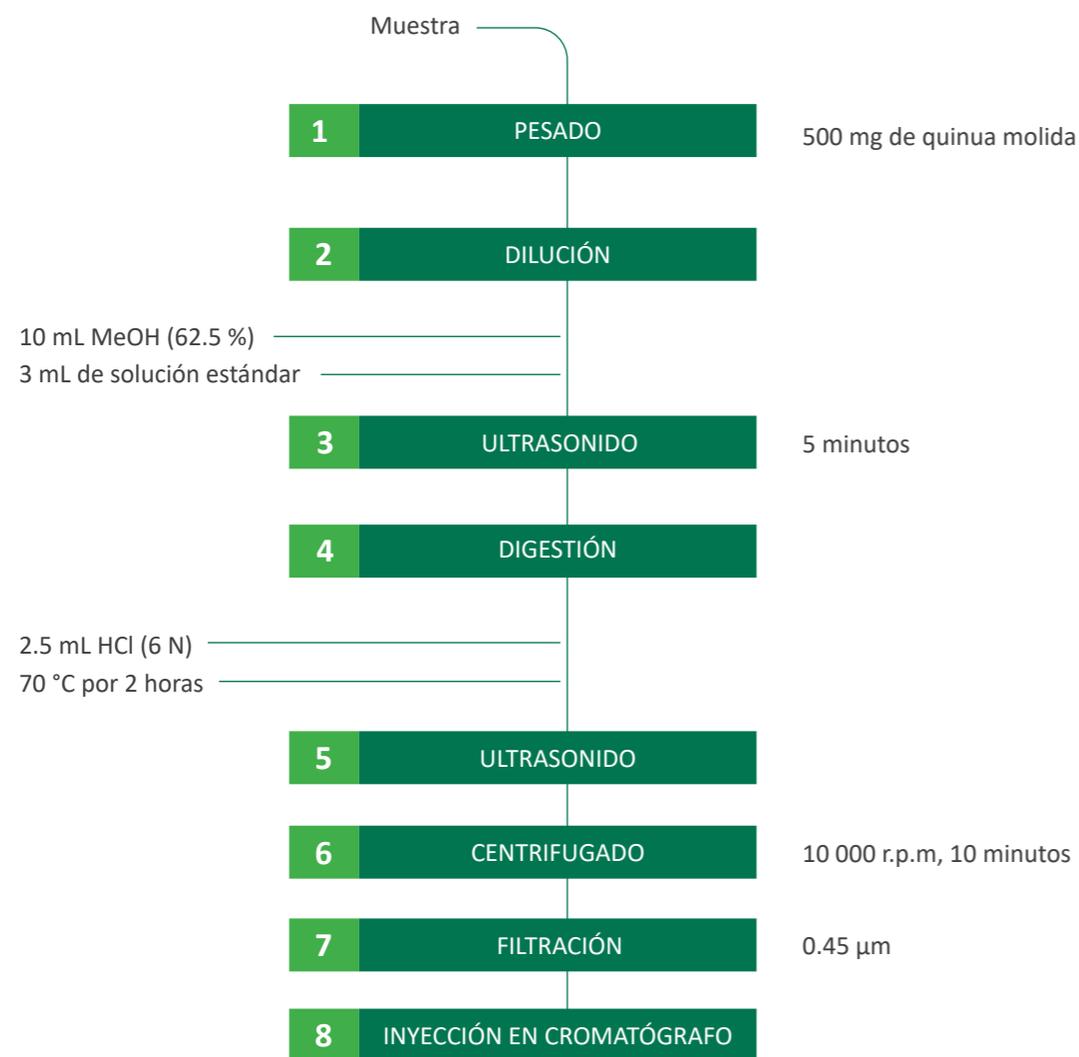
D: Promedio de Diferencia entre Concentración curva y Concentración teórica (mg/mL)  
 W: Peso de la muestra problema (mg)  
 Pot: Potencia de estándar utilizado  
 Fd: Factor de dilución de la muestra (0.04)

Ejemplo:

Muestra: Semillas de quinua  
 D = 0.00067  
 W = 500  
 Pot = 0.99  
 Fd = 0.04

Anexo

Anexo 6. Diagrama de flujo del tratamiento de muestras para el análisis de compuestos fenólicos por cromatografía líquida



## 7. PLAGUICIDAS EN SEMILLAS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA (GC-ECD)

### 7.1. Fundamento

El control de plagas y enfermedades en los diferentes cultivos a nivel mundial se realiza con plaguicidas. Estos plaguicidas incluyen: herbicidas, insecticidas, nematocidas, moluscocidas, rodenticidas, bactericidas, repelentes de insectos, antimicrobianos, fungicidas, avicidas, entre otros. Estas sustancias, presentan diferentes estructuras químicas, con principios activos diversos, dentro de los que se encuentran: compuestos organofosforados, compuestos carbamatos, compuestos organoclorados, piretroides, derivados del biperidilo, triazinas, tiocarbamatos, derivados del ácido fenoxiacético, derivados de cumarinas, derivados de clorotifenol, compuestos de cobre, compuestos organomercuriales, entre otros; que se caracterizan por sus diferentes propiedades fisicoquímicas tales como polaridad, solubilidad, punto de ebullición y permiten su análisis utilizando una determinada técnica espectrofotométrica o cromatográfica. Para el caso del cultivo de la quinua, en el manual se consideran cuatro pesticidas (dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y cipermetrina) comúnmente utilizados durante su cultivo y que se analizan por técnicas de cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones (GC-ECD). Su residualidad y persistencia en el ambiente debe ser controlada y monitoreada a fin de no exceder los límites máximos residuales permitidos por el Ministerio de Salud (MINSa, 2016) para nuestro país y por organismos regulatorios supranacionales a nivel internacional.

