

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Potencial del uso de saponinas de quinoa como agentes
tensioactivos en emulsiones de aceite esencial de menta en agua**

Diana Carolina Socasi Chalco

Ingeniera Química

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniería Química

Quito, 20 de Diciembre de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

Potencial del uso de saponinas de quinoa como agentes tensioactivos en emulsiones de aceite esencial de menta en agua

Diana Carolina Socasi Chalco

Nombre del profesor, Título académico

José F. Álvarez Barreto , Ph. D.

Quito, 20 de Diciembre de 2022

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Diana Carolina Socasi Chalco

Código: 00206571

Cédula de identidad: 1721921060

Lugar y fecha: Quito, 20 de Diciembre de 2022

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad de saponinas de quinoa como surfactantes naturales para la elaboración de emulsiones de aceite esencial de menta en agua. Se estudió el proceso de extracción de saponinas de quinoa a través de la maceración con etanol. Se utilizó un diseño de experimentos del tipo factorial para evaluar los efectos de concentración de etanol (C_{etoh} : 50- 96 %v/v), concentración de quinoa (C_{quin} : 2-10 %p/v) y tiempo de maceración (t : 24-48 h), sobre las concentración de saponinas (C_{sap}) y el rendimiento de extracción (γ_{sap}). Se encontró que C_{etoh} , C_{quin} y sus interacciones fueron estadísticamente significativas, el modelo no fue predictivo para las variables de salida. Se escogieron las condiciones de extracción a C_{etoh} : 50 %v/v, C_{quin} : 10%p/v durante 24h, para obtener las saponinas utilizadas en la preparación de las emulsiones, en las cuales se varió la concentración de saponinas en la fase acuosa y la concentración de aceite en la emulsión. Las emulsiones elaboradas se sometieron a las diferentes pruebas de estabilidad, tiempo de almacenamiento (t : 0-24 h), temperatura (20-30-50 °C), pH (3-9) y fuerza iónica (0,1-0,5 M). Se concluyó que las emulsiones de aceite esencial de menta, tienen un mayor diámetro de partícula a 24h, las gotas formadas tuvieron buena estabilidad térmica y existió separación de fases al ajustar a un pH ácido y agregar una sal.

Palabras clave: Chenopodium quinoa, saponinas, tensioactivos, emulsiones aceites esenciales.

ABSTRACT

The aim of this work is to evaluate the capacity of quinoa saponins as natural surfactants for the production of emulsions of mint essential oil in water. The extraction process of quinoa saponins through ethanol maceration was studied. A factorial design of experiments was used to evaluate the effects of ethanol concentration (Cetoh: 50-96% v/v), quinoa concentration (Cquin: 2-10% w/v) and maceration time (t: 24-48 h), on the concentration of saponins (Csap) and the extraction yield (γ_{sap}). It was found that Cetoh, Cquin and their interactions were statistically significant, the model was not predictive for the output variables. The extraction conditions were chosen at Cetoh: 50% v/v, Cquin: 10% w/v for 24h, to obtain the saponins used in the preparation of the emulsions, in which the concentration of saponins in the aqueous phase was varied, and the concentration of oil in the emulsion. The elaborated emulsions were subjected to different stability tests, storage time (t: 0-24 h), temperature (20-30-50 °C), pH (3-9) and ionic strength (0.1-0,5M). It was concluded that the mint essential oil emulsions have a larger particle diameter at 24h, the drops formed had good thermal stability and there was a phase separation when adjusting to an acidic pH and adding a salt.

Key words: Chenopodium quinoa, saponins, surfactants, emulsions, essential oils.

TABLA DE CONTENIDO

1.INTRODUCCIÓN.....	10
2.METODOLOGÍA.....	13
2.1 Extracción de saponinas.....	13
2.2 Diseño de experimentos (DOE) y preparación de extracción de saponinas.....	13
2.3 Detección y Cuantificación de saponinas	14
2.4 Validación del diseño experimental	15
2.5 Elaboración de las emulsiones	15
2.6 Estabilidad de las emulsiones	16
2.6.1 Análisis estadístico.....	17
3.RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	17
3.1 Identificación de saponinas en el medio de extracción (HPLC)	17
3.2 Efectos de las variables de extracción (Análisis del diseño experimental)	18
3.3 Validación del modelo del diseño experimental	21
3.4 Diámetro de partícula.....	21
3.5 Estabilidad de las emulsiones	23
3.5.1 Efecto del tiempo de almacenamiento.....	23
3.5.2 Efecto de la temperatura.....	25
3.5.3 Efecto del pH	27
3.5.4 Efecto de la fuerza iónica.....	29
4.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	29
5.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	30
Anexo A: Diseño de experimento	35
Anexo B: Curva de calibración	36
Anexo C: Cromatogramas del HPLC	37
Anexo D: Análisis estadísticos	38
Anexo E: Predicción de concentración y rendimiento.....	39
Anexo F: Resultados estadísticos sobre el efecto del tiempo.....	40
Anexo G: Resultados estadísticos sobre el efecto de la temperatura.....	42
Anexo H: Resultados estadísticos sobre el efecto del pH.....	43
Anexo I: Imágenes del microscopio (Fuerza iónica).....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables de entrada para la extracción de saponinas y sus niveles.....	14
Tabla 2. Condiciones seleccionadas para extractos a ser analizados para la detección de saponinas mediante HPLC	14
Tabla 3. Condiciones de experimentos para la validación del modelo generado por DOE.....	15
Tabla 4. Formulaciones de las emulsiones de aceite esencial de menta en agua	16
Tabla 5. Errores porcentuales de concentración y rendimiento del set de experimentos.....	21
Tabla 6. Concentraciones y rendimientos del modelo matemático	35
Tabla 7. Coeficientes codificados para respuesta transformada con respecto al concentración	38
Tabla 8. Coeficientes codificados para respuesta transformada con respecto al rendimiento	38
Tabla 9. Predicción del experimento N°1	39
Tabla 10. Predicción del experimento N°2	39
Tabla 11. Predicción del experimento N°3	39
Tabla 12. Análisis de varianza con respecto al efecto del tiempo	40
Tabla 13. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre el tiempo.....	40
Tabla 14. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la concentración de saponinas ...	40
Tabla 15. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la concentración de aceite.....	40
Tabla 16. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre t^*C_{sap}	41
Tabla 17. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre t^*C_{aceite}	41
Tabla 18. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre $C_{sap}^*C_{aceite}$	41
Tabla 19. Análisis de varianza con respecto al efecto de la temperatura.....	42
Tabla 20. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la temperatura	42
Tabla 21. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la concentración de saponinas ...	42
Tabla 22. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la T^*C_{sap}	43
Tabla 23. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre T^*C_{aceite}	43
Tabla 24. Análisis de varianza con respecto al efecto del pH.....	43
Tabla 25. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre el pH.....	44
Tabla 26. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la concentración de saponina.....	44
Tabla 27. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la concentración de aceite.....	44
Tabla 28. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre pH^*C_{sap}	44
Tabla 29. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre pH^*C_{aceite}	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Pareto sobre la influencia de variable de entrada sobre la concentración de saponinas	19
Figura 2. Diagrama de Pareto sobre la influencia de variables para el rendimiento de la extracción de saponinas	20
Figura 3. Imágenes microscópicas de las emulsiones.....	22
Figura 4. Efecto del tiempo en el diámetro de partícula a $t=0$ y $t=24$, a concentraciones de saponinas de a) 0,1 b) 0,5 c) 1 %v/v	24
Figura 5. Efecto de la temperatura en el diámetro de la partícula a T 20°C, 30°C y 50°C a) $C_{sap} = 0,1$ b) $C_{sap} = 0,5$ c) $C_{sap} = 1$ %v/v	26
Figura 6. . Efecto del pH en el diámetro de la partícula a pH3, pH6 y pH9 a) $C_{sap} = 0,1$ b) $C_{sap} = 0,5$ c) $C_{sap} = 1$ %v/v.....	28
Figura 7. Curva de calibración de Saponinas Método UV-VIS	36
Figura 8. Cromatogramas con respecto a) extracciones de saponinas, b) pH ácido y c) pH alcalino.....	37
Figura 9. Efecto de la fuerza iónica en emulsiones	45

1. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son mezclas complejas de terpenos y varios compuestos aromáticos extraídos, generalmente a través de vapor o hidrodestilación de las partes no leñosas de las plantas [1]. En la actualidad existen aproximadamente 300 aceites esenciales disponibles comercialmente, con aplicaciones farmacológicas, cosméticas, alimenticias, sanitarias y aromaterapéuticas, en efecto su producción y consumo mundial esta aumentando rápidamente, gracias a sus propiedades: bactericidas, virucidas, fungicidas, antioxidantes y anticancerígenas. Sin embargo, los aceites esenciales son inestables y susceptibles a la luz, el aire y la humedad [2]. Por esta razón, estos pueden ser emulsificados en una fase acuosa para evitar la oxidación, polimerización, reordenamientos térmicos, isomerización y degradación, favoreciendo a la bioaccesibilidad y estabilidad [3].

Las emulsiones son sistemas heterogéneos constituidos por, al menos, un líquido inmisible disperso (fase dispersa), en forma de gotas, en otro (fase continua)[4]. Se clasifican de acuerdo a dos criterios: por el tamaño de la partícula, microemulsiones ($d > 200\text{nm}$) y nanoemulsiones ($d < 200\text{nm}$), y por la naturaleza de la fase dispersa, aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O). Este sistema bifásico es termodinámicamente inestable, por lo que se agrega un tercer compuesto, el emulsionante, que es generalmente un agente tensioactivo, para conferirle estabilidad[5].

Los tensioactivos, también conocidos como surfactantes, son sustancias anfifílicas capaces de cambiar la tensión superficial entre dos fases. En su mayoría son sintéticos y funcionan como emulsionantes, detergentes, agentes humectantes y espumantes en diferentes industrias [6]. Es bien conocido que la mayoría de estos tensioactivos y son derivados de fuentes no renovables, como del petróleo, obteniendo así productos mucho más accesibles y

económicos en el mercado. Sin embargo, terminan siendo liberados al medio ambiente aproximadamente el 60% (en peso) [7] de los tensioactivos producidos, y estos entran en contacto con ecosistemas acuáticos, causando un impacto adverso para los microorganismos, flora y fauna. En consecuencia, cada vez más conscientes, los consumidores buscan productos naturales que tengan un reducido impacto ambiental, promoviendo el desarrollo de nuevas formulaciones para reemplazar sus homólogos sintéticos no biodegradables. Las saponinas son una alternativa natural a los surfactantes comúnmente utilizados en la industria, como detergentes naturales, agentes emulsionantes y espumantes [8].

