**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**INGENIERÍA QUÍMICA**

# PROYECTO DE GRADO

## "ESTUDIO BASICO PARA LA EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES DEL CALIZ DE CHILTO (*PHYSALIS PERUVIANA*)"

PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO QUIMICO

**POSTULANTE:** Univ. LIDUVINIA STEINHA STRAUSS ALVAREZ

**TUTOR:** ING. ARMENIO SILVA MANZANEDA

**CO-TUTOR:** PHD. YONNY RENÉ FLORES SEGURA

LA PAZ – BOLIVIA

2023

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**
**FACULTAD DE INGENIERIA**

**LA FACULTAD DE INGENIERIA DE LA UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS AUTORIZA EL USO DE LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO SI LOS PROPÓSITOS SON ESTRICTAMENTE ACADÉMICOS.**

## LICENCIA DE USO

El usuario está autorizado a:

a) Visualizar el documento mediante el uso de un ordenador o dispositivo móvil.
b) Copiar, almacenar o imprimir si ha de ser de uso exclusivamente personal y privado.
c) Copiar textualmente parte(s) de su contenido mencionando la fuente y/o haciendo la cita o referencia correspondiente en apego a las normas de redacción e investigación.

El usuario no puede publicar, distribuir o realizar emisión o exhibición alguna de este material, sin la autorización correspondiente.

**TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS. EL USO NO AUTORIZADO DE LOS CONTENIDOS PUBLICADOS EN ESTE SITIO DERIVARA EN EL INICIO DE ACCIONES LEGALES CONTEMPLADAS EN LA LEY DE DERECHOS DE AUTOR.**

***DEDICATORIA***

*A mi Dios por regalarme vida y salud para lograr mi capricho de ser Ingeniero Químico.*

*A todos los que me apoyaron desde una pequeña palabra hasta su compañía para seguir caminando, avanzando hasta culminar lo trazado.*

***AGRADECIMIENTOS***

*Agradezco a Dios por regalarme cada día salud, guiar mis pasos por buenos caminos de aprendizaje y regalarme las experiencias más maravillosas.*

*Agradezco a mi Mamá por su amor y apoyo constante, a mi Papá por enseñarme a siempre levantarme y mirar alto ante todo, a mi hermana por enseñarme que existen cosas maravillosas en la vida y a mi familia por los grandes valores que me enseñaron para la vida.*

*Agradezco a mi Ratoncito por la insistencia en que termine todo aquello que había empezado y me dedique a lo que más amo.*

*Agradezco al Ing. Jesús Góngora por su apoyo en uno de los momentos más difíciles que tuve que pasar y saber que existen personas como él, es una bendición.*

*Agradezco a mi tutor Ing. Armenio Silva por su constante apoyo, comprensión y desprendimiento de conocimiento y a mi tutor PhD Yonny Flores por enseñarme la parte maravillosa de la química y encontrar en mí una nueva pasión.*

*Agradezco al IIQ por abrirme las puertas para poder realizar mis pruebas, haciendo de esta una de las experiencias más enriquecedoras.*

*Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio de Bioorganica, por su calidez, sus enseñanzas, haciéndome sentir en familia.*

*Agradezco a todas las personas, amigos, conocidos que de alguna manera aportaron a que pueda lograr lo que me proponga.*

*Agradezco a mi casa de estudios por toda la formación otorgada y a la paciencia de todos mis docentes.*

## *RESUMEN*

*En el presente proyecto de grado se realizó un estudio básico para la obtención de flavonoides a partir de los cálices de Chilto (Physalis peruviana L.). Se caracterizó la materia prima mediante la determinación de sus propiedades fisicoquímicas obteniendo: densidad del solvente 0,86 g/ml, densidad del sustrato de 0,85 g/ml, densidad del material solido 3,62 g/ml, 5,49% de cenizas, pH 5 y 0,094 Pa*s de viscosidad. Se identifica cualitativamente la presencia abundante de Taninos, Flavonoides, compuestos fenólicos y una leve presencia de Alcaloides, Saponinas, Lactonas, Cumarinas y ausencia de Azucares. Se identificó mediante pruebas preliminares que las variables predominantes son Tiempo de extracción y Tamaño de partícula. Se determina mediante un diseño experimental que la interacción entre las variables tiempo de extracción y tamaño de partícula son significativas y las mejores condiciones de operación son Tiempo de extracción de 48 horas, Tamaño de partícula de 0,300 milímetros, Relación soluto- solvente de 1:20 (g/ml), Agitación de 100 RPM y Temperatura ambiente. Se realizó la caracterización del producto mediante cromatografía en capa fina, columna de exclusión molecular y columna fase reversa para separar el flavonoide mayoritario. Se llevó a un RMN y mediante la espectroscopia se identificó que el flavonoide mayoritario es Rutina. Se cuantificó la Rutina mediante HPLC y se obtuvo una concentración de 4,94 g de Rutina/ Kg de cáliz seco de Chilto. Se realizó el diseño del extractor a nivel Bench Scale y se determinó como diámetro del tanque 0,374 m, Altura 0,519m, diámetro del agitador 0,125m, Altura del agitador 0,075m, ancho del deflector 0,031m y una potencia de 0,654 Watts.*

***ABSTRACT***

*In this degree project, a basic study was carried out to obtain flavonoids from the calyxes of Chilto (Physalis peruviana L.). The raw material was characterized by determining its physicochemical properties, obtaining: solvent density 0.86 g/ml, substrate density 0.85 g/ml, density of the solid material 3,62 g/ml, 5,49% of ashes, PH 5 and 0,094 Pa*s of viscosity. It is qualitatively identified the abundant presence of Tannins, Flavonoids, phenolic compounds and a slight presence of Alkaloids, Saponins, Lactones, Coumarins and absence of Sugars. It was identified through preliminary tests that the predominant variables are extraction time and particle size. It was determined through an experimental design that the interactions between the variables extraction time and particle size are significant and the best operating conditions are extraction time of 48 hours, particle size of 0,300 millimeters, solvent-solvent ratio of 1:20 (g/ml), agitation of 100 RPM and room temperature. Product characterization was performed by thin layer chromatography, molecular exclusion column and reverse phase column to separate the major flavonoid. It was taken to NMR and by spectroscopy it was identified that the major flavonoid is Rutin. Rutin was quantified by HPLC and a concentration of 4,94 g of rutin/kg of dry calyx of Chilto was obtained. The extractor was designed at Bench Scale level and the tank diameter 0,374m, height 0,519m, agitator diameter 0,125m, agitator height 0,031m, deflector width 0,031m and a power of 0,654 Watts.*

# INDICE

**CAPITULO 1 ..... 1**

**INTRODUCCION ..... 1**

1.1. GENERALIDADES ..... 1
1.2. ANTECEDENTES ..... 1
1.3. DIAGNOSTICO ..... 3
1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ..... 4
1.5. OBJETIVOS ..... 4
1.5.1. OBJETIVO GENERAL ..... 4
1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 4
1.6. JUSTIFICACIÓN ..... 4
1.6.1. JUSTIFICACIÓN AMBIENTAL ..... 4
1.6.2. JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA ..... 5
1.6.3. JUSTIFICACIÓN SOCIAL ..... 5
1.6.4. JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA ..... 5

**CAPITULO 2 ..... 7**

**MARCO TEORICO ..... 7**

2.1. EL CHILTO ..... 7
2.1.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CHILTO ..... 7
2.1.2. FICHA TÉCNICA DE CHILTO ..... 8
2.2. FLAVONOIDES ..... 8
2.2.1. ASPECTOS QUÍMICOS ..... 9
2.2.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE FLAVONOIDES ..... 10
2.2.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE FLAVONOIDES ..... 11
2.3. EXTRACCIÓN SÓLIDO- LÍQUIDO ..... 12
2.3.1. PRINCIPALES VARIABLES DE EXTRACCIÓN ..... 13
2.3.1.1. PREPARACIÓN DE SÓLIDOS PARA LA EXTRACCIÓN ..... 13
2.3.1.2. RELACIÓN SOLUTO/SOLVENTE ..... 14
2.3.1.3. TIEMPO ..... 14
2.3.1.4. TEMPERATURA ..... 14
2.3.1.5. DISOLVENTE ..... 15

2.3.1.5.1. NATURALEZA DEL SOLVENTE....15
2.3.1.5.2. PRINCIPIOS DE SELECCIÓN DE SOLVENTE....15
2.3.2. MÉTODOS DE OPERACIÓN EN LA EXTRACCIÓN....16
2.3.3. RELACIONES DE EQUILIBRIO EN LA EXTRACCIÓN....16
2.3.3.1. DIAGRAMAS DE EQUILIBRIO....17
2.3.4. EXTRACCIÓN EN UNA ETAPA....17
2.4. DISEÑO DE TANQUES AGITADOS....19
2.4.1. AGITACIÓN....20
2.4.1.1. AGITADORES....20
2.4.1.2. DISEÑO TÍPICO DE UNA TURBINA....21
2.4.1.3. CONSUMO DE POTENCIA....21
2.5. EVAPORACIÓN....23
2.5.1. FACTORES DE PROCESO....23
2.5.1.1. CONCENTRACIÓN EN EL LÍQUIDO....23
2.5.1.2. SOLUBILIDAD....23
2.5.1.3. SENSIBILIDAD TÉRMICA DE LOS MATERIALES....23
2.5.1.4. PRESIÓN Y TEMPERATURA....24
2.5.1.5. FORMACIÓN DE INCRUSTACIONES Y MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN....24
2.6. CROMATOGRAFÍA....24
2.6.1. CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS....24
2.6.1.1. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)....25
2.6.1.1.1. PREPARACIÓN DE PLACAS DE CAPA FINA....26
2.6.1.1.2. DESARROLLO DE LA PLACA....26
2.6.1.2. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA....27
2.6.1.2.1. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR....27
2.6.1.2.2. CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA (C18)....28
2.6.1.3. CROMATOGRAFÍA DE ALTA EFICIENCIA HPLC....29
2.7. DISEÑO EXPERIMENTAL....29
2.7.1. EXPERIMENTO....29
2.7.2. CONCEPTO BÁSICO DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS....29
2.7.3. RECOMENDACIONES PARA ABORDAR UN ESTUDIO EXPERIMENTAL....29
2.7.4. DISEÑO FACTORIAL....31
2.7.4.1. DISEÑO FACTORIAL $2^K$....31
2.8.4.2. SUPERFICIES DE RESPUESTA....32

**CAPITULO III** ..... **34**

**METODOLOGÍA DE LA EXPERIMENTACIÓN** ..... **34**

3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA ..... 35
3.1.1. RECOLECCIÓN DE MATERIA PRIMA ..... 35
3.1.2. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA EN EL HERBARIO NACIONAL ..... 36
3.1.3. SECADO DE MATERIA PRIMA ..... 37
3.1.4. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS ..... 38
3.1.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ..... 44
3.1.5.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO ..... 44
3.2. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE SUSTRATO DE CÁLIZ ..... 45
3.2.1. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES DEL PROCESO ..... 45
3.2.2. METODOLOGÍA PARA LA SELECCIÓN DE VARIABLES DE PROCESO ..... 46
3.2.2.1. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA ..... 46
3.2.2.1.1. MOLIENDA Y TAMIZADO DE LA MATERIA PRIMA ..... 46
3.2.2.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA AGITACIÓN ..... 48
3.2.2.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA RELACIÓN SOLUTO/SOLVENTE ..... 49
3.2.2.3.1. SELECCIÓN DEL SOLVENTE ..... 49
3.2.2.4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN ..... 51
3.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIABLES DE MAYOR INFLUENCIA EN EL PROCESO A TRAVÉS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL ..... 52
3.4. CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO FINAL ..... 53
3.4.1. SEPARACIÓN DE COMPUESTOS ..... 53
3.4.2. MÉTODO CUANTITATIVO ..... 54
3.4.3. PRUEBAS BIOLÓGICAS ..... 54

**CAPITULO IV** ..... **56**

**RESULTADOS** ..... **56**

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA ..... 56
4.1.1. RECOLECCIÓN DE MATERIA PRIMA ..... 56
4.1.2. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA EN EL HERBARIO NACIONAL ..... 56
4.1.3. SECADO DE MATERIA PRIMA ..... 57
4.1.4. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS ..... 58