### 7.2. Reactivos, materiales y equipos

*Reactivos:* metanol y acetato de etilo. Los solventes son de grado GC de las marcas Merck® y JT. Baker®.

*Estándares:* dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y cipermetrina. Todos los estándares son de grado GC de la marca Sigma-Aldrich®.

*Materiales:* espátulas de acero, vasos de precipitado, fiolas, tubos de vidrio con tapa rosca, cartuchos SPE de C18, micropipetas, puntas para micropipeta y papel Whatman N° 1.

*Equipos:* balanza analítica (Sartorius, Extend), bomba de vacío (Büchi, V-700), molino ultracentrífugo (Retsch, ZM 200), baño de ultrasonido (Branson, 3510), agitador de tubos (Thermo Scientific, M37610-33), evaporador múltiple (Büchi, Multivapor P-6), cromatógrafo de gases acoplado a detector por captura de electrones (Thermo Scientific, Trace 1300) y sistema de extracción en fase sólida (Waters, WAT200677).

### 7.3. Muestreo

Extraer una muestra representativa del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

### 7.4. Preparación de la muestra

Ventear las semillas de forma manual para eliminar restos de paja, tierra y otros materiales extraños y luego, retirar de forma manual los granos defectuosos indicados en la NTP 205.062 (INACAL, 2014). Finalmente, moler las semillas en molino ultracentrífugo a velocidad de 18 000 r.p.m., hasta tamaños de partícula menor de 0.5 mm de diámetro.

### 7.5. Procedimiento

*Extracción*

- Pesarse 2 g de semillas molidas de quinua en un vaso de precipitado de 25 mL y agregar 6 mL de acetato de etilo. Cubrir el vaso de precipitado con papel aluminio para proteger de la luz.

- Llevar a baño de ultrasonido a temperatura ambiente por 35 minutos.
- Filtrar el contenido empleando papel Whatman N° 1 y lavar con 5 mL de acetato de etilo dos veces.
- Concentrar el filtrado hasta aproximadamente 2 mL utilizando un evaporador múltiple a 35 °C.
- Realizar la extracción en fase sólida, empleando cartuchos C18 de 3 mL. Previamente, activar el cartucho con 2 mL de metanol y acondicionar con 2 mL de acetato de etilo. Cargar 2 mL del filtrado obtenido y eluir con 4 mL de acetato de etilo.
- Evaporar a sequedad, empleando el evaporador múltiple a 35 °C y reconstituir la muestra empleando 1 mL de acetato de etilo.
- Diluir la muestra reconstituida en una proporción de 1 en 10 (0.1 mL de muestra con 0.9 mL de acetato de etilo) y colocar en un vial cromatográfico para su análisis.

*Condiciones cromatográficas*

- Realizar el análisis de pesticidas en matriz de semilla de quinua en un capilar cromatográfico TG-5MS 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm (Thermo Scientific). Configurar el programa de rampas de temperatura del horno de la siguiente manera: temperatura inicial de 40 °C (tiempo de mantenimiento de 1 minuto), calentamiento hasta 230 °C a una velocidad de 25 °C/minuto (tiempo de mantenimiento de 3 minutos) y de 230 °C hasta 265 °C a una velocidad de 3 °C/minuto (tiempo de mantenimiento de 0.5 minutos). La temperatura de inlet y detector: 260 °C y 300 °C, respectivamente. El volumen de inyección: 1 µL.

*Preparación de la curva estándar de dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y cipermetrina*

- Pesar 1 mg de dimetoato y diluir con 10 mL de acetato de etilo (solución stock 0.1 mg/mL) en un tubo de vidrio de 15 mL. Realizar el mismo procedimiento con clorotalonil, clorpirifos y cipermetrina. Proteger de la luz.
- Transvasar 10 µL de cada solución stock a una fiola y completar hasta 10 mL (solución intermedia 0.1 µg/mL).
- De la solución intermedia, extraer los volúmenes 50, 250, 500, 750 y 1000 µL y llevar a 1 mL, para obtener 5 niveles de curva de calibración compuestos por 5, 25, 50, 75 y 100 ppb.

**Cálculo**

*Elaboración de curva de calibración*

Realizar la curva de calibración para cada pesticida evaluado. En el eje X, colocar la concentración teórica de cada nivel de calibración, mientras que en el eje Y, colocar el área del pico del pesticida correspondiente a la concentración.