Las saponinas son sustancias fitoquímicas pertenecientes al grupo de los glicósidos obtenidos a partir del metabolismo secundario de las plantas, que intervienen en la interacción de la planta con el medio ambiente, particularmente en mecanismos de defensa [9]. Su estructura consiste, primeramente, en un anillo terpenoide (aglicona) que tiene propiedad hidrofóbica, y una cola (glucósido) que tiene carácter hidrofílico, dando lugar a propiedades surfactantes. De acuerdo con M. Xu, Z. Wan, y X. Yang (2021), las saponinas se pueden encontrar en más de 500 especies de plantas que conforman nuestra dieta, como legumbres, raíces de ginseng, regaliz y la corteza de Quillaja, entre muchas otras [10].

Recientemente, el interés del uso de saponinas como biosurfactantes se ha centrado en extractos del árbol Quillaja [11], con extractos disponibles comercialmente. El poder tensioactivo de las saponinas de este género es similar al tween 80, un tensioactivo sintético, ya que tienen la capacidad de formar y estabilizar emulsiones de aceite en agua, reduciendo la tensión superficial entre la solución de saponinas (fase acuosa) y el aceite esencial (fase oleosa) al momento que ocurre la homogeneización de las fases a temperatura ambiente. Por ejemplo, las saponinas de Quillaja se han utilizado con éxito para formar emulsiones estables a partir de una variedad de aceites como el de aguacate [12], naranja, girasol, soja [13] y orégano [14].

No solo se ha trabajado con las saponinas extraídas de esta corteza, sino también de muchas otras plantas como *Chenopodium quinoa* [15].

La *Chenopodium quinoa*, o solamente quinoa, es un grano pseudocereal originario de las regiones Andinas de América del Sur y actualmente tiene un valor nutricional por su alto contenido de proteínas [16]. Existen variedades de quinoa que contienen altos niveles de saponinas, que además son responsables del sabor amargo del grano. Estas saponinas se encuentran principalmente en la cáscara de las semillas, en las hojas de la planta, y también, en menor proporción en sus flores y frutos. Ya a nivel industrial, para su consumo, las semillas de quinoa pasan por la eliminación de las partes ricas en saponinas, dando lugar a la generación de volúmenes considerables de residuos sólidos y exceso de consumo de agua [17]. Sin embargo, las saponinas tienen numerosas propiedades biológicas que han sido poco exploradas entre las que resalta su capacidad antimicrobiana, antioxidante, endulcorante, molusquicida y fungicida [18]. Los extractos vegetales, como las saponinas y los aceites esenciales, se utilizan mucho por sus componentes biológicamente activos, sin lugar a dudas es una interesante alternativa como insecticidas naturales.

Actualmente en el Ecuador se impulsa el desarrollo de insecticidas naturales adoptando nuevas alternativas en el sistema agrícola sin producir efectos adversos sobre el medio ambiente. Bajo estos antecedentes, el presente trabajo de investigación contribuirá a mejorar el manejo de subproductos que se obtienen como resultado del lavado de la quinoa y aplicarlos en la fabricación de nuevos productos, como las emulsiones de aceite esencial de menta en agua. Se trabajó con este tipo de aceite, porque ya se han realizado pruebas para repeler las moscas mediante la impregnación y microencapsulación que se aplica a las plantaciones [19]. Además, favorece la biodisponibilidad por largos períodos de tiempo [20], teniendo un mayor rendimiento del cultivo y evitando pérdidas económicas.

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar la capacidad de saponinas de quinoa como surfactantes naturales para la elaboración de emulsiones de aceite esencial de menta en agua. Para ello, se planteó determinar las condiciones óptimas en la extracción de saponinas de quinoa, para luego evaluar los diferentes variables en la fabricación de las emulsiones de aceite esencial de menta en agua por medio de saponinas, y finalmente estudiar la estabilidad de las emulsiones en diferentes condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica.

2. METOLOGÍA

2.1 Extracción de saponinas

La cascarilla de quinoa fue donada por la empresa Proquinoa S.A. (Ibarra-Ecuador). Se utilizó la técnica de extracción por maceración con etanol [21]. En esta extracción sólido-líquido, se trabajó con una masa determinada de cascarilla de quinoa, la cual se suspendió en un volumen de una solución de etanol a una concentración definida. La mezcla se homogeneizó bajo agitación magnética moderada por un tiempo predeterminado. Luego, la mezcla se filtró, y el extracto se concentró en un rotavapor a 60°C durante 30 minutos. El concentrado se conservó a -20°C.

2.2 Diseño de experimentos (DOE) y preparación de extracción de saponinas

Se desarrolló el diseño de experimentos (DOE) de tipo factorial [22] utilizando el software Minitab, para poder determinar los efectos de las variables de entrada tiempo de maceración (t), concentración de la cascarilla de quinoa (Cquin) y concentración de etanol (Cetoh), sobre las variables de salida: concentración de saponinas y rendimiento de extracción. Como resultado del DOE se obtuvo un modelo de 20 experimentos aleatorios (Anexo A),

tomando en cuenta los niveles de las variables de entrada especificados en la *Tabla 1*, definidos a partir de los ensayos previos de extracción de saponinas.

Tabla 1. Variables de entrada para la extracción de saponinas y sus niveles

Variables	Niveles	
	- α	+ α
Cetoh (% v/v)	50	96
Cquin (%p/v)	2	10
t (h)	24	72

2.3 Detección y Cuantificación de saponinas

Utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), se ha podido identificar la presencia de saponinas en diferentes extractos [23]. Se analizaron cinco extractos de las 20 corridas del diseño experimental seleccionados aleatoriamente (Tabla 2). Para identificar la presencia de saponinas, las muestras fueron corridas con UltiMate 3000, empleando como fase estacionaria columna C18 y como fase móvil una mezcla de metanol y agua. Se trabajó a un flujo 0,8 mL/min y se midió la absorbancia a 276 (nm) [24].

Tabla 2. Condiciones seleccionadas para extractos a ser analizados para la detección de saponinas mediante HPLC

N° de Experimentos	Cetoh (% v/v)	Cquin (% p/v)	t (h)
2	96	2	24
7	50	10	24
11	73	6	48
15	96	2	24
18	96	10	72

Por otro lado, para la cuantificación de saponinas, se procuró un método más sencillo y rápido, validado previamente por HPLC. En este caso, se utilizó la espectrometría UV-Vis en un rango de 200- 500 nm [25]. Se preparon soluciones patrón con concentraciones conocidas de saponinas de Quillaja (Sigma, CAS: 8047-15-2). Luego de un barrido previo, se encontró una señal máxima a los 276 nm, y esta longitud de onda se utilizó para realizar la curva de calibración (Anexo B) y sus siguientes determinaciones. Esta longitud de onda fue además corroborada para extractos de saponinas de quinoa.

2.4 Validación del diseño experimental

Se realizó la validación del modelo por medio de la predicción de resultados [26] de la concentración y el rendimiento de saponinas a partir de nuevas extracciones aleatorias generadas del modelo en Minitab (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones de experimentos para la validación del modelo generado por DOE

N° de Experimentos	Cetoh (% v/v)	Cquin (% p/v)	t (h)
1	60	7	24
2	80	4	24
3	70	8	24

2.5 Elaboración de las emulsiones

Se prepararon las emulsiones de aceite en agua , variando la concentración del aceite esencial de menta [Caceite] y la concentración de saponinas [Csap], como se detalla en la Tabla 4. Para esto, se diluyeron las saponinas en agua a una concentración determinada y a esta se añadió el aceite a una concentración establecida. Ambas fases se homogeneizaron a través de un homogeneizador de alta presión de dos etapas durante 1 minuto a 2000-2500 rpm [27].

Tabla 4. Formulaciones de las emulsiones de aceite esencial de menta en agua

N° de emulsión	Caceite (% v/v)	Csap (% v/v)
E 1.1	0,5	0,1
E 2.1	1	
E 3.1	1,5	
E 1.2	0,5	0,5
E 2.2	1	
E 3.2	1,5	
E 1.3	0,5	1
E 2.3	1	
E 3.3	1,5	

2.6 Estabilidad de las emulsiones

Se estudió la estabilidad de las emulsiones bajo el impacto de una serie de condiciones de almacenamiento como el tiempo, la temperatura, el pH y la fuerza iónica [28]. Con ayuda del microscopio Leica MC 120 HD y programa Leica Application Suite con magnificación 40X se tomaron imágenes de las gotas [29] y se midió el tamaño de gota con Image J para caracterizar las emulsiones.

Tiempo: las emulsiones elaboradas inmediatamente pasaron al microscopio, tomando imágenes de las gotas de la emulsión en tiempo inicial (t_0) y después de 24h (t_{24}).

Temperatura: se incubó 1mL cada emulsión en un baño maría a dos temperaturas diferentes, 30°C y 50°C durante 30 minutos, se llevaron a temperatura ambiente. El análisis de tamaño de gotas se llevó a cabo después de 24h.

pH: las emulsiones se colocaron en vasos de precipitación, y se ajustó el pH a 3 y 9. Se mantuvieron en refrigeración, 4°C, durante 24 h, para posteriormente analizar el tamaño de gotas.

Fuerza iónica: se modificó la fuerza iónica de las emulsiones incorporandi NaCl a 0,1y 0,5 M. Después de 24h, se analizó el tamaño de gotas.

2.6.1 Análisis estadístico

Para el tamaño de partículas se reportó el promedio \pm desviación estándar, de entre 10 y 3600 mediciones tomadas de las emulsiones. Los efecto significativos se determinaron mediante un Análisis de Varianza, ANOVA, de dos vías, y diferencias fueron determinadas mediante la ccomparación de pares por Tukey, con un 95% de confianza ($p < 0.05$) [30].

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Identificación de saponinas en el medio de extracción (HPLC)

En el Anexo C, la figura 8a se presentan 5 perfiles cromatográficos correspondientes a diferentes extracciones de saponinas, entre ellos no hay una diferencia notable, ya que decrecen al inicio, luego ascienden hasta llegar al pico y de nuevo decrecen. Los tiempos de retención de las saponinas fueron entre 1.41 y 2.12 (min). Se indentifica que el Exp N°7 tiene el pico más alto a 0,58 (mAU) en 1.60 (min) y el más bajo es el Exp N°15 a 0,26 (mAU) en 1.98, todas las observaciones se realizaron en un intervalo de 0 a 3 (min). Por otro lado, en la figura 8b y 8c, se evaluó la resintencia de las saponinas en las emulsiones a diferentes pH, en la figura 8b la emulsión se encuentra a un pH ácido (pH 3) este perfil permanece constante al incio, decrece por un corto período de tiempo, luego asciende llegando al pico a 2,67 (mAU) su tiempo de retención es 2.05 (min) y de nuevo decrece. Sin embargo, en la figura 8c se trabajó con una emulsión a un pH alcalino (pH 9) se observa que la cromatografía no asciende permanece constante hasta ascender y alcanzar el pico a 3,49 (mAU) con tiempo de retención 2.09 (min).