4.1.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ..... 62
4.1.5.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO ..... 62
4.2. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE SUSTRATO DE CÁLIZ. ..... 63
4.2.1. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES DEL PROCESO ..... 63
4.2.2. PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA SELECCIÓN DE VARIABLES DE PROCESO ..... 63
4.2.2.1. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA ..... 63
4.2.2.1.1. MOLIENDA Y TAMIZADO DE LA MATERIA PRIMA ..... 63
4.2.2.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA AGITACIÓN ..... 65
4.2.2.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA RELACIÓN SOLUTO/SOLVENTE ..... 65
4.2.2.3.1. SELECCIÓN DEL SOLVENTE ..... 65
4.2.2.4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN ..... 67
4.2.2.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA ..... 67
4.2.2.6. RENDIMIENTO ..... 68
4.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIABLES DE MAYOR INFLUENCIA EN EL PROCESO A TRAVÉS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL ..... 68
4.3.1. VARIABLES PARA EL DISEÑO EXPERIMENTAL ..... 68
4.3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL ..... 68
4.3.2.1. IDENTIFICACIÓN DE MODELO DE DISEÑO ..... 68
4.3.2.2. SECUENCIA DE TRABAJO ..... 68
4.3.2.2. ANOVA ..... 70
4.3.2.3. ANÁLISIS DE DESVIACIONES. ..... 70
4.3.2.4. ANÁLISIS MEDIANTE GRÁFICOS ..... 71
4.3.2.4.1. GRÁFICAS DE INTERACCIONES ..... 71
4.3.2.5. ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y CONTORNO DE SUPERFICIE ..... 71
4.3.2.6. ECUACIÓN DEL MODELO. ..... 72
4.3.2.7. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO ..... 72
4.3.2.7.1. EXTRACCIÓN EN MEJORES CONDICIONES PARA EL RENDIMIENTO OPTIMO ..... 73
4.4. CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO FINAL ..... 73
4.4.1. SEPARACIÓN DE COMPUESTOS ..... 73
4.4.1.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS. ..... 73
4.4.1.2. DETERMINACIÓN DE ESTRUCTURA POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ..... 75
4.4.1.2.1 COMPUESTO FLAVONOIDE MAYORITARIO ..... 75
4.4.2. MÉTODO CUANTITATIVO ..... 80

4.4.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN ..... 80
4.4.2.2. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDE MAYORITARIO RUTINA ..... 81
4.4.3. PRUEBAS BIOLÓGICAS ..... 83
4.4.4. BALANCE DE MATERIA ..... 85

**CAPITULO V ..... 88**

**DISEÑO DEL EXTRACTOR A NIVEL BENCH SCALE ..... 88**

6.1.1. DISEÑO DEL AGITADOR ..... 91
6.1.2. CALCULO DEL NÚMERO DE REYNOLDS ..... 91
6.1.3. SELECCIÓN DEL MATERIAL ..... 93
6.1.4. ESPESOR DE LA PARED ..... 94
6.1.5. DISEÑO DE LA CANASTA ..... 95
6.1.6. IMÁGENES 3D DEL EXTRACTOR. ..... 96

**CAPITULO VI ..... 98**

**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ..... 98**

6.1. CONCLUSIONES ..... 98
6.2. RECOMENDACIONES ..... 100
**BIBLIOGRAFIA.-** ..... 103
GLOSARIO ..... 107
ANEXO A ..... 1154
ANEXO B. ..... 149
ANEXO C. ..... 150
ANEXO D. ..... 154
ANEXO E. ..... 158
ANEXO F. ..... 163
ANEXO G. ..... 165
ANEXO H. ..... 167
ANEXO I. ..... 173
ANEXO J. ..... 175
ANEXO K. ..... 178

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Mapa de áreas productoras de Chilto en Bolivia. ....2
**Figura 2.** Planta de Chilto ....7
**Figura 3.** Ficha técnica de Chilto ....8
**Figura 4.** Posición del anillo aromático con la mitad de benzopirano. ....10
**Figura 5.** Clasificación basada en el grado de oxidación y saturación en el anillo ....10
**Figura 6.** Efectos farmacológicos de algunos flavonoides. ....12
**Figura 7.** Conceptualización de una matriz natural y de los posibles sitios donde se pueden encontrarse pequeñas moléculas. ....13
**Figura 8.** Extracción en una etapa ....17
**Figura 9.** Grafica triangular de una sola etapa....18
**Figura 10.** Tanque de agitación con bafles, camisa y fondo abombado. ....19
**Figura 11.** Regímenes de flujo de agitación.. ....21
**Figura 12.** Proporciones geométricas para un sistema de agitación “normal”. ....21
**Figura 13.** Correlación de potencia para diferentes turbinas....22
**Figura 14.** Proceso de cámara de revelado ....26
**Figura 15.** Proceso de cromatografía de exclusión ....27
**Figura 16.** Representación geométrica de diseño factorial $2^2$ y $2^3$. ....31
**Figura 17.** Superficie de respuesta y gráfico de contorno para el modelo de primer orden. ..32
**Figura 18.** Proceso general ....34
**Figura 19.** Procedimiento para el muestreo y recolección del material vegetal. ....35
**Figura 20.** Procedimiento de elaboración de herbario para la identificación de Chilto. ....36
**Figura 21.** Procedimiento de Secado de Materia prima ....37
**Figura 22.** Procedimiento de determinación de densidad de solvente ....38
**Figura 23.** Procedimiento de determinación de densidad de sólido. ....39
**Figura 24.** Procedimiento de determinación de densidad de extracto. ....40
**Figura 25**. Procedimiento de determinación de Viscosidad. ....41
**Figura 26.** Procedimiento de determinación de cenizas. ....42
**Figura 27**. Procedimiento de determinación de PH del sustrato. ....43
**Figura 28.** Proceso de Screening fitoquímico para determinar la presencia de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal. ....44
**Figura 29.** Diagrama de Ishikawa....45
**Figura 30.** Proceso de molienda y tamizado de materia prima ....46

**Figura 31.** Flujograma para efecto de tamaño de partícula.....47
**Figura 32.** Flujograma para efecto de agitación .....48
**Figura 33.** Proceso de elección de Solvente. .....49
**Figura 34.** Flujograma para efecto de la relación soluto/solvente.....50
**Figura 35.** Flujograma para efecto del tiempo de extracción .....51
**Figura 36.** Procedimiento de Diseño experimental**.**.....52
**Figura 37.** Flujograma de proceso de identificación del producto.....53
**Figura 38.** Determinación cuantitativa de Flavonoides.....54
**Figura 39.** Recolección de chilto. .....56
**Figura 40.** Physalis peruviana L. .....56
**Figura 41.** Humedad en base húmeda vs Tiempo.....57
**Figura 42**. Determinación de densidades. .....58
**Figura 43.** Determinación de la viscosidad .....59
**Figura 44.** Imágenes del proceso de determinación de cenizas. .....60
**Figura 45.** Determinación de pH .....61
**Figura 46.** Resultados de estudio fitoquímico para la materia prima. .....62
**Figura 47**. Diagrama Ishikawa con identificación de variables.....63
**Figura 48.** Rendimiento vs Tamaño de partícula .....64
**Figura 49.** Rendimiento vs Agitación .....65
**Figura 50.** Rendimiento vs Agitación .....66
**Figura 51.** Rendimiento vs Relación soluto/solvente.....66
**Figura 52.** Rendimiento vs Tiempo de extracción optimizado.....67
**Figura 53.** Grafica Normal de Daniel.....69
**Figura 54.** Interacción entre la relación soluto-solvente y el tamaño de partícula .....71
**Figura 55.** Contorno de superficie para el tiempo de extracción y el tamaño de partícula.....71
**Figura 56.** Cromatografía en capa fina .....73
**Figura 57.** Cromatografía por columna Sephadex LH20. .....74
**Figura 58.** Cromatografía por columna fase reversa C18 .....75
**Figura 59**. Espectro de Carbono 13 de Resonancia magnética nuclear de LSA.MR1 .....76
**Figura 60.** Espectro de Protón de Resonancia magnética nuclear de LSA.MR1 .....76
**Figura 61.** Comparación de espectros de carbono otorgados por resonancia magnética nuclear. .....77
**Figura 62.** Comparación de espectros de protón otorgados por resonancia magnética nuclear. .....78

**Figura 63.** Estructura química de flavonoide Rutina con posición de carbonos .....79
**Figura 64.** Compuesto Rutina aislada .....79
**Figura 65.** Estructura desarrollada de flavonoide Rutina. .....80
**Figura 66.** Curva de calibración de muestra pura Rutina .....81
**Figura 67.** Identificación del flavonoide Rutina en el sustrato .....81
**Figura 68.** Concentración extracto de Cáliz vs. Proliferación celular .....83
**Figura 69.** Concentración molécula flavonoide Rutina vs. Proliferación celular .....84
**Figura 70.** Resumen del balance de masa .....86
**Figura 71.** Especificaciones del tanque .....89
**Figura 72.** Correlación de potencia para diferentes turbinas.....92
**Figura 73.** Vistas de extractor en 3D a escala .....96
**Figura 74.** Vistas de extractor con canastillas en 3D a escala .....96
**Figura 75.** Imágenes de Screening fotoquímico .....153
**Figura 76.** Proceso del método cromatográfico .....158
**Figura 77.** Desarrollo de placa TLC para el sustrato .....159
**Figura 78.** Desarrollo de placas TLC para fracciones de Columna Shepadex .....160
**Figura 79.** Desarrollo de placa TLC para columna fase reversa C18 .....161
**Figura 80.** Desarrollo de placa TLC para precipitado .....162
**Figura 81.** Placa de muestras de Rutina .....165
**Figura 82.** Cromatogramas para diferentes concentraciones de Rutina.....166
**Figura 83.** Balance de materia en el proceso de Secado.....167
**Figura 84.** Balance de materia en el proceso de Tamizado. .....168
**Figura 85.** Balance de materia de la Extracción .....169
**Figura 86.** Balance de materia en el Filtrado .....170
**Figura 87.** Balance de Materia en la Evaporación .....170
**Figura 88.** Balance de materia para el proceso de separación en columna .....172
**Figura 89.** Análisis FODA .....175
**Figura 90.** Modelo de negocio CANVAS.....177
**Figura 91.** Flujograma de tratamiento de residuos .....179
**Figura 92.** Fotografías del procedimiento .....180
**Figura 93.** Placa de fase reversa de sembrado de Rutina y Precipitado (P) .....181

## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Principales países productores de Chilto en Sudamérica con datos del área de producción y cantidad de producción. .....1
**Tabla 2.** Clasificación cromatográfica acorde al estado de agregación de la fase móvil .....24
**Tabla 3.** Técnicas en cromatografía .....25
**Tabla 4.** Selección de fases estacionarias de cromatografía de exclusión. .....28
**Tabla 5.** Detalle de tamices .....47
**Tabla 6.**Características del perdigón. .....59
**Tabla 7.** Resultados de prueba de viscosidad .....59
**Tabla 8.** Resultados de la determinación de cenizas.....60
**Tabla 9.** Resumen de propiedades físicas y químicas.....61
**Tabla 10.** Detalle de proceso de tamizado .....64
**Tabla 11.** Selección de solvente.....65
**Tabla 12**. Variables de límite superior e inferior .....68
**Tabla 13.** Secuencia de trabajo proporcionado por el software Design expert. .....69
**Tabla 14.** Factores e interacciones más significativas para el modelo.....70
**Tabla 15.** Coeficientes de variación y de correlatividad.....70
**Tabla 16.** Optimización del proceso .....72
**Tabla 17.** Solución del proceso .....72
**Tabla 18.** Mejores condiciones de operación .....72
**Tabla 19.** Resultado a diferentes concentraciones de muestra pura Rutina .....80
**Tabla 20.** Datos de concentración de Rutina en el sustrato .....82
**Tabla 21**. Detalle de test de proliferación de células de cáncer de colon CaCo-2.....83
**Tabla 22.** Condiciones de operación .....88
**Tabla 23.** Propiedades físicas .....88
**Tabla 24.** Dimensiones para el extractor en acero inoxidable. .....95
**Tabla 25.** Condiciones para las pruebas del tamaño de partícula.....154
**Tabla 26**. Condiciones para las pruebas de efecto de agitación .....154
**Tabla 27.** Condiciones para las pruebas de efecto de la relación soluto/solvente.....154
**Tabla 28.** Condiciones para las pruebas de efecto de tiempo de extracción .....155
**Tabla 29.** Detalle de disoluciones. .....156
**Tabla 30.** Parámetros para la extracción.....156
**Tabla 31.** Rendimiento de cáliz de chilto a distintas soluciones. .....157

**Tabla 32.** Detalle de repeticiones en columna Sephadex.....163
**Tabla 33.** Agrupación de fracciones en columna Sephadex.....163
**Tabla 34.** Agrupación de fracciones en columna C18 .....164
**Tabla 35.** Agrupación de fracciones en columna C18 .....164
**Tabla 36.** Condiciones de operación .....165
**Tabla 37.** Resultados del proceso de residuos .....181

## SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\%_{H2O}$ = Porcentaje de agua

µm=Micrómetros

*A* = Área ($m^2$)