Ejemplo:

Clorotalonil  
 Peso de estándar = 1.0 mg  
 Factor de dilución (Fd1) =  $0.0001 * 1\,000\,000 = 100$  (para convertir de mg/mL a µg/L)  
 Factor de dilución (Fd2) = X (donde "X" es 0.050, 0.250, 0.500, 0.750 y 1.000 según el nivel de calibración)

Tabla 11  
 Elaboración de curva de calibración de clorotalonil

Nivel de calibración	Factor dilución (Fd1 x Fd2)	Concentración teórica (µg/L)	Área matriz	RSD (%)
Nivel 1	5	5	0.0526	0.54
Nivel 1	5	5	0.0530	
Nivel 2	25	25	0.2741	1.48
Nivel 2	25	25	0.2799	
Nivel 3	50	50	0.5405	0.97
Nivel 3	50	50	0.5480	
Nivel 4	75	75	0.8129	0.61
Nivel 4	75	75	0.8200	
Nivel 5	100	100	1.0898	0.019
Nivel 5	100	100	1.0901	

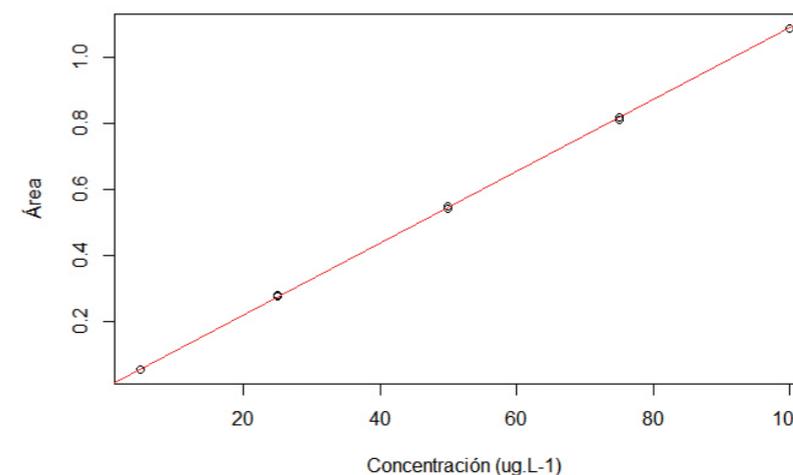


Figura 3. Curva de calibración de clorotalonil. Pendiente de la curva = 0.01089; intercepto de la curva = 0.00077; coeficiente de determinación corregido = 0.99999.

*Cuantificación del pesticida*

Realizar la cuantificación del pesticida por duplicado. Para ello, emplear los resultados de intercepto de curva y pendiente de curva, calculados en la regresión lineal de los estándares.

Ejemplo:

Clorotalonil en granos de quinua

Área repetición 1 = 0.1625

Área repetición 2 = 0.1634

En la repetición 1:

$$\text{Concentración repetición 1 } (\mu\text{g/L}) = \frac{\text{Área de muestra} - \text{Intercepto de curva}}{\text{Pendiente de la curva}}$$

$$\text{Concentración repetición 1 } (\mu\text{g/L}) = \frac{(0.1625 - 0.00077)}{0.01089}$$

$$\text{Concentración repetición 1 } (\mu\text{g/L}) = 14.85 \mu\text{g/L}$$

En la repetición 2:

$$\text{Concentración repetición 2 } (\mu\text{g/L}) = \frac{\text{Área de muestra} - \text{Intercepto de curva}}{\text{Pendiente de la curva}}$$

$$\text{Concentración repetición 1 } (\mu\text{g/L}) = \frac{(0.1634 - 0.00077)}{0.01089}$$

$$\text{Concentración repetición 1 } (\mu\text{g/L}) = 14.93 \mu\text{g/L}$$

Cálculo de la concentración de clorotalonil en semilla de quinua:

Concentración de repetición ( $\mu\text{g/L}$ ) = 14.85 y 14.93  $\mu\text{g/L}$

Peso de muestra (kg) = 0.002 kg

Potencia de estándar = 0.99

Factor de dilución = 1000

En la repetición 1:

$$\text{Concentración 1 } (\mu\text{g/kg}) = \frac{\text{Concentración de repetición}}{\text{Peso de muestra} * \text{Potencia de estándar} * \text{Factor de dilución}}$$

$$\text{Concentración 1 } (\mu\text{g/kg}) = \frac{14.85}{0.002 * 0.99 * 1000}$$

$$\text{Concentración 1 repetición 1 } (\mu\text{g/L}) = 7.50 \mu\text{g/kg}$$

En la repetición 2:

$$\text{Concentración 2 } (\mu\text{g/kg}) = \frac{\text{Concentración de repetición}}{\text{Peso de muestra} * \text{Potencia de estándar} * \text{Factor de dilución}}$$

$$\text{Concentración 2 } (\mu\text{g/kg}) = \frac{14.93}{0.002 * 0.99 * 1000}$$

$$\text{Concentración 2 repetición 1 } (\mu\text{g/L}) = 7.54 \mu\text{g/kg}$$

## Observaciones

Los valores de la curva de calibración corresponden a la información presentada en el documento.

## 7.6. Referencias

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.