De acuerdo con Diniz et al (2012), las saponinas se detectan en tiempo de retención entre 9.42 y 16.78 (min) [31], a diferencia de la Figura 8a , 8b y 8c , los tiempos de retención 1.41 y 2.12 (min). A falta de referencia no podemos asociar directamente los picos con las saponinas, ya que los picos que están entre 1,5 y 4 (min), corresponden a compuestos polares como fenoles y los compuestos menos polares como carbohidratos tienen los picos entre 14 a 20 (min), por lo que se concluyó que esos picos no corresponden a las saponinas [32]. Con respecto, al cambio brusco de pH a valores muy ácidos o muy básicos provoca la ruptura de enlaces O-glucosídicos parte anfifílica de las saponinas [17], a un pH 3 y pH 9 aún existe saponinas como se ve en la Figura 8b y 8c, esto concuerda con la literatura [33] en donde recalcan que las saponinas pueden descomponerse en monodesmosidos a valores de $\text{pH} < 3$.

3.2 Efectos de las variables de extracción (Análisis del diseño experimental)

Se obtuvo el modelo matemático (Ec.1) que describe el efecto que tienen las variables de entrada (Cetoh, Cquin y t) sobre la concentración de las saponinas, con un R^2 del 96,31% y un nivel de confianza del 95%. Tomando en cuenta el análisis estadístico de los coeficientes codificados que se encuentran detallados en la Tabla 7 (Anexo D),

$$\begin{aligned} & \text{Concentración} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] \\ & = 9,10 - 0,0886 \text{ Cetoh} + 2,715 \text{ Cquin} + 0,043 \text{ t} - 0,02489 \text{ Cetoh} * \text{Cquin} - 0,00054 \text{ Cetoh} \\ & * \text{t} - 0,0110 \text{ Cquin} * \text{t} + 0,000179 \text{ Cetoh} * \text{Cquin} * \text{t} - 0,156 \text{ Pt Ctral} \quad (\text{Ec. 1}) \end{aligned}$$

La figura 1, muestra un diagrama de Pareto en donde se observa los efectos estandarizados de Cetoh (A), Cquin (B), t (C) y sus interacciones (AB, ABC, AC y BC). Con la línea roja como referencia, las barras que la sobrepasan tienen un efecto significativo en la concentración de saponinas, siendo la concentración de etanol (A) la variable con mayor efecto, seguida de la concentración de quinoa B y la interacción entre estas dos AB.

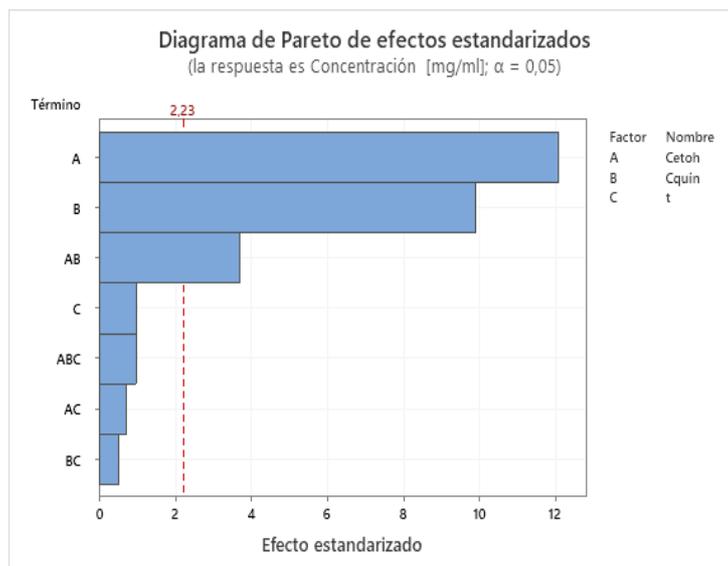


Figura 1. Diagrama de Pareto sobre la influencia de variable de entrada sobre la concentración de saponinas

Con respecto al rendimiento de las saponinas, de igual manera se obtuvo los coeficientes codificados que están detallados en la Tabla 8 (Anexo D), con un R^2 del 95,90% y un nivel de confianza del 95%, demostrando así la validez del modeo (Ec.2).

Rendimiento

$$\begin{aligned}
 = & 0,3637 - 0,003481 \text{ Cetoh} - 0,01845 \text{ Cquin} + 0,00100 t + 0,000181 \text{ Cetoh} * \text{Cquin} \\
 - & 0,000009 \text{ Cetoh} * t - 0,000130 \text{ Cquin} * t + 0,000002 \text{ Cetoh} * \text{Cquin} * t \\
 - & 0,01677 \text{ Pt Ctral} \quad (\text{Ec. 2})
 \end{aligned}$$

En la figura 2, se observa que la concentración de etanol (A) supera el efecto de la concentración de quinoa (B) y su interacción (AB), siendo tres estadísticamente significativos porque sobrepasan la línea de referencia. Por otro lado, el tiempo (C) y las interacciones (ABC, AC y BC), no son estadísticamente significativos.

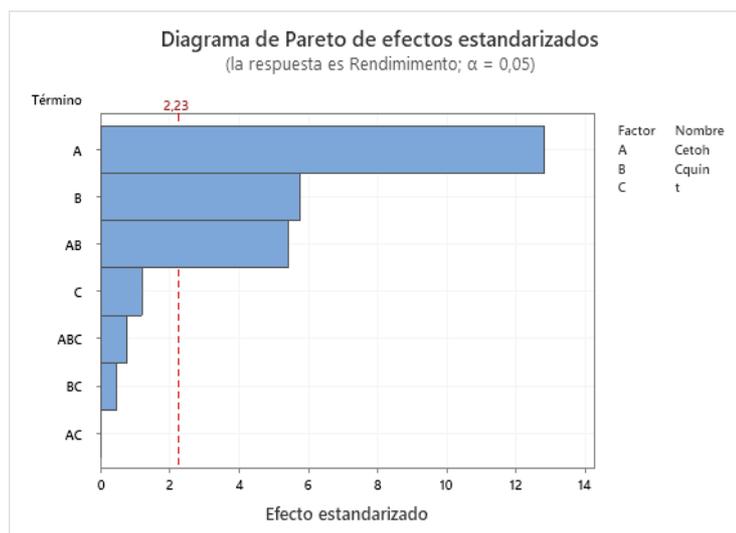


Figura 2. Diagrama de Pareto sobre la influencia de variables para el rendimiento de la extracción de saponinas

El efecto de la Cetoh en la extracción de saponinas se debe a que, en comparación con otra metodología se ha demostrado que el uso de los disolventes con alta polaridad (etanol y metanol) contribuyen a una mayor eficiencia en la extracción a temperatura ambiente evitando la degradación de la molécula [34]. Por otro lado, el efecto de la Cquin depende de la cantidad de saponinas en la cascarilla de la quinoa que contiene 0.14 – 2.3 % de estos tensioactivos [35], un contenido muy bajo que puede verse afectado por factores genéticos, agronómicos y ambientales. También, se debe tomar en cuenta la relación p:v, pues el aumento de la relación agua a sólido aumenta la difusividad del solvente en las células, y en consecuencia mejora la desorción de las saponinas[36]. El tiempo es la única variable de entrada que no tiene influencia en la extracción de saponinas de quinoa, pero ocurre todo lo contrario, al usar tiempos de extracción cortos como 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 (h), esto se corrobora con el trabajo de Hu et al (2018), en donde el tiempo si tiene efecto sobre la concentración y el rendimiento de saponinas de *Panax notoginseng* [37]. Se concluyó, que a menor concentración de

etanol mayor rendimiento y concentración. Por otro lado, a mayor concentración de quinoa mayor rendimiento pero menor concentración.

3.3 Validación del modelo del diseño experimental

Se calculó el error porcentual entre los resultados de rendimiento y concentración que se obtuvo de la predicción de Minitab (Anexo E) con respecto a los obtenidos experimentalmente (Tabla 5). Los errores porcentuales de la concentración de saponinas son menores al 15% , mientras que aquellos correspondientes al rendimiento superan al 30%.

Tabla 5. Errores porcentuales de concentración y rendimiento del set de experimentos

N°Ex P	Cetoh (% v/v)	Cquin (% p/v)	t (h)	Abs promedio	Concentración (mg/ml)	Rendimiento	Error porcentual (%) Concentración	Error porcentual (%) Rendimiento
1	60	7	24	0,187	10,96	0,157	14,73	32,25
2	80	4	24	0,068	4,844	0,112	8,250	33,41
3	70	8	24	0,193	11,31	0,136	1,683	42,56

El modelo puede ser usado para predecir las concentraciones de saponinas bajo ciertas condiciones de extracción , pero no aplica para todo el rango evaluado de las variables, mientras que para el rendimiento, simplemente, no funciona.

3.4 Diámetro de partícula

Uno de los métodos para evaluar el proceso de emulsificación consiste en la determinación del diámetro de partícula [38]. Las partículas se midieron a través de microscopía y el programa ImageJ. La Figura 3 muestra imágenes de algunas de las mediciones realizadas a las emulsiones.