B= Parámetro de la ecuación

C= Altura de la paleta

$Cp_{H2O}$ = Calor especifico del agua

D= Apertura de la malla en µm

D*a*= Diámetro de la paleta del agitador

Dt= Diámetro del tanque

E= extracto en Kg

F= Alimentación en Kg

H= Altura máxima del liquido

J= Ancho del deflector

L= Espesor de la paleta

L=alimentación de solvente en l

m cond = Masa condensado

m ex= Masa extracto

M= es el flujo total en kg

m1 = Masa de material vegetal

m2= Masa de agua

m3= Masa de material vegetal seco

m4= Masa residual

Masa retenida= Masa retenida en cada tamiz

mc = Masa muestra

md= Masa solvente

mf = Masa de cálices tamizados

mf = Masa final

$m_{H2O}$ = Masa de agua

$m_o$ = Masa inicial

mr= Masa retenida por fase estacionaria

ms = Masa separada

mT= Masa para filtrar

mt1= Masa torta

n= Coeficiente de uniformidad

$N_{RE}$= Número de Reynolds

ŋ= Velocidad de agitación

P= Potencia

q= Calor

R= refinado en Kg

RPM= Revoluciones por minuto

Vt= Volumen de tanque

W= Ancho de la paleta

$X_{BS}$= Humedad en base seca

$X_E$=fracción del extracto E en kg de soluto/kg de solución

$X_F$= fracción de la alimentación de hojas F en kg de soluto/kg de solución

$X_L$= fracción de la alimentación de solvente L en kg de soluto/kg de solución

$X_M$= fracción del flujo total en kg de soluto/kg de solución

$X_R$= fracción del refinado R en kg de soluto/kg de solución

ρ= Densidad

# CAPÍTULO I

# INTRODUCCIÓN

# CAPITULO 1

# INTRODUCCION

## 1.1. Generalidades

La presentación de este proyecto, es especificar las atribuciones que parte de la planta de Chilto (*Physalis peruviana L.*) especificando la utilización de los cálices. Durante toda la investigación que se estudió la planta, encontramos todos los matices que se ejecutaron en la metodología realizada en laboratorio, obteniendo resultados óptimos como fueron planteados en el objetivo general y los objetivos específicos, encontrando como flavonoide mayoritario al flavonoide Rutina. La cual se llevó a pruebas biológicas anticancerígenas. De tal forma se demostrara todos los pasos seguidos en la investigación que se realizó en los laboratorios que corresponden al instituto de investigaciones químicas (IIQ).

## 1.2. Antecedentes

La planta del Chilto llamado también: uchuva, uvilla, guchuva, vejigón, topetorope, aguaymanto, alquequenje, topo-topo, capulí, poga poga, tomate silvestre, tomatillo y Golden Berry (en inglés). Fue descubierta por Carlos Lineo en 1753, este fruto oriundo del Perú denominándolo *Physalis peruviana* (Lopez, 1978). Los principales productores de Physalis a nivel mundial: son Colombia, Kenia, Zimbabwe, Australia, Nueva Zelanda, India y Ecuador (Beltrán, 2009). Se cultiva en menor importancia en: Estados Unidos, Brasil, Venezuela, Bolivia, Perú, Chile, Centroamérica, México, Belice, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Jamaica, África, Sudáfrica, Gabón, Egipto, Asia, India, China, Japón, Malasia, Indonesia, Filipinas, Samoa, Tonga, Nueva Caledonia, Islas Guam, Estados Unidos (California, New Jersey, Hawái, Kentucky, Massachusetts), Reino Unido e Israel (Özdemir & Günal, 2012).

**Tabla 1.** Principales países productores de Chilto en Sudamérica con datos del área de producción y cantidad de producción.

| País | Área de producción | Cantidad de producción |
|---|---|---|
| Colombia | 743 hectáreas | 10771 toneladas |
| Ecuador | 350 hectáreas | 4760 toneladas |
| Perú | - | 15,35 toneladas |
| Chile | 5,5 hectáreas | 6 toneladas |
| Brasil | - | 3 toneladas |

(-) no se cuenta con esos datos.

**Fuente.** Datos sacado de revista brasileira de Fruticultura, 2014.

El Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras a través del Proyecto Alianzas Rurales, fomenta la producción de Chilto llamada también uchuva en los valles del departamento de Santa Cruz, con el objetivo de incrementar la superficie de su producción tomando en cuenta que hay un mercado seguro y abierto para su exportación. Teniendo así en Bolivia como zona productora de Chilto a la localidad de Comarapa en el departamento de Santa Cruz con 49 hectáreas productoras y tendencia a una producción de 1000 Kilogramos de fruto por mes (página 7, 2014). En la figura 1, vemos un mapeo de las áreas productoras de Chilto de color Rojo y las áreas óptimas para su producción en color verde que son en los Valles de los Yungas, Chapare y la comunidad de Sapahaqui.

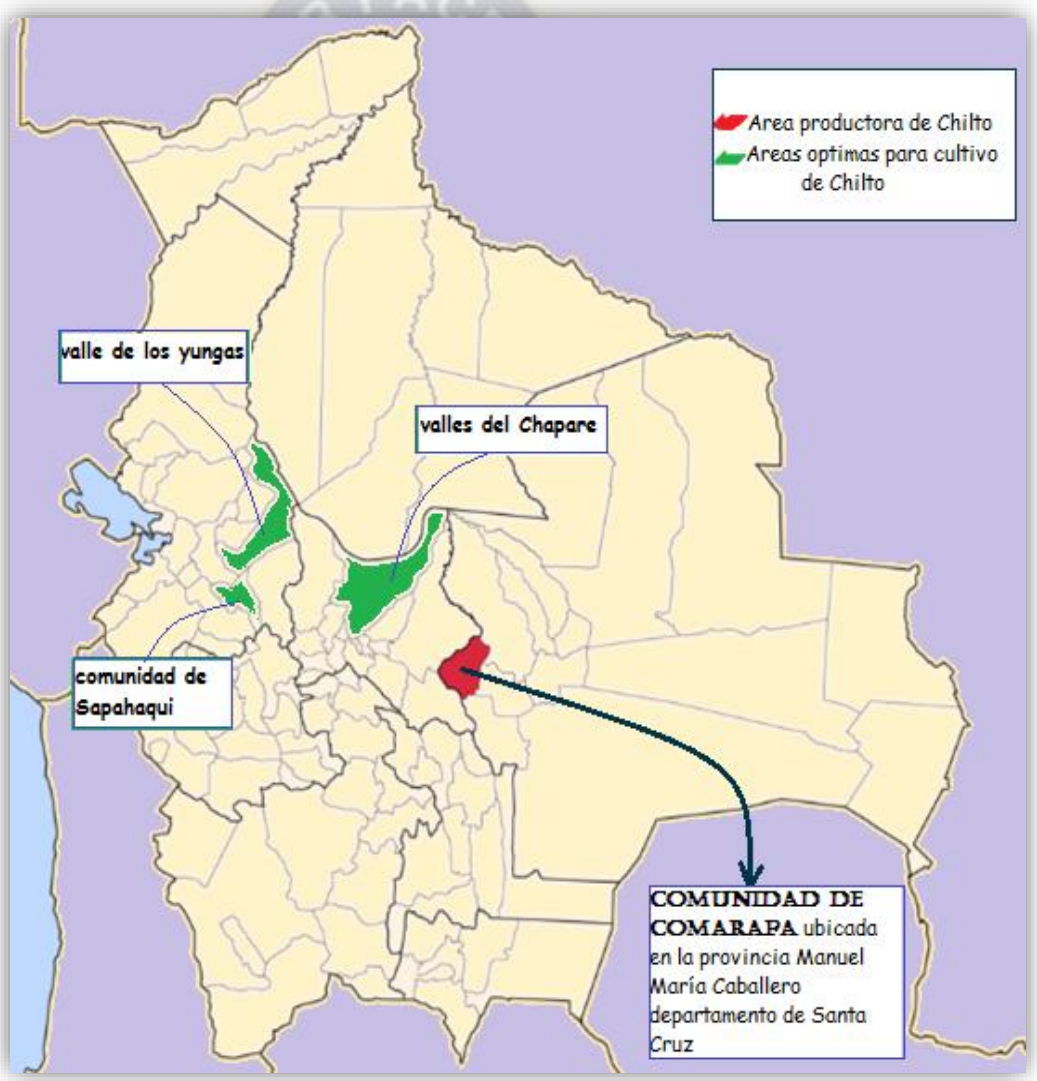



**Figura 1.** Mapa de áreas productoras de Chilto en Bolivia.
**Fuente.** Elaboración propia

Dentro de los principales países que compran esté producto, se encuentran: Holanda, Alemania, Francia, Inglaterra, España, Bélgica, Suiza, Canadá, Estados Unidos, Reino Unido, Italia y Brasil (FAO, 2006), además Rusia, Turquía y Japón.

### 1.3. Diagnostico

El Chilto es una planta perene, herbácea, arbustiva y fuertemente ramificada que crece sin tutorado normalmente hasta una altura de 1 a 1,5 m., pero con poda y espaldera puede llegar hasta los dos o más metros. Las flores son relativamente grandes hasta de dos centímetros de diámetro, el cáliz es gamosépalo está formado por cinco sépalos persistentes, es velloso con venas salientes y una longitud de 4 a 5 cm que cubre al fruto durante todo su desarrollo (Fisher & Sora, 2000).

En el mundo se lo consume como fruta natural y también entre sus principales productos elaborados son: pulpas (natural o edulcorado) congeladas o pasteurizadas, bebidas (néctares y refrescos), uchuvas parcialmente deshidratadas, enteras, pasabocas (simples o los recubiertos con chocolate o con otros productos), conservas de uchuva en jarabes, salsas, compotas y concentrados en forma de mermeladas, bocadillos o dulces (Camacho & Sanabria, 2005).

En la medicina popular Colombiana, son ampliamente utilizados por sus propiedades como anticancerígeno, antimicrobiano, antipirético, diurético y inmunomodulador antiinflamatorio (Franco, Matiz, Calle, Pinzón, & Ospina, 2007).

En la medicina tradicional peruana se utiliza el Chilto, empíricamente para tratar el cáncer y otras enfermedades como la hepatitis, el asma, malaria y dermatitis (Zabala, Quispe, Pelayo, Posso, Rojas, & Wolach, 2006)

Estudios científicos realizados en estos países (Colombia y Perú) indican que comer el fruto de P. peruviana L. reduce la glucosa en sangre después de 90 min postprandial en adultos jóvenes, provocando un mayor efecto hipoglucemiante después de este período (Rodríguez & Rodríguez, 2007) con la finalidad de sustentar efectos antiinflamatorios y antioxidantes, realizados por la Universidad Católica del Perú. Así mismo que los cálices de Chilto tienen un efecto antiinflamatorio (Franco Ospina, 2013).

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, por lo que rutina y quercetina se comportan como los secuestradores más fuertes de $O_2$ generado enzimáticamente en el fruto de *Physalis peruviana*.

Estos múltiples beneficios del Chilto llevo a la corporación Yanbal International que se encuentra a la vanguardia en innovación, a desarrollar su producto “Extracto Divino” crema

reactivadora de juventud, con su ingrediente innovador el “extracto de cáliz de Uchuva” que cuenta con propiedades que permiten activar los genes de la juventud en la piel del rostro. El cáliz de Uchuva es el último y más revolucionario descubrimiento de la cosmética antiedad (Economy, 2018).

En Bolivia el Chilto se utiliza para la elaboración de helados, mermeladas, yogurt, frutos de decoración en pastelería (Vargas, 2014) y su uso medicinal solo es de forma tradicional a través de mates y no cuenta con ningún estudio científico.

### 1.4. Planteamiento del problema

El Chilto en Bolivia se usa de forma tradicional, no se aprovecha sus propiedades en el campo medicinal, considerando que nuestro país cuenta con las condiciones y superficies aptas para el cultivo de esta planta. Por este motivo se pretende aprovechar los principios activos que tiene el cáliz de Chilto a través de la extracción de los flavonoides mediante el proyecto de grado titulado; “**Estudio básico para la extracción de flavonoides del cáliz de Chilto (*physalis peruviana*)”.**

### 1.5. Objetivos

#### 1.5.1. Objetivo General

Realizar el estudio básico para la obtención de flavonoides a escala laboratorio a partir del cáliz de Chilto (*Physalis peruviana L.*).

#### 1.5.2. Objetivos Específicos

- Realizar la caracterización de la materia prima.
- Identificar las variables que influyen en el proceso para la obtención de sustrato de cáliz.
- Identificar las variables de mayor influencia en el proceso a través del diseño experimental.
- Caracterizar el producto final obtenido en el proceso de extracción de flavonoides del cáliz de Chilto.
- Realizar el diseño del extractor a nivel Bench Scale.