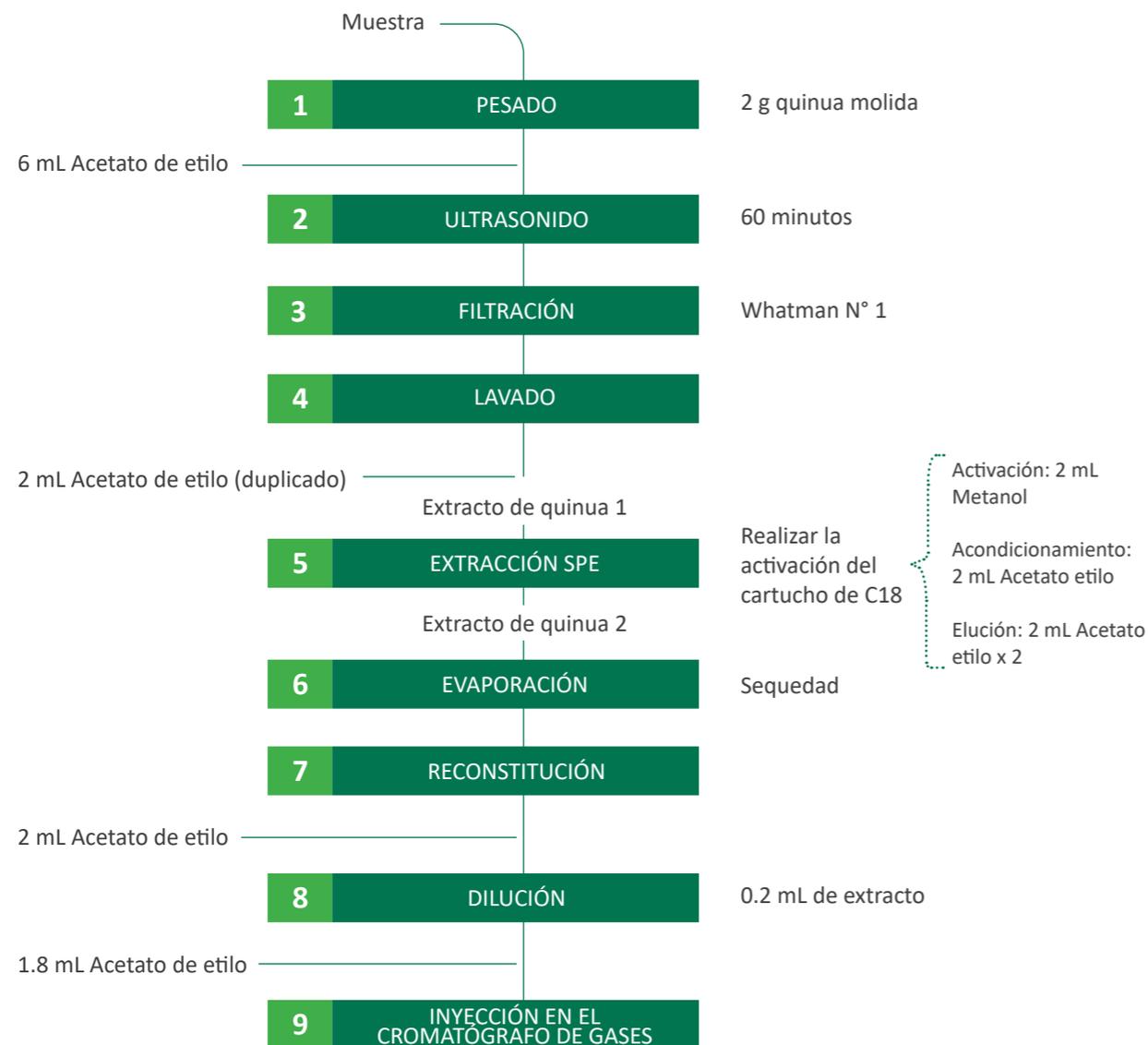
INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.

Ministerio de Salud (MINSA). (2016). Norma Sanitaria que establece los Límites Máximos de Residuos (LMR) de plaguicidas de uso agrícola en alimentos de consumo humano. Recuperado de

<https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/11/RM-1006-2016-MINSA-con-NTS-128-MINSA-2016-DIGESA-LMR-Plaguicidas.pdf>

Anexo

Anexo 7. Diagrama de flujo para el análisis de pesticidas dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y cipermetrina de semillas de quinua por cromatografía gaseosa



## 8. MINERALES EN SEMILLAS Y PROCESADOS DE QUINUA POR ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR Y ATÓMICA

### 8.1. Análisis de fósforo

#### 8.1.1. Fundamento

El fósforo es un nutriente necesario para el crecimiento y desarrollo de todos los seres vivos, forma parte de la constitución y estructura de las membranas celulares y participa en la mayoría de los procesos metabólicos de los seres vivos (Miller, 2008). La detección y cuantificación de fósforo se realiza según el método 965.17 de la AOAC (1990) con ciertas modificaciones. En este método, los poliácidos hexamolíbico y tetra vanádico se agrupan en torno al fósforo como átomo central, formando un complejo heteropoliácido estable de color amarillo que se cuantifica a 400 nm (Carrasquero y Adams, 1995; Hanson, 1950).