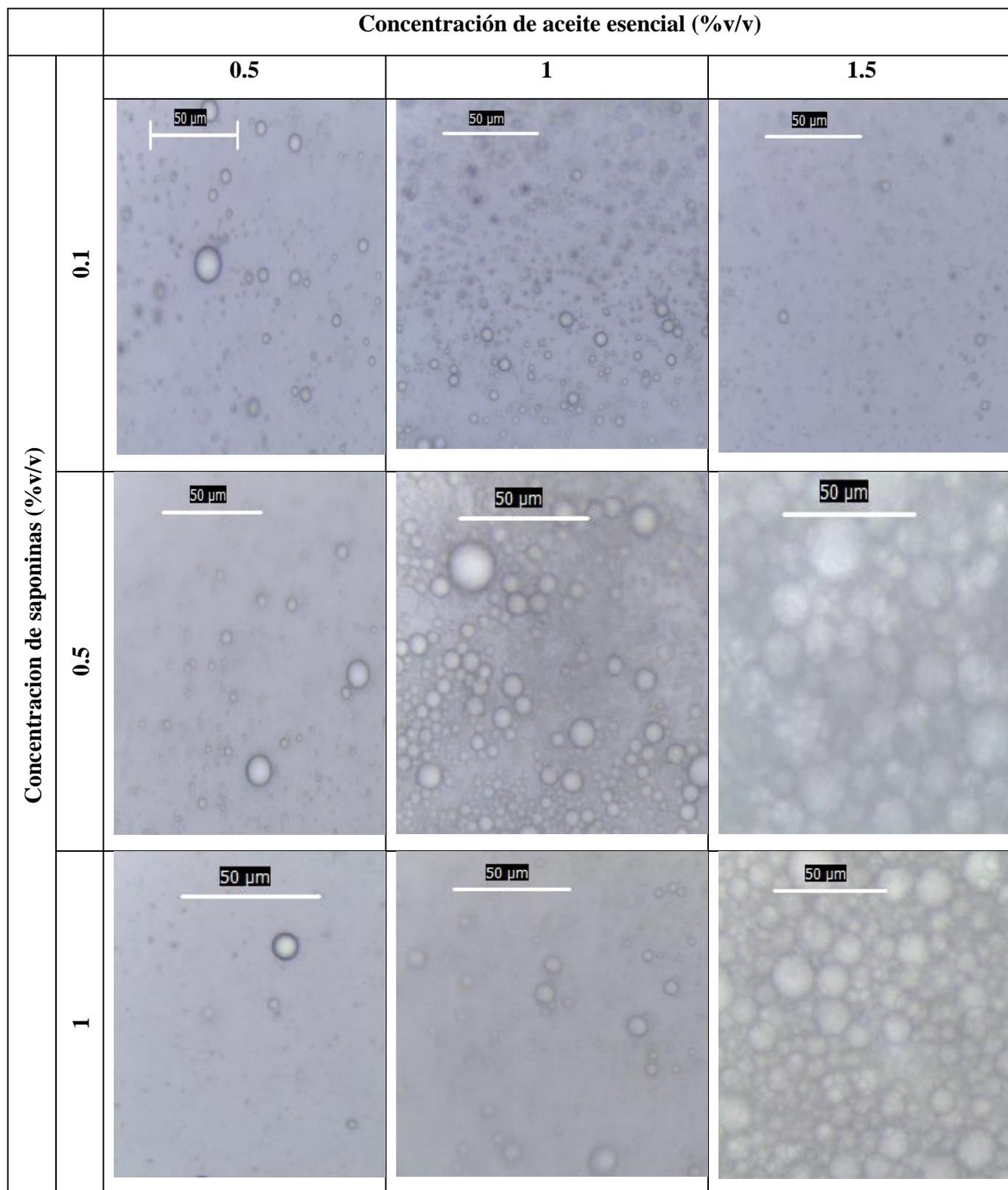


Figura 3. Imágenes microscópicas de las emulsiones

3.5 Estabilidad de las emulsiones

3.5.1 Efecto del tiempo de almacenamiento

En la figura 4, se representan los diámetros de partícula del aceite emulsificado en agua en función de la concentración de aceite esencial y saponinas, un periodo inicial y de 24h. Con base en el ANOVA (Anexo F, Tabla 12), se determinó que las variables t, Caceite y Csap son estadísticamente significativas ($p < 0,05$) sobre el diámetro (ϕ), al igual que sus interacciones. El efecto del tiempo (Tabla 3), indica que a 24h, el diámetro es mayor al inicial, con valores medios de $\phi_{24} = 3,63 \pm 2,63 (\mu m)$ y $\phi_o = 2,29 \pm 1,69(\mu m)$. La concentración de saponinas tiene una relación directamente proporcional con el diámetro (Tabla 14): así que a mayor concentración analizada, Csap= 1 %v/v, igualmente tiene un mayor diámetro promedio. En cuanto a la concentración de aceite esencial (Tabla 15), al aumentar la fase oleosa dentro de las emulsiones se produjo un diámetro de partículas mayores $\phi_{1.5} = 3,91 \pm 3,28 (\mu m)$, y menores $\phi_1 = 2,48 \pm 1,67 (\mu m)$, es decir, que no es proporcional. Con respecto a las interacciones t*Csap (Tabla 16), T*Caceite (Tabla 17) y Csap*Caceite(Tabla 18), no cumplen con lo estipulado de manera general, ya que existen agrupaciones estadísticamente iguales.

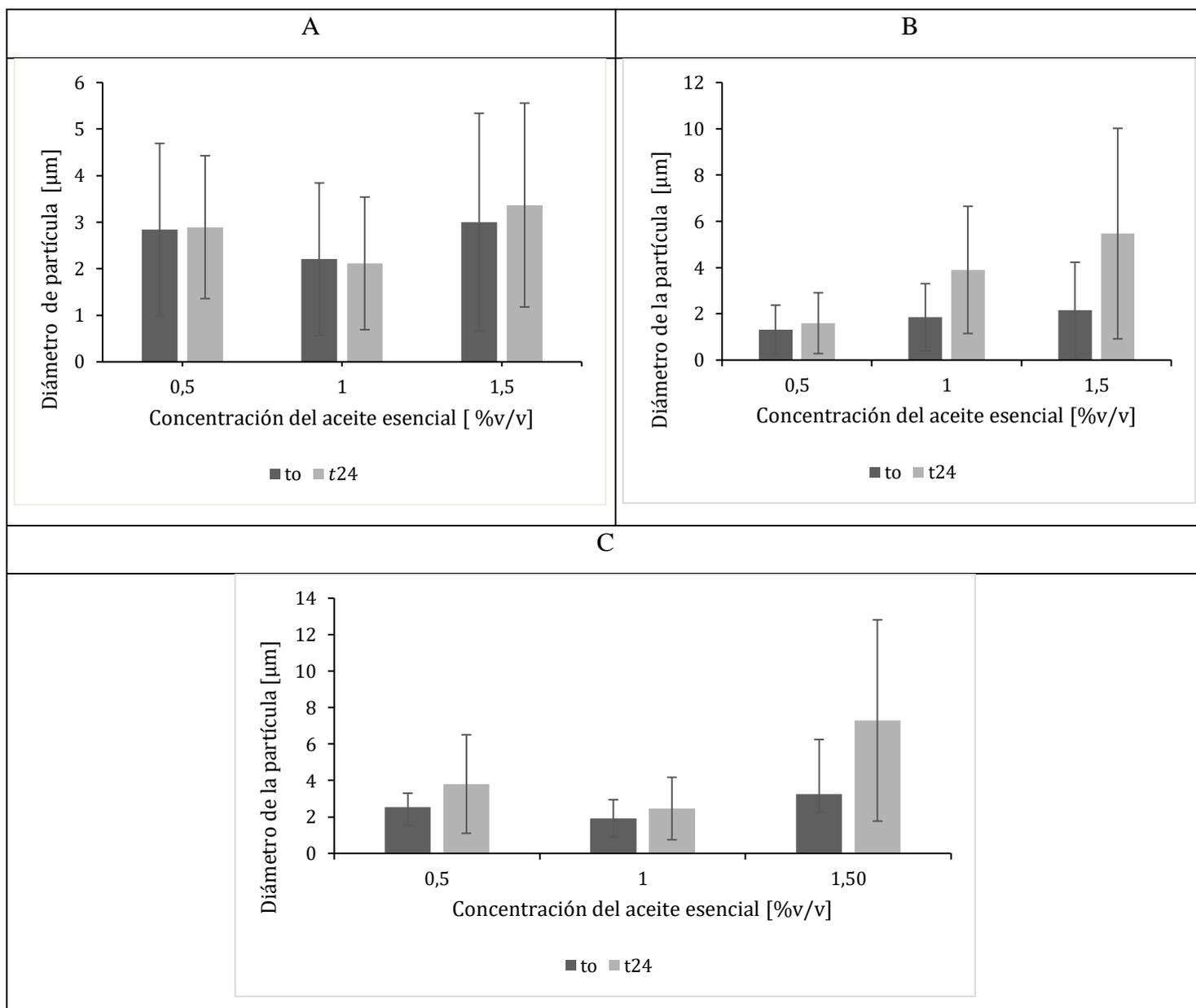


Figura 4. Efecto del tiempo en el diámetro de partícula a $t=0$ y $t=24$, a concentraciones de saponinas de a) 0,1 b) 0,5 c) 1 %v/v

Después de 24h, las emulsiones son estables, y el diámetro de la partícula aumenta. De acuerdo con Kori et al (2021), ocurre lo mismo con las partículas durante el almacenamiento, a diferencia de que se emplea tensioactivos sintéticos como CMC, Tween 20, WP y WP-MD [39]. Este fenómeno se lo conoce como maduración de Ostwald [40], al pasar el tiempo de almacenamiento las gotas grandes crecen, ya que se consumen gotas más pequeñas, esto se

debe a la difusión de las moléculas de aceite hacia las gotas más grandes a través de la fase acuosa[41] . Como se había mencionado con anterioridad, las interacciones de las variables son estadísticamente iguales por lo que se asume que existe una curvatura, y más no una relación lineal.

3.5.2 Efecto de la temperatura

En la figura 5 , los diagramas presentan el efecto de la temperatura en el diámetro de partícula de las diferentes emulsiones. Con el ANOVA (Aenxo G, Tabla 19) , se determinó que las variables T, Csap y sus interacciones (T*Csap, T*Caceite y Csap* Caceite) son estadísticamente significativas ($p < 0,05$) sobre el diámetro (ϕ), pero no es significativa la Caceite ($p > 0,05$) de manera individual. El efecto de la la temperatura (Tabla 20) no es directamente proporcional, puesto que a 30° tiene un mayor diámetro $\phi_{30} = 4,91 \pm 2,34 (\mu m)$ mientras que a 20°C y 50°C tienen diámetros estadísticamente iguales. Con respecto, a la interacción entre la T y la concentración de saponinas (Tabla 22), no se cumple una relación lineal, porque hay una excepción, a 50°C y Csap= 0.5 % v/v el diámetro de la partícula es mayor $\phi_{50,0,5} = 5.48 \pm 3,10 (\mu m)$ al de 30°C $\phi_{30,0,5} = 5.17 \pm 0,86(\mu m)$. Finalmente, la interacción entre la T y la concentración de aceite (Tabla 23), se demuestra que en dos ocasiones a 30°C va a tener un diámetro mayor.