### 1.6. Justificación

#### 1.6.1. Justificación Ambiental

Su producción implementaría una nueva alternativa para las áreas erosionadas por los cultivos de hoja de coca, reactivando la efectividad de los terrenos afectados por la hoja de coca, recuperando las áreas productivas del trópico sin perdida para el productor en áreas productoras.

### 1.6.2. Justificación Económica

La investigación del proyecto tiene la finalidad de incentivar una mayor producción de Chilto ya que esta será altamente demandante de mano de obra en las diferentes fases de cultivo, cosecha, pos-cosecha y comercialización, generando empleos llegando a ser un motor importante de la economía de las comunidades productoras. Brindando mayores ingresos en las familias productoras y mejorando sus condiciones de vida.

### 1.6.3. Justificación Social

La obtención de flavonoides del cáliz de Chilto traerá beneficios para los tratamientos médicos y de prevención. Enfocados al tratamiento de la lucha contra el cáncer y a tratamientos enfocados en la regeneración de células en la piel, brindando a la sociedad una alternativa de tratamientos a menor costo y disminuyendo los efectos secundarios de los tratamientos de estas enfermedades y en las comunidades productoras habrá un desarrollo educativo, mejoramiento de las condiciones de calidad de vida de los productores, sus familias y la comunidad en conjunto.

### 1.6.4. Justificación Académica

Se aplicará los conocimientos adquiridos durante la formación académica en las áreas de operaciones unitarias, transferencia de masa, diseño experimental y química analítica, que nos permitirán desarrollar las etapas de la investigación del presente proyecto.

# CAPÍTULO II

# MARCO TEORICO

# CAPITULO 2
# MARCO TEORICO

## 2.1. El chilto

El chilto conocido mundialmente como Uchuva es un cultivo herbáceo originario de la región andina y utilizado fundamentalmente por sus frutos comestibles, los cuales corresponden a una baya jugosa, redondeada, habitualmente de color amarillo y de intenso sabor (National Research, 1989). Pertenece a la familia de las Solanáceas y al género Physalis, cuenta con más de ochenta variedades que se encuentran en estado silvestre y que se caracterizan porque sus frutos están encerrados dentro de un cáliz o cápsula (Calvo Villegas, 2009).

**Figura 2.** Planta de Chilto
**Fuente.** Elaboración propia

### 2.1.1. Descripción botánica del chilto

Planta de tipo arbustiva con una raíz fibrosa que se ha encontrado a más de 60 cm de profundidad en el suelo. Posee un tallo algo quebradizo de color verde, con vellosidades de textura muy suave al tacto. Las hojas son enteras, similares a un corazón pubescente y de disposición alterna. Las flores son hermafroditas de cinco sépalos, con una corola amarilla y de forma tubular. El fruto es una baya carnosa en forma de globo, con un diámetro que oscila entre 1,25 y 2,5 cm y con un peso entre 4 y 10 g; está cubierto por un cáliz formado por cinco sépalos que le protege contra insectos, pájaros, patógenos y condiciones climáticas extremas. Su pulpa presenta un sabor ácido azucarado (semiácido) y contiene de 100 a 300 semillas pequeñas de forma lenticular (Calvo Villegas, 2009).

### 2.1.2. Ficha técnica de Chilto

El instituto de Investigaciones Amazónicas, dependiente de la carrera de Ingeniería Industrial de la Universidad Mayor de San Andrés, dentro de sus líneas de investigación ha realizado fichas técnicas de frutos amazónicos muchos conocidos y otros que están entrando al mercado de las grandes ciudades del país con información técnica relevante para el uso de los investigadores (Amazónicas, 2020).

| AGROFORESTAL – CULTIVO – VIDA SILVESTRE | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nombre común planta** [2] | Capuli, Chilto, Uchuva | | **Nombre Fruto** | Motojobobo | | |
| **Nombre Científico, especie** | *Physalis peruviana L.* | | **Género** | *Physalis* | | |
| **Clase, Orden, Familia, Tribu, Subtribu** [6] | *Dicotiledóneas, Tublifora, Solanáceas, Physaleae, Physalinae* | | | | | |
| **Características climatológicas** | **Temperatura** [1] | 8-20 °C | **Humedad** [1] | 70-80 % | **Altitud** [1] | 1.500 y 3.000 msnm |
| **Requerimientos suelo** | **Minerales** [7] | N, P, K, Mg, Ca, B | **Acidez**[1] | 5.5-6.8 | **Otros** | |
| **Densidad Agrícola o existencia silvestre**[3] | 1660 plantas por hectárea | | | | | |
| **Rendimiento Agroforestal frutos por planta** [8] | 303 frutos por planta aproximadamente | | | | | |
| **Vida útil de la planta** [2] | 3-4 años | | | | | |
| **Altura aproximada de la planta o árbol** [1] | Arbusto de 1,5 m de altura aproximadamente | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tiempo de floración** | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
| **Tiempo de maduración** | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
| **Tiempo de cosecha** | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
| **Lugares donde existen estas plantas, arbustos, árboles o palmeras en Bolivia.** | Norte Amazónico de Bolivia | | | | | | | | | | | |

**Figura 3.** Ficha técnica de Chilto
**Fuente.** Catalogo de frutas amazonicas del Instituto de Investigaciones amazonicas Pag. 112. Universidad Mayor de San Andres (UMSA, 2020)

## 2.2. Flavonoides

Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular que han estado presentes en la naturaleza durante millones de años. El hombre los consume ya que se encuentran en vegetales, frutas y en varias plantas medicinales.

El gran número de productos naturales de origen vegetal, debatiblemente llamados metabolitos secundarios por su importancia para la ecofisiología de los organismos que los acumulan no fue reconocido inicialmente. Por lo tanto: Los flavonoides son metabolitos secundarios que desempeñan un papel central, al dar forma a nuestro conocimiento de la genética moderna proporcionando herramientas para investigar una serie de problemas

vegetales centrales, incluyendo la biología de los transposones (*elemento genético transponible en una secuencia de ADN).*

Los flavonoides están siendo estudiados por un número creciente de científicos para seguir avanzando en desarrollar nuevos medios para manipular la síntesis de estos compuestos, ya que poseen una amplia gama de actividades farmacológicas entre las que destacan sus propiedades anti-oxidantes, las cuales les confieren capacidad de proteger a las células del estrés oxidativo relacionado con patologías asociadas al envejecimiento proporcionando soluciones a enfermedades vegetales y animales por igual (Grotewold, 2006).

### 2.2.1. Aspectos químicos

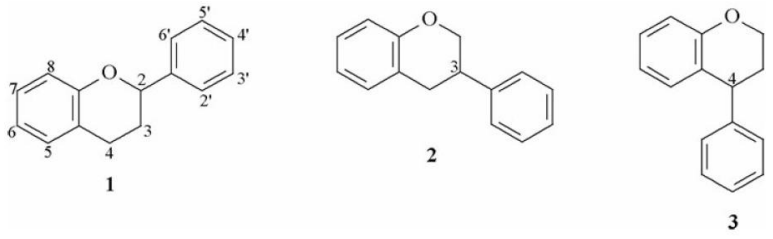
El término "flavonoide" se utiliza generalmente para describir una amplia colección de productos naturales que incluyen un marco de carbono C6-C3-C6, o más específicamente una funcionalidad fenil benzopirano (El benzopirano es un compuesto orgánico policíclico que resulta de la fusión de un anillo de benceno a un anillo heterocíclico pirano) (Grotewold, 2006)

La estructura base puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua.

Dependiendo de la posición de la vinculación del anillo aromático con la mitad de benzopirano (cromano), este grupo de productos naturales puede dividirse en tres clases:

- ✓ Flavonoides (2-fenilbenzopirianos)
- ✓ Isoflavonoides (3-benzopiranos)
- ✓ Neoflavonoides (4-benzopiranos)

Estos grupos generalmente comparten un precursor de chalcona común y, por lo tanto, son biogenéticamente y estructuralmente relacionados.




*2.1. 2-Phenylbenzopyrans* ($C_6$-$C_3$-$C_6$ Backbone)

1. Flavonoides (2-fenilbenzopirianos); 2. Isoflavonoides (3-benzopiranos); 3. Neoflavonoides (4-benzopiranos).

**Figura 4.** Posición del anillo aromático con la mitad de benzopirano.
**Fuente.** The Science of Flavonoids (pag 2), Erich Grotewoold, 2006, Springer Science+Business Media, Inc.

Basado en el grado de oxidación y saturación presente en el anillo C heterocíclico los flavonoides se pueden dividir en los siguientes grupos: Isoflavonoides; Neoflavonoides y Flavonoides menores (Grotewold, 2006).

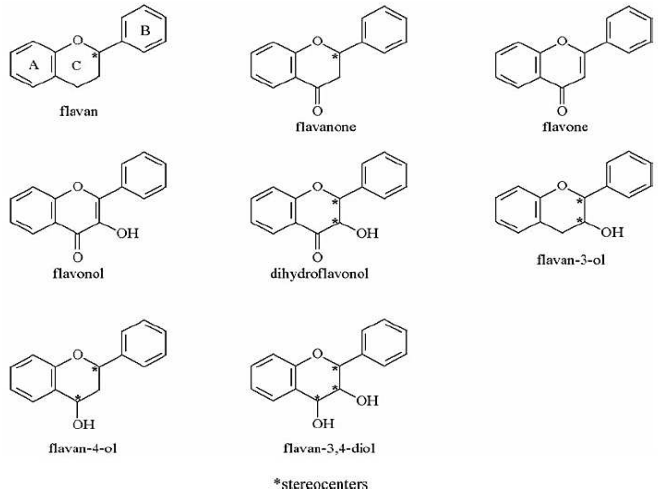



**Figura 5.** Clasificación basada en el grado de oxidación y saturación en el anillo
**Fuente.** The Science of Flavonoids (pag 4),Erich Grotewoold, 2006, Springer Science+Business Media, Inc.

### 2.2.2. Propiedades biológicas de flavonoides

La principal actividad atribuida a los flavonoides es la de ser venoactivos, es decir, ser capaces de disminuir la permeabilidad de los capilares sanguíneos y aumentar su resistencia. Cuanto más reductor sea el flavonoide mayor será la cantidad producida de ácido ascórbico.

En la actualidad se opina que estos fenoles captan los radicales formados en diversas circunstancias:

- Anoxia, que bloquea el flujo de electrones las citocromo oxidasas dando lugar a la producción de radical superoxido (O2-). El radical superoxido reacciona con protones dismutandose en dioxigeno y en peróxido de hidrogeno;
- Inflamación que se produce, por la formación de aniones superoxido (O2-) inducida por la NADPH-oxidasa presente en la membrana de los leucocitos activados por dismutación de peróxido de hidrogeno que en presencia de iones ferrosos de lugar al radical hidroxilo que es muy activo y otras especies muy reactivas (HOCL, cloramidas, etc.).
- Autooxidación lipídica. Generalmente inducida por un radical hidroxilo (o por NO.) que arranca un hidrogeno a la cadena lateral de un ácido graso, formando un radical carbonato (R.). Este último reacciona con oxígeno para formar peróxidos cíclicos y radicales hidroperóxidos (ROO.) que propagan esta reacción en cadena. Se forman igualmente radicales alcoxílicos lipófilos (RO.) (Valencia Ortiz, 1995).

**2.2.3. Propiedades farmacológicas de flavonoides**

Los flavonoides que tienen mayor interés farmacológico están dentro del grupo de las flavonas, flavonoles y flavanonas y sus correspondientes heterósidos y los antocianósidos. Muchos de ellos presentan actividad sobre el sistema vascular como factores vitamínicos P (aumento de la permeabilidad y disminución de la resistencia de los capilares sanguíneos) como por ejemplo el rutósido o los citroflavonoides, llamados así por haber sido aislados en especies pertenecientes al género Citrus.

El grupo de los antocianósidos tiene interés por sus efectos farmacológicos, sobre el territorio vascular capilar y venoso, su poder de pigmentación que junto a su baja toxicidad les hacen ser de utilidad como colorantes naturales en la industria farmacéutica y alimentaria, aunque se alteren con facilidad variando su color.