#### 8.1.2. Reactivos, materiales y equipos

**Reactivos:** fosfato de potasio monobásico, metavanadato de amonio, molibdato de amonio tetrahidratado, ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido perclórico. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Merck®, Sigma-Aldrich® y J.T. Baker®.

**Materiales:** espátulas y pinzas de acero, crisoles de porcelana, campana desecadora, gel de sílice, vasos de precipitado, matraces, fioles, probetas graduadas, micropipetas, puntas para micropipeta, pipetas graduadas, bombilla de succión, celdas de cuarzo, goteros, papel Whatman N° 1 y embudos.

**Equipos:** balanza analítica (AND, HR-250AZ), estufa (Memmert, UFE 500), molino ultracentrífugo (Restch, ZM 200), mufla eléctrica (Thermo Scientific, FB1410M), cronómetro (Kenko, KK-5898), plancha de calentamiento (Thermo Scientific, SP131530), campana extractora de gases (Labconco, Premier) y espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S).

#### 8.1.3. Muestreo

Extraer muestras representativas del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

#### 8.1.4. Preparación de la muestra

##### Semillas/granos crudos

Ventear las semillas/granos crudos de forma manual para eliminar restos de paja, tierra y otros materiales extraños y luego retirar de forma manual los granos defectuosos indicados en la NTP 205.062 (INACAL, 2014). Finalmente, moler las semillas en molino ultracentrífugo a velocidad de 18 000 r.p.m., hasta tamaños de partícula menor de 0.5 mm de diámetro.

##### Extruidos y cocidos

Moler los granos procesados en molino ultracentrífugo a velocidad de 18 000 r.p.m., hasta tamaños de partícula menores de 0.5 mm de diámetro.

### 8.1.5. Preparación de reactivos

#### Reactivo molibdovanato

Pesar 10 g de molibdato de amonio tetrahidratado y disolver en un vaso de precipitado de 250 mL que contiene un volumen de 100 mL de agua destilada caliente. Agitar la solución en caliente hasta disolver por completo la sal y dejar enfriar a temperatura ambiente. Por otra parte, pesar 0.5 g de metavanadato de amonio y disolver en un vaso de precipitado de 500 mL que contiene un volumen de 62.5 mL de agua destilada caliente, agitar la solución en caliente hasta que se disuelva por completo la sal y dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar lentamente por las paredes del vaso del precipitado 62.5 mL de ácido perclórico concentrado (70 %) y luego de manera gradual, la solución de molibdato de amonio, preparada inicialmente. Finalmente, trasvasar la mezcla a una fiola de 500 mL y enrasar con agua destilada.

#### Solución de ácido nítrico (1+1)

Medir 10 mL de agua destilada en una probeta graduada y trasvasar su contenido a un vaso de precipitado de 100 mL. En otra probeta graduada medir 10 mL de ácido nítrico concentrado (65 %) y añadir cuidadosamente al vaso de precipitado que contiene agua destilada. Mezclar y dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente.

#### Solución de ácido clorhídrico (1+1)

Medir 100 mL de agua destilada en una probeta graduada y trasvasarlo a un vaso de precipitado de 500 mL. En otra probeta graduada, medir 100 mL de ácido clorhídrico concentrado (37 %) y añadir cuidadosamente al vaso de precipitado que contiene agua destilada. Mezclar y dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente.

### 8.1.6. Procedimiento

#### Extracción

- Pesar 1 g de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) en un crisol de porcelana.
- Incinerar las muestras a 600 °C por 4 horas o hasta que se haya completado la incineración (residuo final blanco/gris). Apagar la mufla, retirar los crisoles cuando la temperatura al interior de la mufla sea menor a 250 °C y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Una vez que los crisoles se encuentren fríos, añadir 10 gotas de agua destilada para humedecer las cenizas y cuidadosamente añadir 4 mL de solución de ácido nítrico (1+1).
- Calentar los crisoles en una plancha de calentamiento hasta evaporar toda la solución de ácido nítrico (1+1) y enfriar a temperatura ambiente.
- Incinerar el residuo a 500 °C por 1 hora. Apagar la mufla, retirar los crisoles cuando la temperatura al interior de la mufla sea menor a 250 °C y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Una vez que los crisoles están fríos, añadir 10 mL de solución de ácido clorhídrico (1+1) y disolver las cenizas.
- Filtrar la solución a través de un papel filtro Whatman N° 1 y coleccionar el filtrado en una fiola de 50 mL. Enrasar con agua destilada.

#### Determinación

- Extraer 200 µL del extracto obtenido y trasvasar a una fiola de 5 mL.
- Agregar 1 mL del reactivo molibdovanato, agitar durante 15 segundos y enrasar con agua destilada.
- Dejar en reposo la fiola por 10 minutos a temperatura ambiente.

- Con cuidado, colocar las muestras en las celdas de cuarzo para su lectura a 400 nm en el espectrofotómetro.