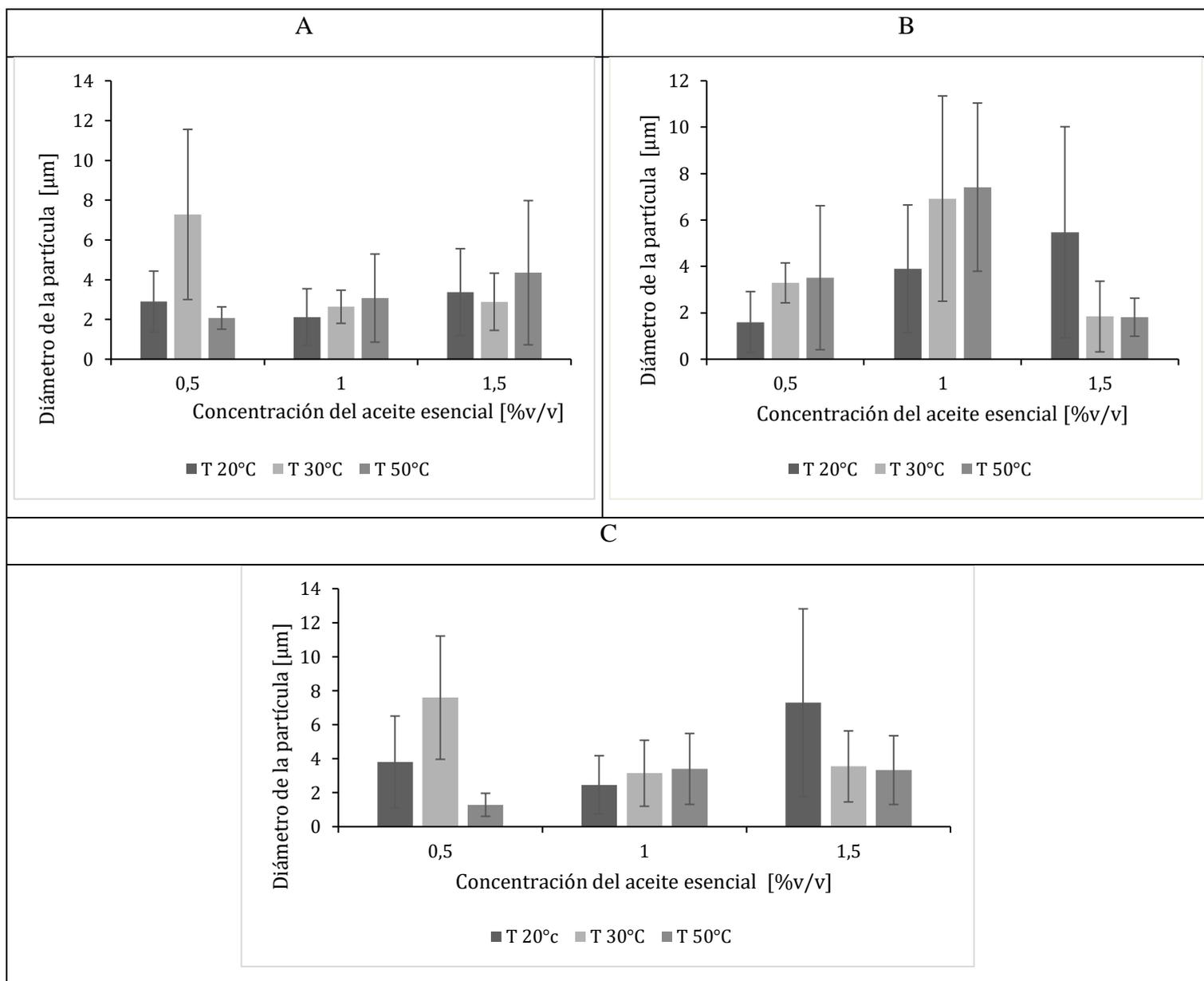


Figura 5. Efecto de la temperatura en el diámetro de la partícula a $T_{20^\circ\text{C}}$, 30°C y 50°C a) $C_{\text{sap}} = 0,1$ b) $C_{\text{sap}} = 0,5$ c) $C_{\text{sap}} = 1$ %v/v

De acuerdo con Sotomayor et al (2022), al evaluar el efecto de la temperatura se observó un aumento del tamaño de partícula [42] que ocurre especialmente en emulsiones preparadas con saponinas debido al movimiento browniano de las partículas, por ejemplo esto pasa solo a T_{30} . Mientras que las emulsiones a T_{20} y T_{50} se mantuvieron estables debido a que la repulsión estérica y electrostática que existe entre las gotas es alta evitando la agregación

de gotas a estas temperaturas. Después de todas las pruebas térmicas, no se forma ninguna crema en las muestras y se confirma que la relación del diámetro de partícula con la temperatura no es lineal [43].

3.4.3 Efecto del pH

En la figura 6(a, b y c), se representa el efecto del pH en el diámetro de partícula de las diferentes emulsiones, para tener un mejor análisis se empleó ANOVA (Anexo H, Tabla 24), se determinó que las variables pH, Caeite y Csap son estadísticamente significativas ($p < 0,05$) sobre el diámetro (ϕ) al igual que sus interacciones. El efecto del pH (Tabla 25), indica que existe un mayor diámetro de partícula al estar a un pH 6, con el que normalmente se trabaja. Ocurre todo lo contrario, a un pH básico en donde el tamaño de partícula es pequeño, $\phi_9 = 0,95 \pm 3,25[\mu m]$. La primera interacción es el pH y la concentración de saponinas (Tabla 28) cumple con la regla general, que a pH 6 el diámetro es mayor $\phi_{6,1} = 14,78 \pm 3,31 (\mu m)$, en comparación con los demás diámetros de partícula a pH 3 y 9, $\phi_{3,1} = 11,59 \pm 2,17 (\mu m)$ y $\phi_{9,1} = 3,20 \pm 3,28 (\mu m)$. Con respecto, a la segunda interacción entre el pH y la concentración de aceite esencial, existen excepciones que a pH 3, 6 y 9, tienen diámetros estadísticamente iguales, es decir, ambas variables no tienen una relación lineal.

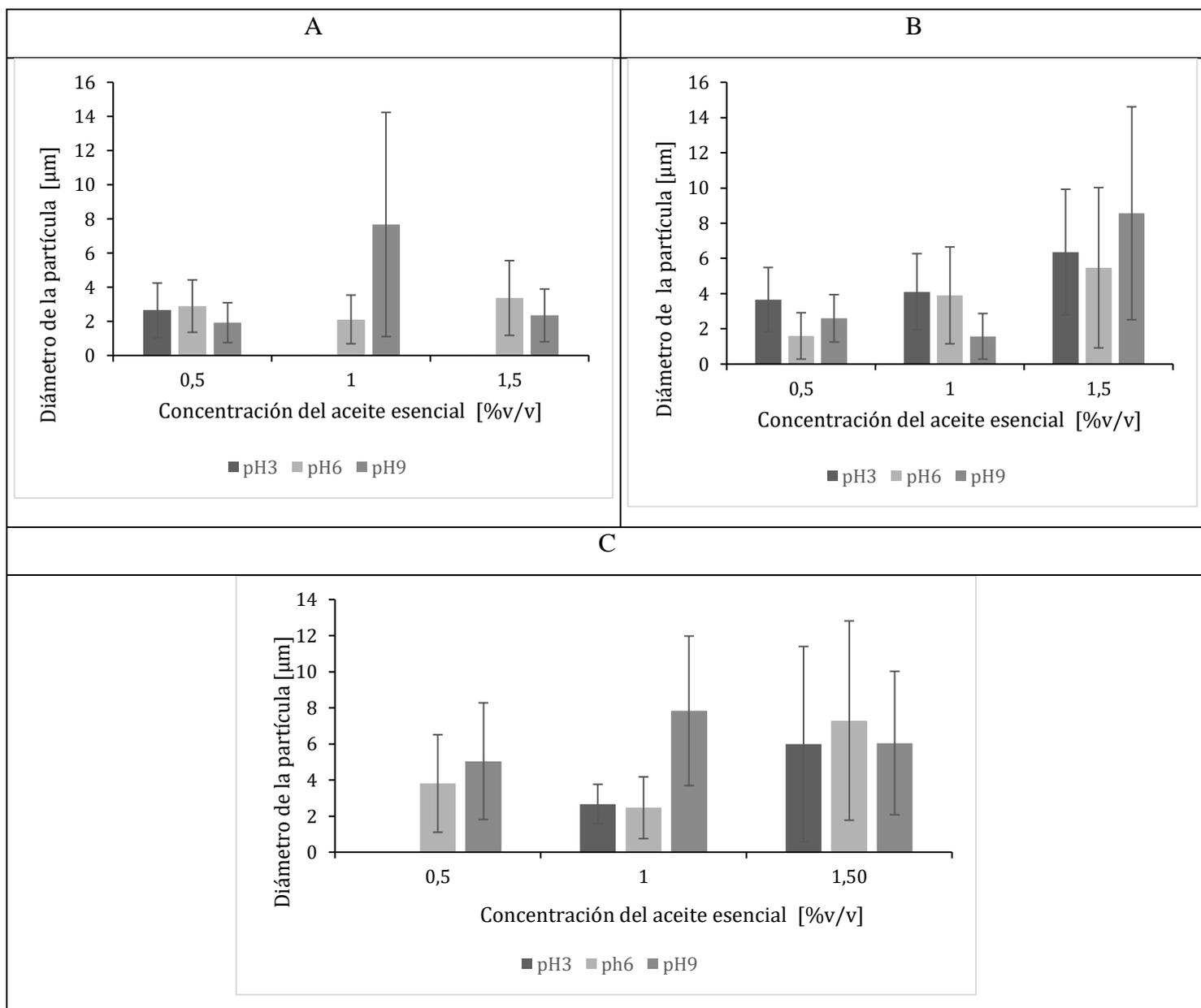


Figura 6. Efecto del pH en el diámetro de la partícula a pH3, pH6 y pH9 a) $C_{sap} = 0,1$ b) $C_{sap} = 0,5$ c) $C_{sap} = 1$ %v/v

A partir de las mediciones, se determinó que el pH 6 es la medida estándar que se encuentran las saponinas y con las que se trabajó las emulsiones, por lo que es evidente que el tamaño de partícula sea estable antes de tener un cambio brusco en de pH. Por ejemplo, a un pH3 se observó una capa cremosa y otra aceitosa después del almacenamiento porque las emulsiones no son estables. Sin embargo, a pesar de la separación de fases tiene un diámetro

grande, esto también ocurre con los ramnolípidos [44], lo que indica que se produjo la coalescencia de las gotas porque la repulsión electrostática no es fuerte para superar cualquier interacción atractiva. A un pH 9, no existe separación de fases por lo que se esperaba que el diámetro de partícula sea mayor pero las gotas tienen un diámetro relativamente pequeñas [45], estas gotas recubiertas de ramnolípidos tienen mayor estabilidad.

3.4.4 Efecto de la fuerza iónica

En base al Anexo I (Figura 9) se observa que no existe partículas para poder realizar las mediciones del diámetro, en ambas concentraciones de NaCl se hizo visibles la separación de fases, observándose una capa de aceite amarillento y también una capa de crema blanca, esto mismo ocurrió en sistemas que empleaban lecitina y Quillaja [43], en donde se generó una fuerte repulsión estérica de corto alcance que impide que las gotas no se acerquen lo suficiente para unirse y sea propenso para la ruptura.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las saponinas extraídas de la cascarilla de quinoa, tienen la suficiente capacidad tensioactiva para formar y estabilizar emulsiones de aceite esencial de menta en agua. Además, se estudió los efectos de diferentes variables de extracción con etanol (Cetoh, Cquin y tiempo de maceración) sobre la concentración y el rendimiento de las saponinas. Se encontró que el DOE de tipo factorial para Cetoh y Cquin son estadísticamente significativas. Las condiciones óptimas de extracción fueron las siguientes: una concentración de etanol del 50% y una concentración de quinoa del 10% , bajo estas condiciones se obtuvo una concentración alrededor del 21,25 (mg/mL) y un rendimiento del 17,42%. Por otro lado, la elaboración de las emulsiones de aceite esencial de menta en agua, se realizaron con éxito, al igual que sus pruebas de estabilidad. Se concluyó de manera general, primero que a 24h