Los Isoflavonoides en la actualidad han mostrado un interesante efecto estrógenico débil les hace ser de utilidad en el tratamiento de la sintomatología asociada al climaterio además de actuar como inhibidores de tirosinakinasa y por tanto capaces de reducir la proliferación celular (Martinez, 2005) .

| Efectos | Flavonoide |
|---|---|
| Antineoplásico | quercetina,kaemferol, fisetina |
| Cardiotónicos | 3-metil-quercetina |
| Disminuyen la fragilidad capilar | rutina, quercetina, naringenina |
| Antitrombóticas | tangeretina, hesperidina, rutina |
| Disminución del colesterol | liquiritigenina |
| Protección y regeneración hepática | silimarina, apigenina |
| Antiulcéricos | Kaemferol, quercetina |
| Antimicrobianos | quercetina, baicalina |
| Antibacterial | crisina, rutina |
| Antiviral | crisoeriol |
| Antifúngica | cloroflavonina, apigenina |
| Antiinflamatorios | hesperidina, luteolina,quercetina |
| Analgésico | hesperidina |
| Anticancerígeno | quercetina |

**Figura 6.** Efectos farmacológicos de algunos flavonoides.
**Fuente.** Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central (pag.378), Rosa Estrada-Reyes, Denisse Ubaldo-Suárez, Ana Gabriela Araujo-Escalona. 2012. México-Xochimilco.

## 2.3. Extracción sólido- líquido

La extracción es el paso del protocolo analítico en el que un compuesto o grupo de grupo de compuestos se transfiere preferentemente de una matriz a una fase diferente. El objetivo final de este paso es hacer que la muestra esté disponible para su introducción en los instrumentos analíticos, es decir, tener los analitos objetivos en una fase líquida lista para su uso en los sistemas cromatográficos en los niveles correctos.

En este caso, el objetivo principal es producir cantidades suficientes de extractos de alta pureza por un solo compuesto o clases de compuestos. La importancia de los compuestos coextraídos depende de su naturaleza y de la pureza deseada de los extractos. Para la producción industrial de extractos de productos naturales, por razones económicas es necesario lograr un equilibrio adecuado entre la eficacia de la extracción, los rendimientos de extracción de los compuestos coextraídos y la concentración de los compuestos objetivo, con el fin de minimizar los costos.

Muchas sustancias biológicas, así como compuestos inorgánicos y orgánicos, se encuentran como mezclas de diferentes componentes en un sólido. Para separar el soluto deseado o eliminar un soluto indeseable de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase líquida. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos se difunden desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes originales del sólido (Geankoplis, 1998).

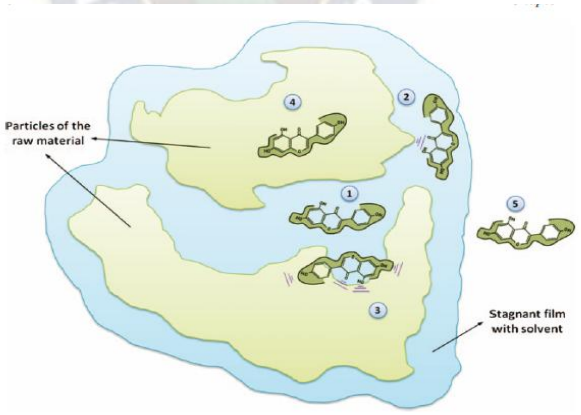
### 2.3.1. Principales variables de extracción

Además de la técnica, la eficiencia de la extracción es también una función de las condiciones del proceso. Varios factores afectan a la concentración de los componentes deseados en el extracto, como el tipo de disolvente, la temperatura, la relación disolvente/alimentación, el tiempo de contacto, el tamaño de las partículas, etc. Por lo tanto, debe emplearse el mejor método de extracción con condiciones optimizadas para la preparación de cada producto en particular.

#### 2.3.1.1. Preparación de sólidos para la extracción

El método de preparación del sólido depende en alto grado de la proporción del constituyente soluble presente, de su distribución en el material sólido original, de la naturaleza del sólido, que puede estar constituido por células vegetales o el material soluble estar totalmente rodeado por una matriz de materia insoluble y del tamaño de partícula original (Geankoplis, 1998).

Al preparar el material sólido para la extracción, hay algunos aspectos que deben tenerse en cuenta para que la posterior etapa de extracción sea más eficiente. Algunos de los más importantes son el tamaño de las partículas, la humedad, la homogeneidad y la porosidad. La tasa de transferencia de masa también depende de la ubicación del soluto dentro de la partícula sólida ya que dicta la difusión, que es el principal mecanismo de transferencia de masa limitante del proceso.




Particles of the raw material (Partículas de la materia prima); Stagnant film with solvent (Película estancada con disolvente) ; Donde: 1. el disolvente se transfiere de la fase fluida a la superficie del sólido y la impregna; 2. el disolvente penetra en la matriz sólida por difusión molecular; 3. el material soluble se solubiliza por desorción de la matriz y la disolución en el disolvente de extracción - la ruptura de los enlaces químicos puede ser necesaria para la desorción de los analitos objetivo de la matriz sólida; 4. la solución que contiene los solutos vuelve a la superficie del sólido por difusión molecular; 5. la solución se transfiere desde la superficie del sólido al fluido a granel por convección natural o forzada.

**Figura 7.** Conceptualización de una matriz natural y de los posibles sitios donde se pueden encontrarse pequeñas moléculas.

**Fuente.** RSC Green Chemistry No. 21, Natural Product Extraction Principles and Applications, 2013, Edited by Mauricio A. Rostagno and Juliana M. Prado University of Campinas, Brazil.

La reducción del tamaño de la partícula resulta en una mayor área superficial, lo que aumenta las tasas de extracción. Por lo tanto, el tamaño de las partículas debe evaluarse adecuadamente para garantizar equilibrio adecuado entre el aumento de la superficie de transferencia de masa y la canalización.

Para la extracción de compuestos hidrosolubles la presencia de agua es beneficiosa, mientras que para los compuestos liposolubles la materia prima debe estar seca antes de la extracción. Sin embargo, el secado debe ser controlado, ya que cuando se utiliza una temperatura elevada en este paso, puede afectar al perfil y a la concentración de los fitoquímicos presentes en la materia prima, ya que algunos de ellos pueden ser sometidos a la degradación térmica. Por lo tanto, cuando se trata de productos naturales, siempre es preferible utilizar temperaturas de secado bajas o a secado al medio ambiente (Rostango & Prado, 2013).

**2.3.1.2. Relación soluto/solvente**

El rendimiento de los procesos de extracción tiende a aumentar con la relación soluto/solvente. Una relación alta puede aplicarse en una extracción de un solo paso, o pueden utilizarse relaciones más bajas en un proceso de varios pasos. Sin embargo, una relación alta también implica un alto consumo de disolvente y consumo de energía para la eliminación del disolvente. Por lo tanto, la relación debe ser lo más baja posible sin dejar de garantizar el rendimiento deseado para el proceso.

**2.3.1.3. Tiempo**

El tiempo de extracción es un parámetro directamente relacionado con la temperatura. Aunque prolongar el proceso aumenta el rendimiento, la exposición prolongada de la materia sólida a altas temperaturas puede conducir a la degradación de los compuestos de interés.

**2.3.1.4. Temperatura**

La temperatura suele tener un efecto importante en el proceso de extracción porque los cambios en ella modifican las propiedades tanto del soluto como del disolvente. La temperatura afecta a la solubilidad y la difusividad de los solutos y también a la viscosidad y la tensión superficial de los líquidos. En la extracción de productos naturales puede ser necesario condiciones menos agresivas, como una temperatura moderada, la protección de la luz y el oxígeno, para evitar la degradación de algunos compuestos termosensibles que disminuirían la calidad del producto.

**2.3.1.5. Disolvente**

**2.3.1.5.1. Naturaleza del solvente**

La interacción soluto solvente es muy importante, la solubilidad de una sustancia es mayor cuando las moléculas de soluto son semejantes estructuralmente a las del solvente. Por eso se aplica que "Lo semejante disuelve a lo semejante", si existe semejanza en la estructura de las sustancias (soluto y solvente). En general se establece que:

a) Un soluto polar se disuelve en un solvente polar

b) Un soluto apolar se disuelve en un solvente apolar

Andersen y Markham indican que para la extracción de flavonoides, el disolvente se elige en función del tipo de flavonoide necesario. Para flavonoides menos polares se extraen con cloroformo, diclorometano, éter dietílico o acetato de etilo, mientras que los flavonoides más polares llamados flavonoides glicósilados se extraen con alcoholes o mezclas de alcohol y agua (2006).

**2.3.1.5.2. Principios de selección de solvente**

En los procesos de extracción, el tipo de disolvente es el principal parámetro que afecta la eficacia del proceso, ya que determina dos factores importantes la solubilidad del compuesto objetivo y la penetrabilidad en la matriz. Las características del disolvente que se deben tener en cuenta son:

a) *Selectividad.-* El solvente debe poseer la capacidad para remover el soluto de manera preferente con respecto al componente principal de la mezcla y así garantizar la solubilización del compuesto objetivo y su pureza.

b) *Reactividad.-* El solvente no debe reaccionar con los compuestos objetivo.

c) Recuperabilidad del solvente.- La recuperación del disolvente debe ser fácil, En algunos casos se hace necesario el uso de una columna de destilación.

d) *Disponibilidad y costos.-* El solvente debe ser fácil de conseguir. El costo determinante no es el precio del solvente, sino los costos anuales debidos a las perdidas inevitables en la operación.

e) *Impacto Ambiental.-* El solvente no debe ser solo compatible con los procesos, sino también con el ambiente.

f) *Objetivo o Finalidad.-* El solvente debe contribuir a la finalidad de uso. En los últimos años la industria farmacéutica ha hecho un esfuerzo en la sustitución de solventes orgánicos (diclorometano, tolueno, etc) por otros menos peligrosos como por ejemplo alcoholes y en la industria alimentaria el solvente más usado es

el alcohol (Etanol) ya que ayuda en la preservación de especímenes fisiológicos y patológicos. Cuando se utilizan disolventes durante el proceso de extracción para tratamiento de alimentos y fines farmacológicos, es muy importante asegurarse de que sean eliminados totalmente del producto final, y que los residuos sean inocuos para el consumo humano.

### 2.3.2. Métodos de operación en la extracción

Las operaciones se pueden llevar a cabo tanto en condiciones de estado no estacionario o por lotes, como continúas o en estado estacionario. También se pueden usar equipos de tipo continuo o por etapas, ya sea para la operación en estado estacionario o no estacionario.

Los sólidos no deben ser demasiado finos, pues habría una alta resistencia al flujo. Algunas veces se colocan varios tanques en serie, que constituyen una batería de extracción, y se agrega disolvente nuevo al sólido que está casi extraído. Los tanques pueden ser de tipo abierto o bien cerrado, en cuyo caso se llaman difusores. El disolvente fluye a través de los tanques en serie, y se extrae del tanque más recientemente cargado, lo que simula una operación continua a contracorriente.

Los sólidos finamente molidos pueden lixiviarse en recipientes con agitación o en espesadores. El proceso puede ser de tipo de estado no estacionario por lotes, o bien, los recipientes se pueden colocar en serie para obtener un proceso a contracorriente por etapas (Geankoplis, 1998).

### 2.3.3. Relaciones de equilibrio en la extracción

Para analizar una lixiviación en una sola etapa se requieren, una ecuación de línea de operación o relación de balance de materia y las relaciones de equilibrio entre ambas corrientes. Se supone que el sólido libre de soluto es insoluble; si hay suficiente disolvente presente para que todo el soluto del sólido de entrada pueda disolverse en el líquido, el equilibrio de la lixiviación se alcanza cuando se ha disuelto el soluto. En general, existe suficiente tiempo para que esto ocurra en la primera etapa. La solución de la fase líquida que sale de una etapa es la misma que la que permanece con la matriz sólida en la suspensión sedimentada que abandona la etapa. No es posible (ni práctico) separar todo el líquido del sólido en el sedimentador de una etapa; por consiguiente, el sólido sedimentado que sale de una etapa siempre contiene algo de líquido en el cual hay presente soluto disuelto (Geankoplis, 1998).

#### 2.3.3.1. Diagramas de equilibrio

Los datos de equilibrio se pueden graficar en un diagrama rectangular como fracciones de peso de los tres componentes: Soluto (A), sólido inerte o lixiviado (B) y disolvente (C). Las dos fases son la de derrame (líquido) y la de flujo inferior (suspensión).

La concentración del sólido insoluble o inerte B en la mezcla de la solución o en la mezcla de la suspensión, se expresa en unidades de Kg.

$$N = \frac{Kg\ de\ B}{Kg\ de\ A + Kg\ de\ C} = \frac{Kg\ de\ sólido}{Kg\ de\ solución}$$

Hay un valor de N para el derrame en el que N = 0 y, en el caso del flujo inferior, N tendrá valores diferentes que dependerán de la concentración del soluto en el líquido.