#### Preparación de la curva estándar con fósforo

- Preparar una solución stock de fósforo (2 mg/mL). Pesar 0.8788 g de fosfato de potasio monobásico y llevar a un volumen final de 100 mL con agua destilada.
- Preparar una solución intermedia de 0.1 mg/mL de fósforo. Extraer una alícuota de 0.5 mL de la solución stock y llevar a un volumen final de 10 mL con agua destilada.
- Preparar soluciones con seis diferentes niveles de concentración para la curva de calibración, siendo las concentraciones seleccionadas de 2, 3, 4, 5, 6 y 8 mg/L; extraer una alícuota de 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 y 0.4 mL de la solución intermedia y llevar a un volumen final de 5 mL con agua destilada.
- Elaborar la curva de calibración, verificar que el rango de absorbancias se encuentre aproximadamente entre 0.10 y 0.85

#### Cálculos

- Graficar la concentración de cada solución estándar versus valores de absorbancia.
- Interpolarse en la curva de calibración el valor de la absorbancia y calcular la concentración de la muestra.
- Calcular la cantidad de fósforo como mgfósforo/g de muestra (mgP/g), usar la ecuación de la curva estándar ( $r^2=1$ ,  $y=0.0797x+0.0042$ ).

$$\text{Fósforo (mg P/g)} = \frac{([A-b/m] * V * Fd)}{W * 1000}$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra obtenidas después de la reacción a 400 nm  
 b = Intercepto en eje Y de la curva de calibración  
 m = Pendiente de la curva de calibración  
 V = Volumen a diluir la muestra en la primera dilución (100 mL)  
 Fd = Factor de dilución del extracto  
 W = Peso de la muestra (g)

Ejemplo:

Muestra: semillas de quinua  
 A = 0.272  
 V = 50 mL  
 W = 1.0000  
 m = 0.0797  
 b = 0.0042  
 Fd = 25

$$\text{Fósforo (mg P/100g)} = \frac{([0.272 - 0.0042 / 0.0797] * 50 * 25)}{1.0000 * 1000} * 100$$

$$\text{Fósforo (mg P/100g)} = 420.01$$

### Observaciones

Obtener las absorbancias de las muestras dentro del rango de linealidad del método espectrofotométrico, en algunos casos, realizar una nueva dilución, considerar en la fórmula del cálculo del contenido de fósforo.

Los valores de la curva de calibración corresponden a la información presentada en el documento.

### 8.1.7. Referencias

- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed., Vol. 2). Arlington: Association of Analytical Chemists.
- Carrasquero, A. y Adams, M. (1995). Estudio del complejo amarillo vanadomolibdofosfórico para el análisis de fósforo en suelos. *Venesuelos*, 3(2), 83–88.
- CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.
- Hanson, W. C. (1950). The photometric determination of phosphorus in fertilizers using the phosphovanado-molybdate complex. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1(6), 172–173. doi: 10.1002/jsfa.2740010604
- INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinua. Requisitos. Lima, Perú.
- Miller, D. (2008). Minerals. En S. Damodaran, K. L. Parkin, y O. Fennema (Eds.), *Fennema's Food Chemistry* (4th ed., pp. 521–564). Boca Raton: CRC Press.

## 8.2. Análisis de potasio, calcio, magnesio, zinc, cobre y hierro

### 8.2.1. Fundamento

El análisis de potasio, calcio, magnesio, zinc, cobre y hierro se realiza por espectroscopia de absorción atómica (AAS, por sus siglas en inglés). La técnica analítica se fundamenta en la absorción de radiación (visible o ultravioleta) por los átomos en estado gaseoso (Nielsen, 2010). La cantidad de radiación absorbida por los átomos está determinada por la ley de Beer, que relaciona la pérdida de la radiación emitida por la fuente de radiación con la concentración de la especie química (Welz y Sperling, 1999). La preparación de la muestra se realiza según el método 975.03 de la AOAC (1990). Luego, los minerales son cuantificados mediante AAS a partir de las soluciones preparadas.

### 8.2.2. Reactivos, materiales y equipos

Reactivos: ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido perclórico, soluciones estándar de calcio, potasio, magnesio, hierro, cobre y zinc. Todos los reactivos y solventes son de grado analítico de las marcas Merck®, Sigma-Aldrich® y J.T. Baker®.

Materiales: espátulas y pinzas de acero, crisoles de porcelana, campana desecadora, gel de sílice, vasos de precipitado, fiolas, probetas graduadas, micropipetas, puntas para micropipeta, pipetas graduadas, bombilla de succión, goteros, papel Whatman N° 1 y embudos.

Equipos: balanza analítica (AND, HR-250AZ), estufa (Mettler, UFE 500), molino ultracentrífugo (Restch, ZM 200), mufla eléctrica (Thermo Scientific, FB1410M), plancha de calentamiento (Thermo Scientific, SP131530), campana extractora de gases (Labconco, Premier) y espectrómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer, AAnalyst 200).

### 8.2.3. Muestreo

Extraer muestras representativas del lote a evaluar, de acuerdo a los procedimientos indicados en la Norma CAC/GL 50 (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Las muestras se deben encontrar en buen estado, sin presencia de daño físico o biológico.

### 8.2.4. Preparación de la muestra

Preparar la muestra como se describe en el procedimiento del método "Análisis de fósforo".