de almacenamiento se tiene un diámetro mayor, segundo las gotas formadas tienen buena estabilidad térmica, tercero a un pH ácido existe separación de fases y pH básico el tamaño de partícula es menor y finalmente, las emulsiones expuestas al contacto de una sal, no hubo evidencia de formación de partículas. Se recomienda utilizar otras fuentes de quinoa que tienen un mayor contenido de saponinas de tal forma que se obtenga una mayor concentración y rendimiento, siendo así que este proceso de laboratorio se pueda implementar a nivel industrial, ya que las saponinas sí tienen un potencial que no es aprovechado, como mencione con anterioridad mi producto son las emulsiones de aceite esencial en agua, que tienen muchas aplicaciones pero no se ha explorado su uso como bioinsecticidas amigables con el medio ambiente.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. R. Batish, H. P. Singh, R. K. Kohli, and S. Kaur, "Eucalyptus essential oil as a natural pesticide," *For Ecol Manage*, vol. 256, no. 12, pp. 2166–2174, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.foreco.2008.08.008.
- [2] Y. Fu *et al.*, "ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CLOVE AND ROSEMARY OILS 989 Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination," *Phytother. Res*, vol. 21, pp. 989–994, 2007, doi: 10.1002/ptr.
- [3] H. Majeed *et al.*, "Essential oil encapsulations: uses, procedures, and trends," *RSC Adv*, vol. 5, no. 72, pp. 58449–58463, 2015, doi: 10.1039/c5ra06556a.
- [4] M. Bendjaballah, J. P. Canselier, and R. Oumeddour, "Optimization of oil-in-water emulsion stability: Experimental design, multiple light scattering, and acoustic attenuation spectroscopy," *J Dispers Sci Technol*, vol. 31, no. 9, pp. 1260–1272, 2010, doi: 10.1080/01932690903224888.
- [5] B. A. Khan *et al.*, "Basics of pharmaceutical emulsions: A review," *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 5, no. 25, pp. 2715–2725, Dec. 30, 2011. doi: 10.5897/AJPP11.698.
- [6] N. Alwadani and P. Fatehi, "Synthetic and lignin-based surfactants: Challenges and opportunities," *Carbon Resources Conversion*, vol. 1, no. 2. KeAi Publishing Communications Ltd., pp. 126–138, Aug. 01, 2018. doi: 10.1016/j.crcon.2018.07.006.

- [7] P. Johnson, A. Trybala, V. Starov, and V. J. Pinfield, "Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 288. Elsevier B.V., Feb. 01, 2021. doi: 10.1016/j.cis.2020.102340.
- [8] D. Kregiel *et al.*, "Saponin-Based, Biological-Active Surfactants from Plants," in *Application and Characterization of Surfactants*, InTech, 2017. doi: 10.5772/68062.
- [9] A. Ávalos García Elena Pérez-Urria Carril, "Metabolismo secundario de plantas," *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, vol. 2, no. 3, pp. 119–145, 2009.
- [10] M. Xu, Z. Wan, and X. Yang, "Recent advances and applications of plant-based bioactive saponins in colloidal multiphase food systems," *Molecules*, vol. 26, no. 19. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/molecules26196075.
- [11] Z. Zhu, Y. Wen, J. Yi, Y. Cao, F. Liu, and D. J. McClements, "Comparison of natural and synthetic surfactants at forming and stabilizing nanoemulsions: Tea saponin, Quillaja saponin, and Tween 80," *J Colloid Interface Sci*, vol. 536, pp. 80–87, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.jcis.2018.10.024.
- [12] N. A. Riquelme Hinojosa and C. A. Arancibia Aguilar, "Obtención de nanoemulsiones utilizando saponinas de quillay como sustituto de un surfactante sintético," *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, vol. 12, no. 23, p. 1, Apr. 2019, doi: 10.22201/ceiich.24485691e.2019.23.67654.
- [13] S. M. Dahlawi, W. Nazir, R. Iqbal, W. Asghar, and N. Khalid, "Formulation and characterization of oil-in-water nanoemulsions stabilized by crude saponins isolated from onion skin waste," *RSC Adv*, vol. 10, no. 65, pp. 39700–39707, Oct. 2020, doi: 10.1039/d0ra07756a.
- [14] A. Sedaghat Doost, F. Devlieghere, A. Dirckx, and P. van der Meeren, "Fabrication of *Origanum compactum* essential oil nanoemulsions stabilized using Quillaja Saponin biosurfactant," *J Food Process Preserv*, vol. 42, no. 7, Jul. 2018, doi: 10.1111/jfpp.13668.
- [15] W. M. Arango and C. Pelaez, "Immune response in human tuberculosis View project POTENTIAL ANTIOXIDANT AND ANTIHYPERTENSIVE USE OF BIOACTIVE PEPTIDES OBTAINED FROM PROTEIN HYDROLYSATES OF CHACHAFRUIT (*Erythrina edulis*) WITH ULTRASOUND PRETREATMENT View project." [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/262519153>
- [16] M. J. Koziol' Latinreco, "Chemical Composition and Nutritional Evaluation of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)," 1992.
- [17] A. Ahumada, A. Ortega, D. Chito, and R. Benítez, "Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico," *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, vol. 45, no. 3, pp. 438–469, Sep. 2016, doi: 10.15446/rcciquifa.v45n3.62043.
- [18] S. Rai, E. A. Siwakoti, A. Kafle, H. P. Devkota, and A. Bhattarai, "Plant-derived Saponins: A Review of their Surfactant Properties and Applications," 2021, doi: 10.20944/preprints202108.0152.v1.
- [19] "UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS APLICADAS CARRERA DE INGENIERÍA TEXTIL TRABAJO DE GRADO PREVIO A LA

OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO TEXTIL TEMA: EXTRACCIÓN Y UTILIZACIÓN DEL ACEITE DE MENTA (MENTHA PIPERITA) Y ANALISIS DE REPELENCIA EN LAS MOSCAS (MUSCA DOMÉSTICA) ENTRE CORTINAS DE TELA MEDIANTE EL PROCESO DE MICRO ENCAPSULACIÓN E.”

- [20] A. Lucia and E. Guzmán, “Emulsions containing essential oils, their components or volatile semiochemicals as promising tools for insect pest and pathogen management,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 287. Elsevier B.V., Jan. 01, 2021. doi: 10.1016/j.cis.2020.102330.
- [21] C. Y. Cheok, H. A. K. Salman, and R. Sulaiman, “Extraction and quantification of saponins: A review,” *Food Research International*, vol. 59. pp. 16–40, May 2014. doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.057.
- [22] S. Akbari, N. H. Abdurahman, and R. M. Yunus, “Optimization of saponins, phenolics, and antioxidants extracted from fenugreek seeds using microwave-assisted extraction and response surface methodology as an optimizing tool,” *Comptes Rendus Chimie*, vol. 22, no. 11–12, pp. 714–727, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.crci.2019.07.007.
- [23] Z. Chen *et al.*, “Identification and Determination of Total Saponins from Radix (*Pulsatilla chinensis*),” *Int J Agric Biol*, vol. 22, no. 5, pp. 1239–1243, Nov. 2019, doi: 10.17957/IJAB/15.1192.
- [24] M. Aribel Lozano A ; E Dgar Ticona, C. Carrasco, Y. Flores, and R. A. Lm Anza, “REVISTA BOLIVIANA DE QUÍMICA CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS EN RESIDUOS DE QUINUA REAL *CHENOPODIUM QUINOA WILLD.*” [Online]. Available: <http://www.bolivianchemistryjournal.org>, <http://www.scielo.org>, <http://www.scribd.com/bolivianjournalofchemistry>
- [25] N. Benjathapanun, W. J. O. Boyle, and K. T. v Grattan, “Binary encoded 2nd-differential spectrometry using UV-Vis spectral data and neural networks in the estimation of species type and concentration.”
- [26] B. D. Dixon, J. Eatock, B. Meenan, and M. Morgan, “Application of Design of Experiment (DOE) Techniques to Process Validation in Medical Device Manufacture,” 2006.
- [27] Á. Bravo-Núñez, M. Golding, T. K. McGhie, M. Gómez, and L. Matía-Merino, “Emulsification properties of garlic aqueous extract,” *Food Hydrocoll*, vol. 93, pp. 111–119, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.02.029.
- [28] C. Qian, E. A. Decker, H. Xiao, and D. J. McClements, “Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type,” *Food Chem*, vol. 132, no. 3, pp. 1221–1229, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.091.
- [29] P. Reyes, Y. Sabrina, and D. I. Scipio, “CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE EMULSIONES DE ACEITE DE MAÍZ EN AGUA PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CORN OIL IN WATER EMULSIONS,” 2012.
- [30] S. Tiwari, N. Upadhyay, and R. Malhotra, “Three way ANOVA for emulsion of carotenoids extracted in flaxseed oil from carrot bio-waste,” *Waste Management*, vol. 121, pp. 67–76, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.wasman.2020.11.037.