Las composiciones del soluto A en el líquido se expresan como fracciones en peso:

$$X_A = \frac{Kg\ de\ A}{kg\ de\ A + Kg\ de\ C} = \frac{Kd\ de\ soluto}{Kg\ de\ solución}$$

$$Y_A = \frac{Kg\ de\ A}{kg\ de\ A + Kg\ de\ C} = \frac{Kd\ de\ soluto}{Kg\ de\ solución}$$

Donde: $X_A$ es la fracción en peso del soluto A en el líquido de derrame, y $Y_A$ es la fracción en peso de A libre de sólido B en el líquido asociado con la suspensión o flujo inferior. Para alimentación del sólido de entrada que se va a lixiviar, N es kg de sólido inerte/kg de soluto A, y $Y_A$ = 1.0. Para la entrada del disolvente puro N = 0 y $X_A$ = 0. (Geankoplis, 1998).

### 2.3.4. Extracción en una etapa

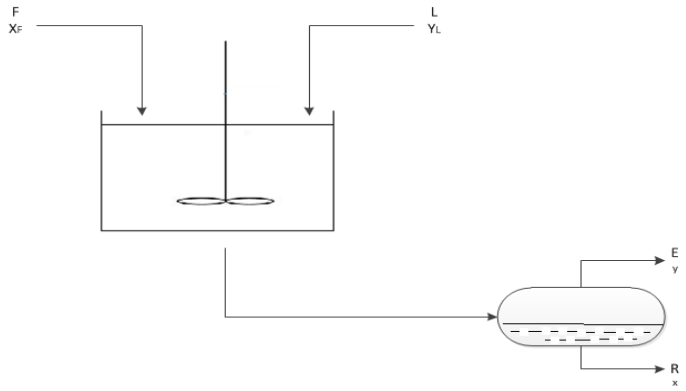



**Figura 8.** Extracción en una etapa
**Fuente.** Operaciones de separación por lotes. Guarachi, A. (2004).

Las ecuaciones del balance de materia son:

$$F + L = M = E + R$$

$$FX_F + LY_L = MX_M = EX_E + RX_R$$

Donde:

F= Alimentación en Kg

$X_F$= fracción de la alimentación de hojas F en kg de soluto/kg de solución

L=alimentación de solvente en l

$X_L$= fracción de la alimentación de solvente L en kg de soluto/kg de solución

M= es el flujo total en kg

$X_M$= fracción del flujo total en kg de soluto/kg de solución

E= extracto en Kg

$X_E$=fracción del extracto E en kg de soluto/kg de solución

R= refinado en Kg

$X_R$= fracción del refinado R en kg de soluto/kg de solución

Para utilizar la gráfica del sistema rectangular las coordenadas se transforman:

$$F\begin{Bmatrix} X, y = 1 \\ N = \frac{I}{D} + S \end{Bmatrix} \qquad L\begin{Bmatrix} X, y \\ N = 0 \end{Bmatrix} \qquad M\begin{Bmatrix} X, y \\ N \end{Bmatrix}$$

Conociendo el comportamiento de las curvas de reparto y la curva de retención pueden ubicarse las concentraciones de extracto y refinado, donde se considera que el inerte es insoluble y no absorbente (Guarachi, 2004).

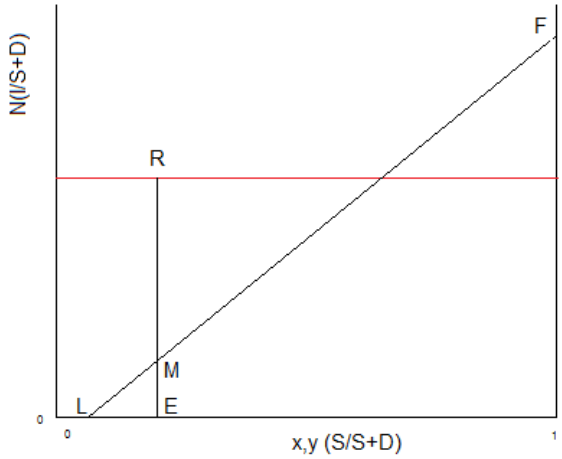



**Figura 9.** Grafica triangular de una sola etapa
**Fuente.** Adaptado de Operaciones de separación por lotes. Guarachi, A. (2004).

De acuerdo a la gráfica puede calcularse los flujos de salida:

$$E = M\frac{X_M - X}{Y - X}$$

$$R = M - E$$

**2.4. Diseño de tanques agitados**

El equipo de agitación suele consistir en un tanque para contener el líquido, uno o más impulsores para proporcionar el flujo de cizallamiento, un motor o algún otro medio para accionar el motor o algún otro medio para accionar el impulsor y normalmente bafles de pared, cuya instalación permite una mayor potencia de entrada. Los deflectores de pared son tiras longitudinales fijadas a las paredes interiores del tanque. La figura 10 se muestra un tanque de agitación con los laterales y el fondo rodeado por una "camisa" que contiene un fluido para proporcionar la transferencia de calor necesaria. A menudo se recomienda un tanque con un fondo inclinado o abombado, aunque también se suelen utilizar tanques cuyo fondo y lados forman un ángulo recto (Brodkey & Hershey, 1988).

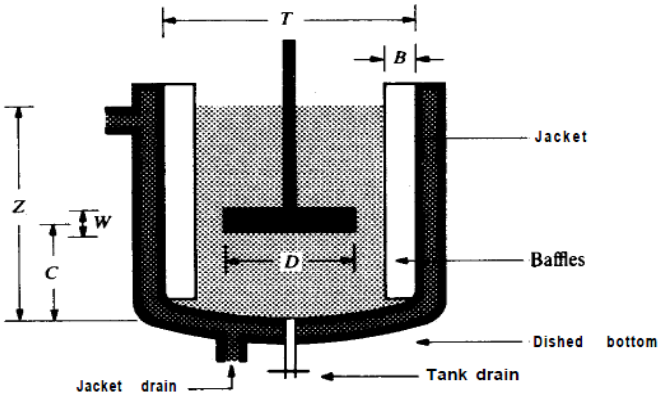



FIGURE 9.1
Agitation tank with baffles, jacket, and dished bottom.

**Figura 10.** Tanque de agitación con bafles, camisa y fondo abombado.
**Fuente.** Transport phenoma a Unified, 1988, Robert S. Brodkey; Harry C. Hershey, The Ohio State University.

El mayor cambio en la nomenclatura se refiere a las dimensiones físicas de la unidad de agitación. Para la unidad de la Figura 10, se ha modificado lo siguiente

Las definiciones son de uso común:

B= Ancho de cada deflector

C= Distancia del fondo del tanque a la línea central del impulsor

D= Diámetro del impulsor

T= Diámetro interior del depósito

W= Anchura del impulsor

z= Profundidad del fluido en el tanque

(Brodkey & Hershey, 1988)

### 2.4.1. Agitación

La agitación de los líquidos suele realizarse en un recipiente equipado con una hélice, una paleta o una turbina. La hélice se introduce en el líquido y se hace girar de manera que se produzca tanto un movimiento en masa como remolinos finos en el fluido. Se requiere energía mecánica para hacer girar. El impulsor necesita energía mecánica para girar el rodete, que a su vez transmite esta energía al fluido. En la agitación, el impulsor está girando a los lados y en el fondo del tanque están inmóviles, y los gradientes de velocidad resultantes provocan la mezcla y la dispersión. La agitación es un proceso que generalmente logra cambios físicos, químico y/o un aumento de la velocidad de transporte. Estos pueden ocurrir simultáneamente o por separado. Además, puede aumentar la tasa de transferencia de masa cuando se mezcla un soluto miscible (u otro material) en un disolvente líquido. Si el soluto consiste en cristales sólidos, la agitación suele ser la responsable de producir y mantener la máxima fuerza motriz de concentración posible entre la interfaz sólida y la solución (Brodkey & Hershey, 1988)

#### 2.4.1.1. Agitadores

Se muestra los patrones de flujo bruto para cuatro tipos importantes de impulsores en los equipos de agitación. Estas turbinas y hélices se utilizan a menudo para la suspensión de sólidos porque los patrones de flujo hacen que los sólidos sean barridos del fondo del recipiente donde de otro modo podrían depositarse. En estos líquidos, el proceso de agitación es en condiciones de flujo laminar, y las formas inusuales de los impulsores, como el ancla, una cinta helicoidal, el impulsor de tornillo o alguna otra forma similar son más satisfactorias.

El patrón de flujo en la Figura 11 es básicamente tangencial, como se muestra. La velocidad del impulsor es baja debido a su gran diámetro y a las limitaciones mecánicas. No hay espacio para deflectores, ni hay necesidad de ellos.

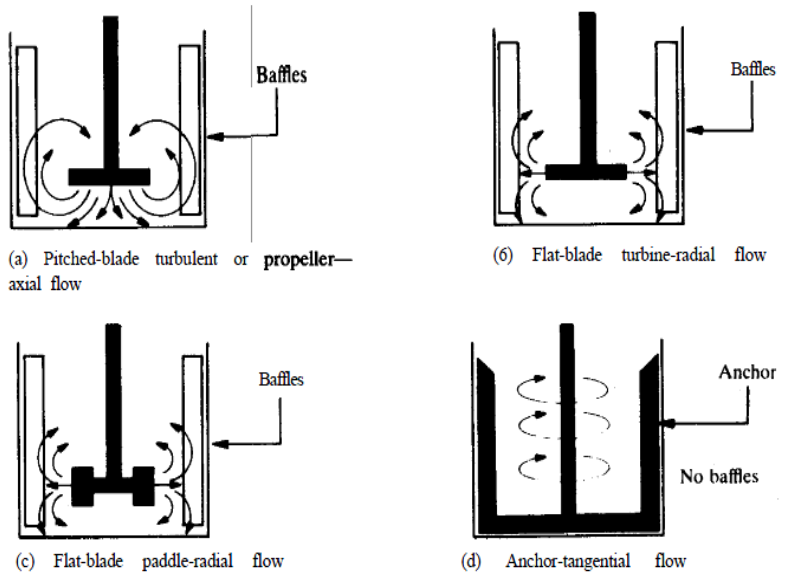



**Figura 11.** Regímenes de flujo de agitación. (Adaptado de Philadelphia Mixers, división de Philadelphia Gear Corporation, con autorización).
**Fuente.** Transport phenoma a Unified, 1988, Robert S. Brodkey; Harry C. Hershey, The Ohio State University.

### 2.4.1.2. Diseño típico de una turbina

Para diseñar un sistema de agitación ordinario, generalmente se usa este tipo de agitador en el diseño inicial. Las proporciones geométricas del sistema de agitación que se considera como el diseño "normal" típico. Estas proporciones relativas son la base de las correlaciones principales del desempeño de los agitadores.

$$\frac{D_a}{4} = 0.3 \text{ a } 0.5 \qquad \frac{H}{D_t} = 1 \qquad \frac{C}{D_t} = \frac{1}{3}$$

$$\frac{W}{D_a} = \frac{1}{5} \qquad \frac{D_d}{D_a} = \frac{2}{3} \qquad \frac{L}{D_a} = \frac{1}{4} \qquad \frac{J}{D_t} = \frac{1}{12}$$

**Figura 12.** Proporciones geométricas para un sistema de agitación "normal".
**Fuente.** Procesos de transporte y operaciones unitarial, 1998, Geankoplis, C., Compañia editorial continental, S.A. de C.V. México.

### 2.4.1.3. Consumo de potencia

Un factor trascendental en el diseño de un recipiente de agitación es la potencia necesaria para mover el impulsor. Puesto que la potencia requerida para un sistema dado no puede predecirse teóricamente, se tienen correlaciones empíricas para estimar los requerimientos de potencia. La presencia o ausencia de turbulencia puede correlacionarse con el número de Reynolds del impulsor N'R, que se define como:

$$N_{Re} = \frac{D_a^2 N \rho}{\mu}$$

Donde:

*D* = *D*iámetro del impulsor (agitador) en m,

N = La velocidad de rotación en rev/s,

p = *L*a densidad del fluido en kg/m$^3$ y p la viscosidad en kg/mgs.

El flujo es laminar en el tanque cuando $N_{Re} < 10$, turbulento cuando $N_{Re} > 10000$ y para un intervalo de 10 a 10000, el flujo es de transición, mostrándose turbulento en el impulsor y laminar en la partes más recónditas del recipiente (Geankoplis, 1998, pág. 165).

El consumo de potencia se relaciona con la densidad del fluido *p*, su viscosidad μ, la velocidad de rotación *Ny* el diámetro del impulsor *Da,* por medio de gráficas de número de potencia *Np* en función de $N_{Re}$. El número de potencia es

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D_a^5}$$

Donde: *P* = potencia en J/s o W (Geankoplis, 1998, pág. 165).