### 8.2.5. Preparación de reactivos

#### *Solución de ácido nítrico (1+1)*

Medir 10 mL de agua destilada en una probeta graduada y trasvasarlo a un vaso de precipitado de 100 mL. En otra probeta graduada, medir 10 mL de ácido nítrico concentrado (65 %) y añadir cuidadosamente al vaso de precipitado que contiene agua destilada. Mezclar y dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente.

#### *Solución de ácido clorhídrico (1+1)*

Medir 100 mL de agua destilada en una probeta graduada y trasvasarlo a un vaso de precipitado de 500 mL. En otra probeta graduada, medir 100 mL de ácido clorhídrico concentrado (37 %) y añadir cuidadosamente al vaso de precipitado que contiene agua destilada. Mezclar y dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente.

### 8.2.6. Procedimiento

#### *Extracción*

- Pesar 1 g de muestra molida (con precisión de 0.1 mg) en un crisol de porcelana.
- Incinerar las muestras a 600 °C por 4 horas o hasta que se haya completado la incineración (residuo final blanco/gris). Apagar la mufla, retirar los crisoles cuando la temperatura al interior de la mufla sea menor a 250 °C y dejar enfriar a temperatura ambiente.

- Una vez que los crisoles están fríos, añadir 10 gotas de agua destilada para humedecer las cenizas y cuidadosamente añadir 4 mL de solución de ácido nítrico (1+1).
- Calentar los crisoles en una plancha de calentamiento hasta evaporar toda la solución de ácido nítrico (1+1) y enfriar a temperatura ambiente.
- Incinerar el residuo a 500 °C por 1 hora. Apagar la mufla, retirar los crisoles cuando la temperatura al interior de la mufla sea menor a 250 °C y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Una vez que los crisoles están fríos, añadir 10 mL de solución de ácido clorhídrico (1+1) y disolver las cenizas.
- Filtrar la solución a través de un papel filtro Whatman N° 1 y colectar el filtrado en una fiola de 50 mL. Enrasar con agua destilada.

*Parámetros del espectrómetro de absorción atómica*

Los valores de longitud de onda empleada y mezcla de gases para generación de la flama se detallan en la tabla 12.

Tabla 12  
Parámetros del espectrómetro de absorción atómica

Metal	Longitud de onda (nm)	Mezcla de gases para flama	Flujo de gases (L/min)
Calcio	422.7	Óxido nitroso - acetileno	4.2
Cobre	324.8	Aire - acetileno	1.0
Hierro	248.3	Aire - acetileno	0.9
Potasio	766.5	Aire - acetileno	1.2
Magnesio	285.2	Aire - acetileno	1.0
Zinc	213.9	Aire - acetileno	1.0

*Preparación de la curva estándar de minerales*

- Construir las curvas de calibración a partir de las soluciones stock de cada elemento. Realizar cada curva de calibración por separado.
- Extraer una alícuota de 1 mL de solución stock de 1 000 mg/L y diluir con agua ultrapura hasta un volumen final de 100 mL. Solución intermedia.
- A partir de esta solución intermedia (10 mg/L), preparar los niveles de calibración de la curva. Para ello, extraer 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 y 12.5 mL de la solución intermedia y enrasar a un volumen de 50 mL con agua ultrapura.
- Las curvas de calibración de los seis elementos contienen cinco niveles correspondientes a 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg/L (o ppm).
- Para disminuir el efecto de interferencias en la lectura de potasio, añadir buffer de ionización (0.2 % p/v) de cesio a las soluciones estándar y muestras.
- Para disminuir el efecto de interferencias en la lectura de magnesio, añadir el agente liberador de lantano (0.1 % p/v) y buffer de ionización de potasio (0.2 % p/v) a las soluciones estándar y muestras.

**Cálculos**

*Elaboración de la curva de calibración*

Realizar la curva de calibración para cada mineral evaluado. En el eje X colocar la concentración teórica de cada nivel de calibración, mientras que en el eje Y, colocar la señal obtenida de la muestra.

Ejemplo:

Curva de solución de cobre

Tabla 13  
Datos de curva de calibración para cobre

Concentración (mg/L)	Absorbancia	Ecuación	R <sup>2</sup>
0.5	0.060	Y = 0.1132x + 0.0062	0.9982
1.0	0.125		
1.5	0.175		
2.0	0.229		
2.5	0.291		

*Cuantificación del mineral*

Realizar la curva de calibración para cada mineral evaluado. En el eje X colocar la concentración teórica de cada nivel de calibración, mientras que en el eje Y colocar el valor de la señal obtenida de la muestra.

$$\text{Concentración} = \frac{([A-b/m] * V)}{(mg/100g) W * 1000}$$

Donde:

- A = Absorbancia de la muestra
- b = Constante intercepción en eje Y de la curva de calibración
- m = Pendiente de la curva de calibración
- V = Volumen a diluir la muestra en la primera dilución (10 mL)
- W = Peso de la muestra (g)

Ejemplo:

Muestra: Semilla de quinua

- A = 0.0354
- b = 0.0062
- m = 0.1132
- W = 1.0000
- V = 50 mL

$$\text{Concentración} = \frac{([0.211 - 0.0062 / 0.1132] * 50)}{1.000 * 1000} * 100$$

$$\text{Concentración 1 repetición 1 } (\mu\text{g/L}) = 1.29$$

**Observaciones**

Los valores de la curva de calibración corresponden a la información presentada en el documento.