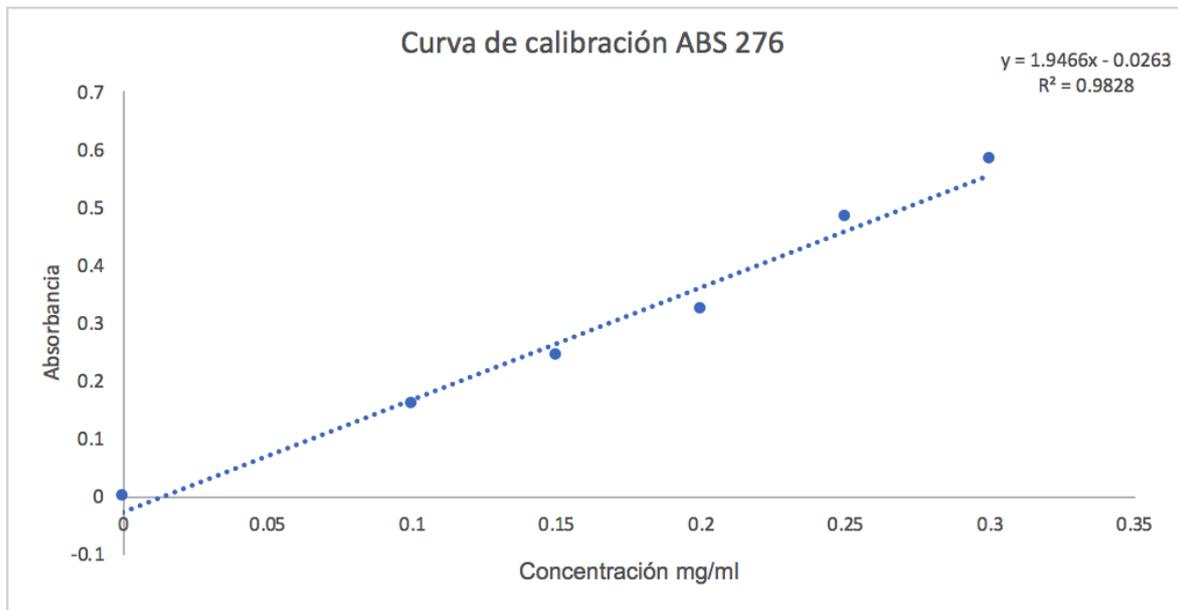
- [31] L. R. L. Diniz *et al.*, "The effect of saponins from *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke on the renal Na⁺ pumps' activities and urinary excretion of natriuretic peptides," *BMC Complement Altern Med*, vol. 12, Apr. 2012, doi: 10.1186/1472-6882-12-40.
- [32] "UNIVERSIDAD DE INVESTIGACIÓN DE TECNOLOGÍA EXPERIMENTAL YACHAY."
- [33] pt A. Marcel Juillerat, L. Fay, and N.-G. Aspt, "Degradation of Oat Saponins during Heat Processing-Effect of pH, Stainless Steel, and Iron at Different Temperatures," 1994.
- [34] T. J. Ha *et al.*, "Rapid characterisation and comparison of saponin profiles in the seeds of Korean Leguminous species using ultra performance liquid chromatography with photodiode array detector and electrospray ionisation/mass spectrometry (UPLC-PDA-ESI/MS) analysis," *Food Chem*, vol. 146, pp. 270–277, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.051.
- [35] D. Kregiel *et al.*, "Saponin-Based, Biological-Active Surfactants from Plants," in *Application and Characterization of Surfactants*, InTech, 2017. doi: 10.5772/68062.
- [36] C. L. Ridout, K. R. Price, S. Dupont, M. L. Parkerc, and G. R. Fenwick, "Quinoa Saponins-Analysis and Preliminary Investigations into the Effects of Reduction by Processing," 1991.
- [37] Y. Hu *et al.*, "Optimisation of Ethanol-Reflux Extraction of Saponins from Steamed *Panax notoginseng* by Response Surface Methodology and Evaluation of Hematopoiesis Effect," *Molecules*, vol. 23, no. 5, 2018, doi: 10.3390/molecules23051206.
- [38] A. C. dos S. Vaucher *et al.*, "Microencapsulation of fish oil by casein-pectin complexes and gum arabic microparticles: oxidative stabilisation," *J Microencapsul*, vol. 36, no. 5, pp. 459–473, 2019, doi: 10.1080/02652048.2019.1646335.
- [39] A. H. Kori, S. A. Mahesar, S. T. H. Sherazi, U. A. Khatr, Z. H. Laghari, and T. Panhwar, "Effect of process parameters on emulsion stability and droplet size of pomegranate oil-in-water," *Grasas y Aceites*, vol. 72, no. 2, Jun. 2021, doi: 10.3989/GYA.0219201.
- [40] D. J. McClements, "Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance," *Soft Matter*, vol. 7, no. 6. pp. 2297–2316, Mar. 21, 2011. doi: 10.1039/c0sm00549e.
- [41] Y. Jang, J. Park, H. Y. Song, and S. J. Choi, "Ostwald Ripening Rate of Orange Oil Emulsions: Effects of Molecular Structure of Emulsifiers and Their Oil Composition," *J Food Sci*, vol. 84, no. 3, pp. 440–447, Mar. 2019, doi: 10.1111/1750-3841.14464.
- [42] D. Sotomayor-Gerding, E. Morales, and M. Rubilar, "Comparison between Quinoa and Quillaja saponins in the Formation, Stability and Digestibility of Astaxanthin-Canola Oil Emulsions," *Colloids and Interfaces*, vol. 6, no. 3, Sep. 2022, doi: 10.3390/colloids6030043.
- [43] B. Ozturk, S. Argin, M. Ozilgen, and D. J. McClements, "Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin e delivery systems using natural surfactants: Quillaja saponin and lecithin," *J Food Eng*, vol. 142, pp. 57–63, 2014, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.06.015.

- [44] R. B. Lovaglio, F. J. dos Santos, M. Jafelicci, and J. Contiero, "Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: PH rules," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 85, no. 2, pp. 301–305, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.03.001.
- [45] L. Bai and D. J. McClements, "Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids," *J Colloid Interface Sci*, vol. 479, pp. 71–79, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.jcis.2016.06.047.

ANEXO A: DISEÑO DE EXPERIMENTO

Tabla 6. Concentraciones y rendimientos del modelo matemático

StdOrder	RunOrder	CenterPt	Blocks	Cetoh [%v/v]	Cquin [%p/v]	t [h]	Abs_prom	Concentración [mg/ml]	Rendimiento PESO / PESO
20	1	0	2	73	6	48	0,143	8,696	7,163
12	2	1	2	96	2	24	0,000	1,351	1,113
11	3	1	2	50	2	24	0,123	7,646	6,298
16	4	1	2	96	2	72	0,008	1,761	1,450
17	5	1	2	50	10	72	0,351	19,391	15,972
15	6	1	2	50	2	72	0,170	10,077	8,301
13	7	1	2	50	10	24	0,385	21,143	17,416
18	8	1	2	96	10	72	0,157	9,398	7,741
19	9	0	2	73	6	48	0,129	7,975	6,569
14	10	1	2	96	10	24	0,038	3,286	2,707
9	11	0	1	73	6	48	0,171	10,118	8,334
8	12	1	1	96	10	72	0,093	6,120	5,041
5	13	1	1	50	2	72	0,109	6,954	5,728
1	14	1	1	50	2	24	0,133	8,182	6,740
2	15	1	1	96	2	24	0,000	1,351	1,113
7	16	1	1	50	10	72	0,341	18,868	15,542
10	17	0	1	73	6	48	0,128	7,927	6,529
4	18	1	1	96	10	24	0,110	7,026	5,787
3	19	1	1	50	10	24	0,313	17,449	14,373
6	20	1	1	96	2	72	0,000	1,351	1,113

ANEXO B: CURVA DE CALIBRACIÓN**Figura 7.** Curva de calibración de Saponinas Método UV-VIS

ANEXO C: CROMATOGRAMAS DEL HPL

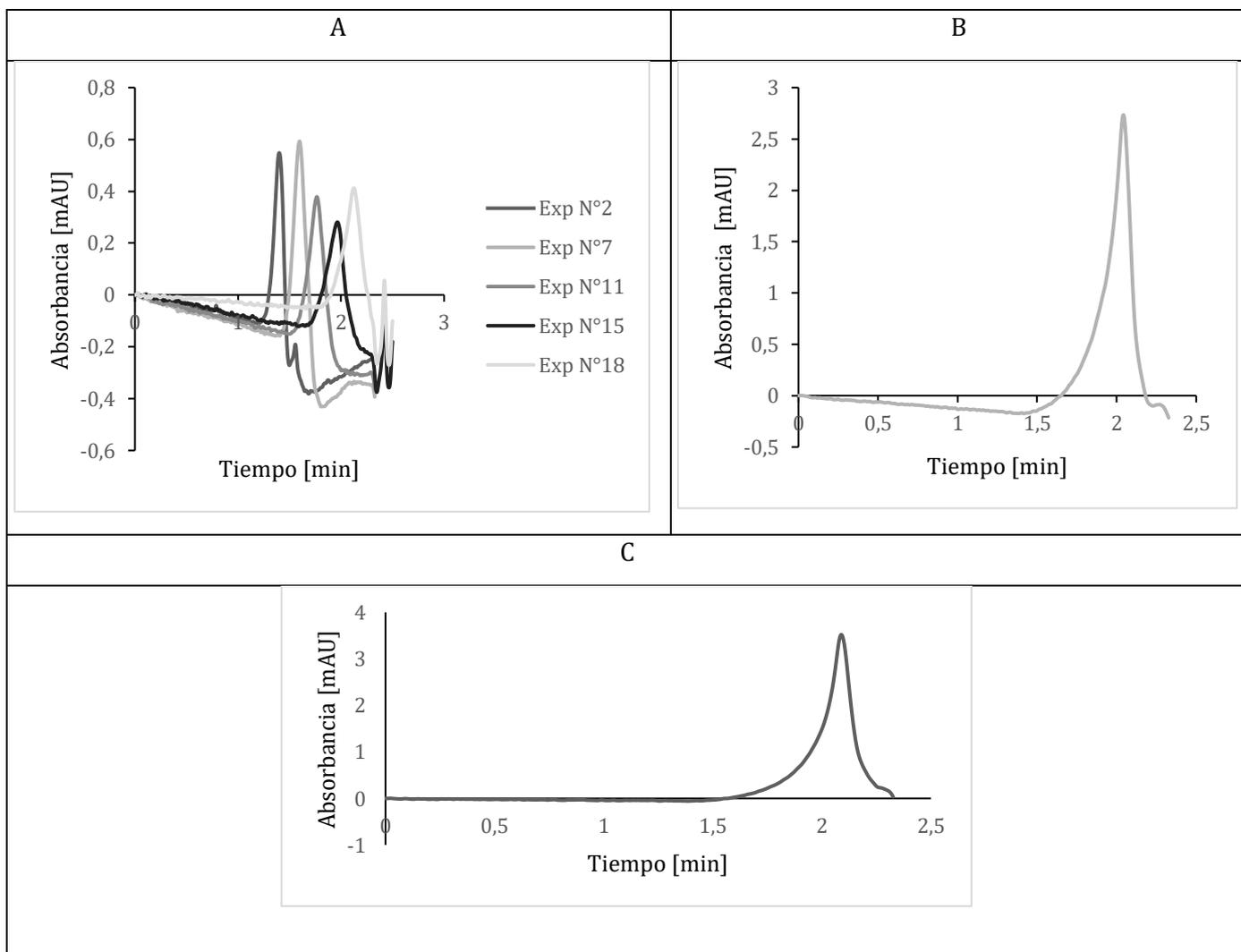


Figura 8. Cromatogramas con respecto a) extracciones de saponinas, b) pH ácido y c) pH alcalino

ANEXO D: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Tabla 7. Coeficientes codificados para respuesta transformada con respecto al rendimiento

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		8,835	0,404	21,87	0,000	
Bloques						
1		-0,269	0,361	-0,74	0,474	1,00
Cetoh	-9,758	-4,879	0,404	-12,08	0,000	1,00
Cquin	8,001	4,000	0,404	9,90	0,000	1,00
t	0,811	0,405	0,404	1,00	0,339	1,00
Cetoh*Cquin	-2,997	-1,499	0,404	-3,71	0,004	1,00
Cetoh*t	0,593	0,297	0,404	0,73	0,480	1,00
Cquin*t	0,408	0,204	0,404	0,50	0,625	1,00
Cetoh*Cquin*t	0,792	0,396	0,404	0,98	0,350	1,00
Pt Ctral		-0,156	0,903	-0,17	0,867	1,00

Tabla 8. Coeficientes codificados para respuesta transformada con respecto al rendimiento

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		0,08860	0,00429	20,66	0,000	
Bloques						
1		-0,00348	0,00384	-0,91	0,385	1,00
Cetoh	-0,11009	-0,05504	0,00429	-12,84	0,000	1,00
Cquin	-0,04953	-0,02477	0,00429	-5,77	0,000	1,00
T	0,01027	0,00513	0,00429	1,20	0,259	1,00
Cetoh*Cquin	0,04667	0,02334	0,00429	5,44	0,000	1,00
Cetoh*t	-0,00002	-0,00001	0,00429	-0,00	0,998	1,00
Cquin*t	-0,00394	-0,00197	0,00429	-0,46	0,656	1,00
Cetoh*Cquin*t	0,00664	0,00332	0,00429	0,77	0,457	1,00
Pt Ctral		-0,01677	0,00959	-1,75	0,111	1,00