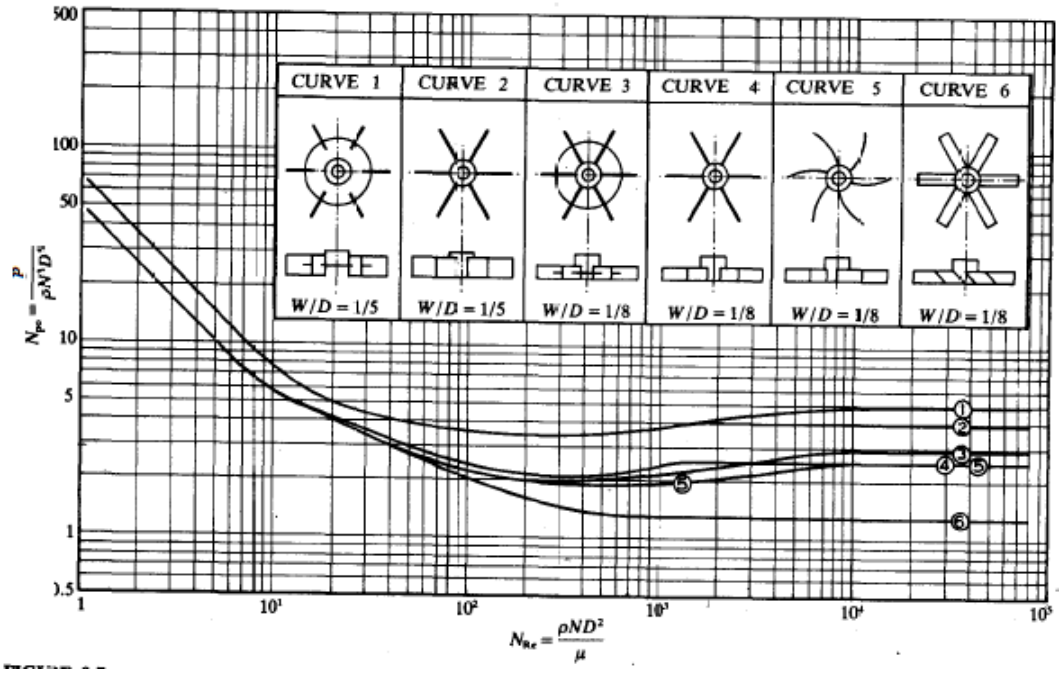



**Figura 13.** Correlación de potencia para diferentes turbinas.
**Fuente.** Transport phenoma a Unified, 1988, Robert S. Brodkey; Harry C. Hershey, The Ohio State University.

## 2.5. Evaporación

El principal objetivo de la evaporación consiste en concentrar una solución de manera que al enfriarse ésta se formen cristales que puedan separarse. El tipo de equipo usado depende tanto de la configuración de la superficie para la transferencia de calor como de los medios utilizados para lograr la agitación o circulación. Los extractos vegetales, suelen ser muy sensibles al calor y con frecuencia contienen partículas muy finas suspendidas en solución.

El grado de degradación de los materiales biológicos durante la evaporación está en función de la temperatura y del tiempo de procesamiento. Para mantener la temperatura baja, la evaporación debe hacerse al vacío, lo que reduce el punto de ebullición de la disolución. Para que el tiempo de contacto sea corto, el equipo debe tener un tiempo bajo de retención (tiempo de contacto) del material que se está evaporando (Geankoplis, 1998, pág. 545).

### 2.5.1. Factores de proceso

Las propiedades físicas y químicas de la solución que se está concentrando y del vapor que se separa tienen un efecto considerable sobre el tipo de evaporador que debe usarse y sobre la presión y la temperatura del proceso (Geankoplis, 1998, pág. 545).

#### 2.5.1.1. Concentración en el líquido

Por lo general, la alimentación líquida a un evaporador es bastante diluida, por lo que su viscosidad es bastante baja, similar a la del agua y se opera con coeficientes de transferencia de calor bastante altos. A medida que se verifica la evaporación, la solución se concentra y su viscosidad puede elevarse notablemente, causando una marcada disminución del coeficiente de transferencia de calor (Geankoplis, 1998, pág. 545).

#### 2.5.1.2. Solubilidad

A medida que se calienta la solución y aumenta la concentración del soluto, puede excederse el límite de solubilidad del material en solución y se formaran cristales. En la mayoría de los casos, la solubilidad del soluto aumenta con la temperatura y al enfriar a temperatura ambiente una solución concentrada caliente que proviene de un evaporador puede presentar una cristalización (Geankoplis, 1998, pág. 546).

#### 2.5.1.3. Sensibilidad térmica de los materiales

Muchos productos, en especial los alimentos y otros materiales biológicos, son sensibles a la temperatura y se degradan cuando ésta sube o el calentamiento es muy

prolongado. La cantidad de degradación está en función de la temperatura y del tiempo (Geankoplis, 1998, pág. 546).

**2.5.1.4. Presión y temperatura**

El punto de ebullición de la solución está relacionado con la presión del sistema. Cuanto más elevada sea la presión de operación del evaporador, mayor será la temperatura de ebullición. Además, la temperatura de ebullición también se eleva a medida que aumenta la concentración del material disuelto por la acción de la evaporación (Geankoplis, 1998, pág. 546).

**2.5.1.5. Formación de incrustaciones y materiales de construcción**

Algunas soluciones depositan materiales solidos llamados incrustaciones sobre las superficies de calentamiento. Estas incrustaciones se forman a causa de los productos de descomposición o por disminución de la solubilidad. El resultado es una reducción del coeficiente de transferencia de calor, lo que obliga a limpiar el evaporador. La selección de los materiales de construcción del evaporador tiene importancia en la prevención de la corrosión (Geankoplis, 1998, pág. 547).

**2.6. Cromatografía**

La cromatografía es como una técnica de separación basada en las diferentes afinidades de los componentes de una mezcla a dos fases inmiscibles. Una fase es estacionaria y la otra móvil.

**2.6.1. Clasificación de métodos cromatográficos**

La fase móvil de un sistema cromatográfico puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. La fase estacionaria es un sólido o un líquido. Estas opciones permiten una clasificación conveniente del proceso cromatográfico.

**Tabla 2.** Clasificación cromatográfica acorde al estado de agregación de la fase móvil

| Fase móvil | Fase estacionaria | Abreviación |
|---|---|---|
| Gas | Solido | GSC |
| Gas | Liquido | GLC, CG |
| Liquido | Solido | LSC, LC |
| Liquido | Liquido | LLC |
| Fluido supercrítico | Liquido (solido) | SFC |

Para la separación en GC, la muestra debe ser gaseosa o a temperaturas más altas lo suficientemente volátil como para ser evaporada. El único requisito para la cromatografía líquida (CL) es que la muestra sea al menos parcialmente soluble en la fase móvil.

**Fuente.** High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants (pag.10), 2006, Reich, E., & Schibli, A., Thieme Medical Publishers, Inc.

El sistema cromatográfico debe seleccionarse en función de la naturaleza química de los componentes de una mezcla. Pero existen otras soluciones técnicas como se ve.

**Tabla 3.** Técnicas en cromatografía

| Solución técnica | Ejemplos | Dimensión | Tamaño de la muestra (µL) |
|---|---|---|---|
| Cromatografía en columna | GC | 1-4 m | 1 - 10 |
| | LC | 1.5-25 cm | 5 - 25 |
| Cromatografía capilar | GC | 30-90 m | < 1 |
| | LC | 5-30 cm | 1 - 5 |
| Cromatografía plana | TLC | 20 x 20* cm | 5 - 50 |
| | HPTLC | 20 x 10 or | 0.1 - 5 |
| | | 10 x 10* cm | |
| | Papel | 20 x 20 cm | 5 - 10 |

* Puede ser de tamaños pequeños.

**Fuente**. High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants (pag.11), 2006, Reich, E., & Schibli, A., Thieme Medical Publishers, Inc.

#### 2.6.1.1. Cromatografía de capa fina (TLC)

En la cromatografía planar, la fase estacionaria es una capa plana (fina) recubierta sobre un soporte inerte. De ahí viene el término cromatografía de capa fina. En la cromatografía planar, los componentes de la muestra se dejan migrar durante un tiempo determinado. De esta manera, la separación se basa en una distancia de migración variable y tiempo fijo. En lugar del factor de capacidad k de la cromatografía en columna la cromatografía planar utiliza el valor de RF para expresar la retención relativa.

En comparación con la cromatografía en columna, la TLC ofrece varia ventajas:

* Resultados visuales
* Simplicidad
* Análisis paralelo de las muestras
* Resultados rápidos
* Flexibilidad
* Uso único de la placa
* Detección múltiple
* Eficiencia de costes

(Reich & Schibli, 2006)

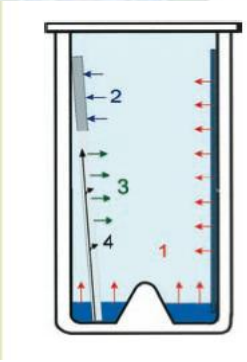
**2.6.1.1.1. Preparación de placas de capa fina**

El método consiste en aplicar el extracto de la planta en forma de una banda en una placa de TLC, junto con los compuestos de referencia adecuados. Las placas utilizadas en la TLC de preparación suelen tener un grosor de 0,5-1 mm (la TLC analítica utiliza placas de 0,25 mm de grosor). Hay que tener cuidado para evitar que la se aplique en una banda difusa, ya que esto disminuirá la resolución de los componentes. La placa se revela en un sistema de disolventes conocido para separar los componentes. Es muy importante tener en cuenta que un método de detección no destructivo.

El método de visualización más común es el uso de capas fluorescentes y el examen bajo luz ultravioleta, ya que así se detectan todos los de los compuestos. Del mismo modo, los compuestos fluorescentes pueden detectarse bajo luz UV si se utiliza una capa ordinaria. El TLC es el único método cromatográfico que ofrece la opción de presentar el resultado como una imagen. Un cromatograma puede verse como una secuencia de zonas oscuras, coloreadas o fluorescentes en la placa, y puede documentarse fácilmente como una imagen (Reich & Schibli, 2006)

**2.6.1.1.2. Desarrollo de la placa**

Durante el desarrollo de la placa, la fase móvil asciende a través de la capa, y a menos que la cámara esté totalmente saturada (lo que en la práctica no suele ocurrir), parte del el líquido que migra se evapora en la cámara. Esta evaporación está controlada no sólo por las presiones de vapor como en la saturación sino también por los equilibrios de adsorción de los componentes de la fase móvil. Durante la migración, los componentes de la fase móvil pueden ser separados por la fase estacionaria debido al diferente grado de interacción. En la mayoría de los casos, la TLC se desarrolla en un desequilibrio entre las fases estacionaria, móvil y gaseosa (Reich & Schibli, 2006).



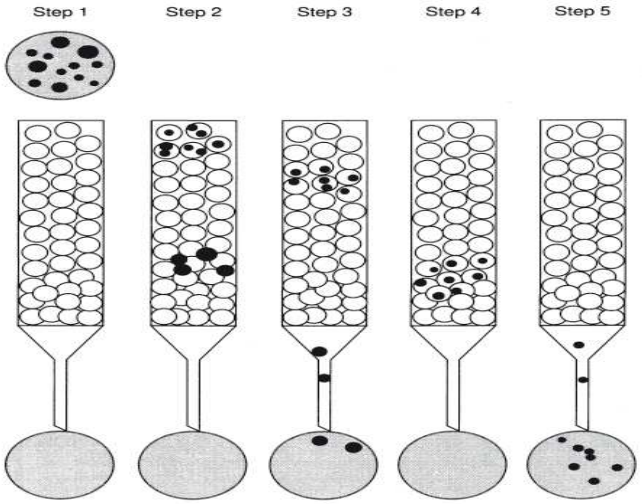

1 saturación; 2 preacondicionamiento; 3 evaporación; 4 formación de frentes secundarios.
**Figura 14.** Proceso de cámara de revelado
**Fuente.** High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants (pag.38), 2006, Reich, E., & Schibli, A., Thieme Medical Publishers, Inc.

### 2.6.1.2. Cromatografía en columna

Todas las cromatografías denominadas en columna se caracterizan por tener una fase estacionaria que se encuentra dentro de una columna de vidrio de 5 a 30 mm de diámetro por la que se hace pasar una fase móvil líquida o gaseosa que estará en permanente movimiento (Docencia, 2014).