**8.2.7. Referencias**

AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed., Vol. 2). Arlington: Association of Analytical Chemists.

CODEX ALIMENTARIUS. (2004). Direcciones generales sobre muestreo. CAC/GL 50. Roma: FAO-WHO.

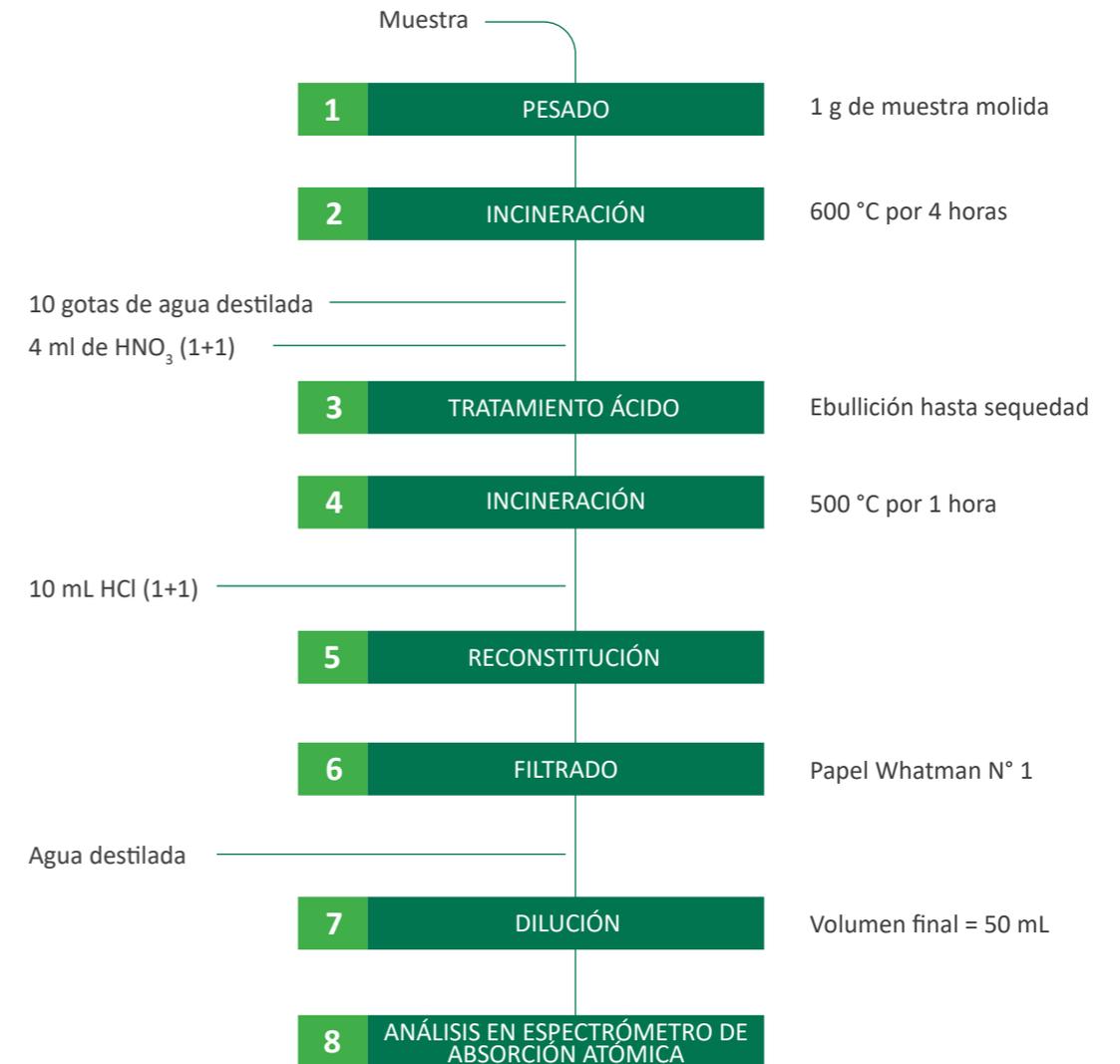
INACAL. (2014). NTP 205.062. Granos Andinos. Quinoa. Requisitos. Lima, Perú.

Nielsen, S. S. (2010). Food Analysis (4th ed.). New York: Springer Science+Business Media.

Welz, B. y Sperling, M. (1999). Atomic absorption spectrometry (3rd ed.). Weinheim: Wiley-VCH.

**Anexo**

**Anexo 8.** Diagrama de flujo del tratamiento de muestras para el análisis de minerales por absorción atómica





*Instituto Nacional de Innovación Agraria*





Av. La Molina 1981, La Molina  
(511) 240-2100 / 240-2350  
[www.inia.gob.pe](http://www.inia.gob.pe)