ANEXO E: PREDICCIÓN DE CONCENTRACIÓN Y RENDIMIENTO

Tabla 9. Predicción del experimento N°1

Variable	Valor de configuración	Rendimiento	Concentración [mg/ml]
Cetoh	60	0,00781	0,6765
Cquin	7		
t	24		

Tabla 10. Predicción del Experimento N°2

Variable	Valor de configuración	Rendimiento	Concentración [mg/ml]
Cetoh	80	0,00787	0,6677
Cquin	4		
t	24		

Tabla 11. Predicción del experimento N°3

Variable	Valor de configuración	Rendimiento	Concentración [mg/ml]
Cetoh	70	0,00683	0,6442
Cquin	8		
t	24		

ANEXO F: RESULTADOS ESTADÍSTICOS SOBRE EL EFECTO DEL TIEMPO

Tabla 12. Análisis de varianza con respecto al efecto del tiempo

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
t	1	7009	7009,18	1103,95	0,000
Csap	2	2076	1037,82	163,46	0,000
Caceite	2	10035	5017,50	790,26	0,000
t*Csap	2	4493	2246,46	353,82	0,000
t*Caceite	2	2283	1141,33	179,76	0,000
Csap*Caceite	4	2842	710,57	111,92	0,000
Error	26729	169707	6,35		
Falta de ajuste	4	2093	523,17	83,42	0,000
Error puro	26725	167614	6,27		
Total	26742	202293			

Tabla 13. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre el tiempo

t	N	Media	Agrupación
24	9021	3,63315	A
0	17722	2,29758	B

Tabla 14. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la concentración de saponinas

Csap	N	Media	Agrupación
1,0	7459	3,46921	A
0,5	8474	2,80330	B
0,1	10810	2,62357	C

Tabla 15. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la concentración de aceite

Caceite	N	Media	Agrupación
1,5	15580	3,91558	A
0,5	4417	2,49573	B
1,0	6746	2,48477	B

Tabla 16. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre t*Csap

t*Caceite	N	Media	Agrupación		
24 1,5	4284	5,03062	A		
24 0,5	1158	2,94641		B	
24 1,0	3579	2,92241		B	
0 1,5	11296	2,80054		B	
0 1,0	3167	2,04713			C
0 0,5	3259	2,04506			C

Tabla 17. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre t*Caceite

t*Csap	N	Media	Agrupación		
24 1,0	2146	4,36643	A		
24 0,5	2944	3,86232		B	
24 0,1	3931	2,67069			C
0 0,1	6879	2,57646			C
0 1,0	5313	2,57199			C
0 0,5	5530	1,74428			D

Tabla 18. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre Csap*Caceite

Csap*Caceite	N	Media	Agrupación				
1,0 1,5	3827	4,74010	A				
0,5 1,5	4432	3,66383		B			
0,1 1,5	7321	3,34280			C		
1,0 0,5	1186	3,32466			C		
0,5 1,0	2226	2,96174				D	
0,1 0,5	1415	2,37821					E
1,0 1,0	2446	2,34286					E
0,1 1,0	2074	2,14971					E
0,5 0,5	1816	1,78432					F

ANEXO G: RESULTADOS ESTADÍSTICOS SOBRE EL EFECTO DE LA TEMPERATURA

Tabla 19. Análisis de varianza con respecto al efecto de la temperatura

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
T	2	1358	679,03	75,02	0,000
Csap	2	1017	508,36	56,17	0,000
Caceite	2	16	7,99	0,88	0,414
T*Csap	4	1897	474,15	52,39	0,000
T*Caceite	4	6913	1728,19	190,94	0,000
Csap*Caceite	4	5669	1417,20	156,58	0,000
Error	12071	109253	9,05		
Falta de ajuste	8	1002	125,29	13,96	0,000
Error puro	12063	108251	8,97		
Total	12089	133232			

Tabla 20. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la temperatura

T	N	Media	Agrupación
30	1840	4,91136	A
20	9021	3,65959	B
50	1229	3,61072	B

Tabla 21. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la concentración de saponinas

Csap	N	Media	Agrupación
0,5	3486	4,77165	A
1,0	3993	4,05483	B
0,1	4611	3,35520	C

Tabla 22. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la T*Csap

T*Csap	N	Media	Agrupación			
50 0,5	309	5,48122	A			
30 0,5	233	5,17206	A	B		
30 0,1	376	4,92178	A	B		
30 1,0	1231	4,64024		B		
20 1,0	2146	4,43769		B		
20 0,5	2944	3,66168			C	
50 1,0	616	3,08656				D
20 0,1	3931	2,87942				D E
50 0,1	304	2,26440				E

Tabla 23. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la T*Caceite

T*Caceite	N	Media	Agrupación			
30 0,5	248	6,54680	A			
20 1,5	4284	5,10463		B		
30 1,0	448	4,83166		B		
50 1,0	595	4,70167		B		
50 1,5	335	3,46310			C	D
30 1,5	1144	3,35562			C	
20 0,5	1158	3,04845			C	D
20 1,0	3579	2,82571				D
50 0,5	299	2,66740			C	D

ANEXO H: RESULTADOS ESTADÍSTICOS SOBRE EL EFECTO DEL PH

Tabla 24. Análisis de varianza con respecto al efecto del pH

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	2	66305	33152,5	1887,50	0,000
Csap	2	37096	18548,2	1056,02	0,000
Caceite	2	4207	2103,3	119,75	0,000
pH*Csap	4	3347	836,8	47,64	0,000
pH*Caceite	4	69304	17326,0	986,44	0,000
Csap*Caceite	4	161206	40301,6	2294,53	0,000
Error	16531	290354	17,6		
Falta de ajuste	8	117537	14692,1	1404,70	0,000
Error puro	16523	172818	10,5		
Total	16549	543314			

Tabla 25. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre el pH

pH	N	Media	Agrupación		
6	9021	7,62064	A		
3	663	6,50216		B	
9	6866	0,95619			C

Tabla 26. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la concentración de saponinas

Csap	N	Media	Agrupación		
1,0	3366	10,9815	A		
0,5	7318	2,8359		B	
0,1	5866	1,2616			C

Tabla 27. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la concentración de aceite

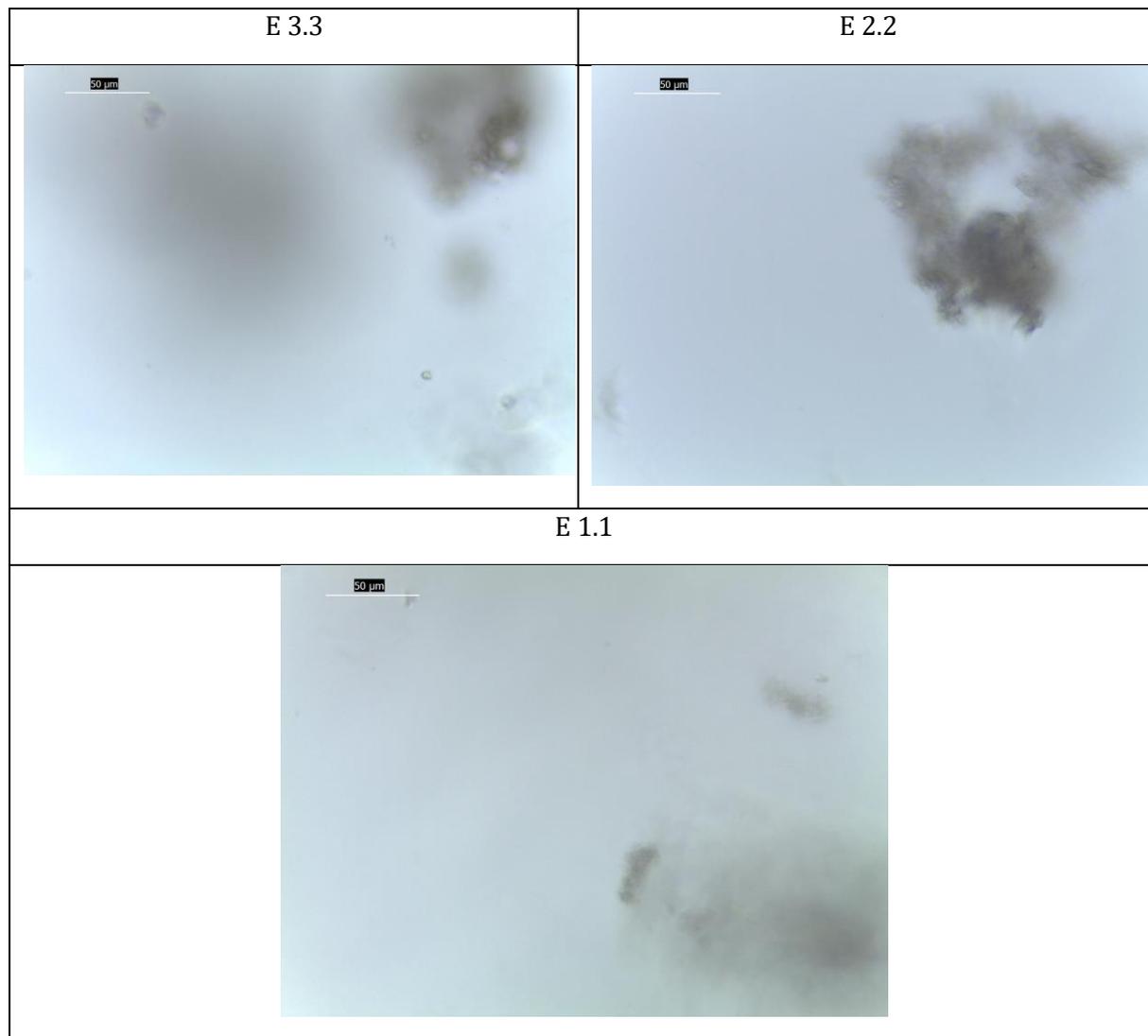
Caceite	N	Media	Agrupación		
0,5	1663	6,61474	A		
1,5	7547	4,95840		B	
1,0	7340	3,50585			C

Tabla 28. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la pH* Csap

pH*Csap	N	Media	Agrupación						
6 1,0	2146	14,7823	A						
3 1,0	114	11,5963		B					
9 1,0	1106	6,5659			C				
6 0,5	2944	4,8015				D			
3 0,5	496	4,7014				D			
6 0,1	3931	3,2781					E		
3 0,1	53	3,2088					D	E	
9 0,5	3878	-0,9952							F
9 0,1	1882	-2,7021							G

Tabla 29. Resultados del método de Turkey en Minitab sobre la pH* Caceite

pH*Caceite	N	Media	Agrupación						
6 0,5	1158	13,9654	A						
3 0,5	113	11,1212		B					
6 1,5	4284	5,5296			C				
9 1,5	3123	5,0869				D			
3 1,5	140	4,2588			C	D	E	F	
3 1,0	410	4,1265				D	E		
6 1,0	3579	3,3669					E	F	
9 1,0	3351	3,0241						F	
9 0,5	392	-5,2424							G

ANEXO I: IMÁGENES DEL MICROSCOPIO – FUERZA IÓNICA**Figura 9.** Efecto de la fuerza iónica en emulsiones