#### 2.6.1.2.1. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión por tamaño también se conoce como filtración en gel o cromatografía de permeación en gel. La fase estacionaria consiste en el fluido contenido en una matriz polimérica tridimensional porosa con poros que no superan un determinado tamaño. La fase móvil es el fluido que se encuentra fuera de la matriz del gel. La separación se produce en función de los diferentes tamaños y, en cierta medida, de las diferentes formas de las moléculas disueltas en la fase móvil. Las moléculas grandes no pueden entrar en los poros, por lo que no pueden entrar en la fase estacionaria, y pasan a través del sistema cromatográfico muy rápidamente, las moléculas más pequeñas entran en más poros que las de mayor tamaño. Por lo tanto, el equilibrio es más favorable a la fase estacionaria para las moléculas más pequeñas y esféricas, con la consecuencia de que estos tipos de compuestos tienen los tiempos de retención más largos (Houghton & Raman, 1998).




● Moléculas mayores que el tamaño de los poros del gel; • moléculas más pequeñas que el tamaño de los poros del gel. Se emplea el mismo eluyente durante toda la separación. Paso1, el extracto que contiene una mezcla de moléculas de diferente tamaño se introduce en la columna. Paso2, las moléculas más grandes se mueven más rápidamente a través de la columna, ya que no pueden entrar en los poros del gel. Paso3, las moléculas más grandes se eluyen, las moléculas más pequeñas siguen moviéndose a través del gel, pero se mueven menos rápidamente, ya que entran en los poros del gel. En los pasos 4, 5, las moléculas más pequeñas se eluyen finalmente del gel.

**Figura 15.** Proceso de cromatografía de exclusión

**Fuente.** Laboratory Handbook for the fractionation of natural extracts (pag. ), Houghton, P., & Raman, A.,1998, Springer-Science+Business Media, B.V.

El material original desarrollado para la cromatografía de exclusión es llamado Sephadex™ y consistía en un gel de dextrano (glucosa polimérica 1-6 reticulado mediante epiclorhidrina). Ahora se han desarrollado muchos tipos diferentes de matrices que utilizan distintos tipos de polímero para poder utilizar fases móviles líquidas relativamente no polares. Los geles similares a los utilizados en el intercambio iónico (pero que no contienen ligandos cargados) y los geles de dextrano alquilado, por ejemplo, Sephadex LH-20™, se utilizan con frecuencia para para este fin (Houghton & Raman, 1998).

**Tabla 4.** Selección de fases estacionarias de cromatografía de exclusión.

| **Nombre del gel** | **Tipo de gel** | **Condiciones especiales** | **Rango de fracción (en Daltons x $10^3$)** |
|---|---|---|---|
| Sephadex G-10 | Dextrano reticulado con epiclorhidrina | Compuestos solubles en agua | <0.7 |
| Sephadex G-25 | Dextrano reticulado con epiclorhidrina | Compuestos solubles en agua | 0.1-5.0 |
| Sephadex G-100 | Dextrano reticulado con epiclorhidrina | Compuestos solubles en agua | 1-150 |
| PDX GF-25 | Dextrano reticulado | Compuestos solubles en agua | 1.0-5.0 |
| Beaded cellulose | | Compuestos solubles en agua | 100-3000 |
| Sephadex LH-20 | Hidroxipropil dextrano | Compuestos menos polares | <1.5 |

**Fuente**. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts, Peter J. Houghton and Amala Raman, *1998,* Springer-Science+Business Media, B.V

**2.6.1.2.2. Cromatografía de fase reversa (C18)**

El mecanismo de separación en una columna de fase reversa C18 depende de interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de soluto en la fase móvil y el ligando hidrofóbico inmovilizado en la fase estacionaria. La naturaleza actual de las interacciones de unión hidrofóbica asume que la interacción de unión es el resultado de un efecto entrópico favorable. Las condiciones iniciales de unión de la fase móvil usadas en la cromatografía de fase reversa son acuosas lo cual indica un grado alto de estructuras de agua organizadas alrededor de las moléculas de soluto y el ligando inmovilizado. A medida que el soluto se une al ligando hidrofóbico inmovilizado disminuye el área hidrofóbica expuesta hacia el

disolvente. Así, el grado de organización de la estructura de agua disminuye con un favorable aumento de entropía en el sistema (Docencia, 2014).

#### 2.6.1.3. Cromatografía de alta eficiencia HPLC

La cromatografía se ha transformado de una técnica esencialmente por lotes a un método automatizado e instrumental, como la HPLC. Aunque la HPLC analítica es útil para obtener información sobre las mezclas de muestras y no depende de su recuperación, el objetivo de la HPLC es aislar y purificar los compuestos objetivos utilizando grandes columnas, alta presión, gran carga de muestra y alto caudal. Se compone de un número de partes esenciales, incluyendo el controlador del sistema, bombas, desgasificador, automuestreador, columna de guarda, columna, detectores y colectores de fracciones. Las muestras se someten a columnas llenas de varias fases estacionarias (Rostango & Prado, 2013).

## 2.7. Diseño experimental

### 2.7.1. Experimento

Un *experimento* es un cambio en las condiciones de operación de un sistema o proceso, que se hace con el objetivo de medir el efecto del cambio sobre una o varias propiedades del producto o resultado. Asimismo, permite aumentar el conocimiento acerca del sistema (Gutiérrez Pulido, 2008).

### 2.7.2. Concepto básico del diseño de experimentos

El *diseño de experimentos* es la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso, por medio de pruebas planeadas adecuadamente. Esta metodología se ha ido consolidando como un conjunto de técnicas estadísticas y de ingeniería, que permiten entender mejor situaciones complejas de relación causa-efecto (Gutiérrez Pulido, 2008).

### 2.7.3. Recomendaciones para abordar un estudio experimental

Para que el experimento sea exitoso, se deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

1. *Conocimiento claro del material experimental.* Es necesario abordar todas las ideas sobre los objetivos del trabajo. Un adecuado conocimiento del estado del problema frecuentemente contribuye a un mejor entendimiento del fenómeno y a una solución del problema.

2. *Escogencia de factores y niveles.* El experimentador debe seleccionar las variables independientes o factores a ser estudiados, estos pueden ser cuantitativos o cualitativos. Es conveniente seleccionar los rangos de variación de los factores y el número de niveles a

considerar, los cuales pueden ser predeterminados o escogidos aleatoriamente del conjunto de los posibles niveles.

3. *Selección de las variables respuesta según los objetivos.* En la escogencia de la variable respuesta o variable dependiente, el experimentador ha de estar seguro que la respuesta a medir realmente provee información sobre el problema de interés.

4. *Selección del diseño experimental.* Este paso es muy importante en el proceso de investigación. Se debe indicar la diferencia en la respuesta verdadera (qué tan lejos se admite la realidad de lo observado) que se desea detectar y la magnitud de los riesgos tolerados (grado de confiabilidad), luego escoger un tamaño de muestra apropiado (replicaciones). Es procedente señalar también el orden de recolección de los datos y el método de aleatorización a emplear.

5. *Conducción del experimento*. Es el proceso de recolección de datos. Se entenderá que en el proceso haya un ajuste al plan (control). La mayoría de las veces la realización de un experimento no es lo suficientemente fiel al proyecto de investigación porque surgen situaciones no consideradas previamente. En todos los casos, se debe evaluar si estos imprevistos alteran los propósitos del ensayo.

6. *Análisis de datos*. Las variables que intervienen o, mejor, que se procura sean consideradas en un ensayo pueden relacionarse matemáticamente de alguna forma. Existen técnicas estadísticas, como el análisis de regresión, que suministran estas relaciones. Para la estimación del modelo y el análisis estadístico de los datos, se debe tener en cuenta:

a) Estimación de los parámetros del modelo. Estimar mediante los métodos de mínimos cuadrados o máxima verosimilitud los parámetros asociados con el modelo. b) La teoría de estimabilidad. Conocer los principales criterios para caracterizar las funciones estimables.

c) Pruebas de hipótesis. Conocer la estructura distribucional de los estadísticos de prueba para tomar decisiones sobre las hipótesis de interés. Existen diferentes procedimientos y paquetes estadísticos que facilitan el análisis de los datos. Un paquete estadístico es un conjunto de programas elaborados para el procesamiento de información, los cuales se manipulan por medio de una serie de instrucciones y comandos dirigidos a resolver problemas de modelamiento estadístico. Entre los paquetes estadísticos de más amplia difusión en el área experimental se pueden mencionar: el SPSS (Statistical Package for Social Science), SAS (Statistical Analysis System), BMDP (Biomedical Package), MINITAB y Design Expert.

7. *Conclusiones y recomendaciones.* Hecho el análisis de los datos, el experimentador puede extraer conclusiones sobre los resultados. Las recomendaciones deben hacerse con base en los resultados (Melo, López, & Melo, 2020).

### 2.7.4. Diseño factorial

La matriz de diseño o *arreglo factorial* es el conjunto de puntos experimentales o tratamientos que pueden formarse considerando todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores. Observe que en el nombre del diseño factorial va implícita el número de tratamientos que lo componen. Para obtener el número de corridas experimentales se multiplica el número de tratamientos por el número de *réplicas*, donde una de éstas se lleva a cabo cada vez que se corre el arreglo completo (Gutiérrez Pulido, 2008).

#### 2.7.4.1. Diseño factorial $2^K$

La familia de diseños *factoriales* $2^K$ (k factores con dos niveles de prueba cada uno), es una de las familias de diseño de más impacto en la industria y en la investigación, debido a su eficacia y versatibilidad. Los factoriales $2^K$ completos son útiles principalmente cuando el número de factores a estudiar está entre dos y cinco, rango en el cual su tamaño se encuentra entre cuatro y 32 tratamientos; esta cantidad es manejable en muchas situaciones experimentales. Con un diseño $2^2$ se estudia el efecto de *dos* factores en *dos* niveles en cada uno. Cada replica de este diseño consiste de 2 × 2 = 4 combinaciones o tratamientos diferentes y en el *diseño factorial* $2^3$ se estudian *tres* factores en *dos* niveles cada uno. Consta de $2^3 = 2 \times 2 \times 2 = 8$ tratamientos diferentes. La región experimental del diseño $2^2$ se representa de manera geométrica en un cuadrado y en cambio en el diseño $2^3$ ahora es un cubo regular centrado en el origen (0, 0, 0), cuyos vértices son los ocho tratamientos. (Gutiérrez Pulido, 2008).

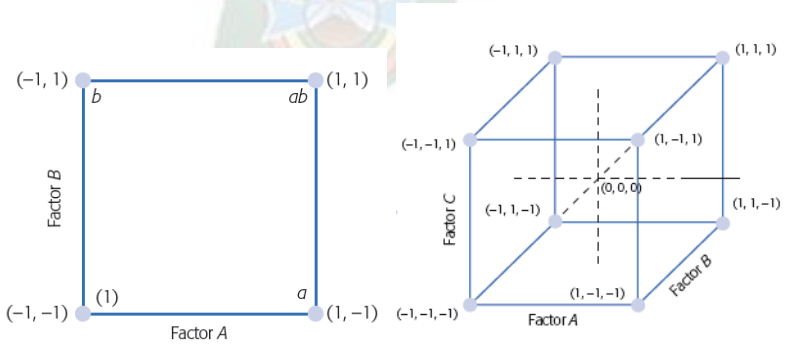



**Figura 16.** Representación geométrica de diseño factorial $2^2$ y $2^3$.
**Fuente.** Análisis y diseño de experimentos (Pag. 169,184), Gutiérrez Pulido Humberto, 2008, McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.

### 2.8.4.2. Superficies de respuesta

La metodología de superficies de respuesta (MSR) tuvo sus desarrollos en el área de la ingeniería química e industrial, particularmente cuando se tienen en cuenta varias variables que influyen en un proceso de producción.

Este método es una colección de técnicas de diseño experimental, métodos de regresión y optimización de procesos. También son importantes en el diseño, desarrollo y formulación de nuevos productos así como para mejorar los productos existentes.

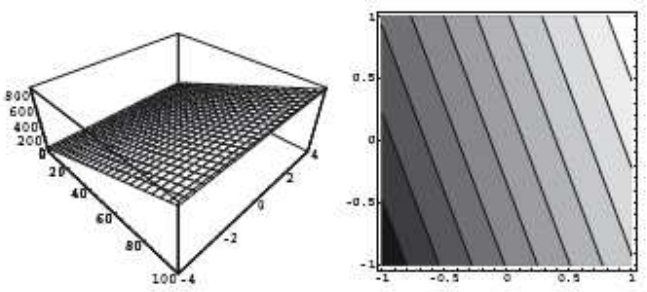



**Figura 17.** Superficie de respuesta y gráfico de contorno para el modelo de primer orden.
**Fuente.** Adaptada de Superficie de respuesta y gráfico para un modelo de primer orden ($50+8X_1+3X_2$) de Diseño de experimentos métodos y aplicaciones (Pag. 541), Melo, Oscar O.; López, Luis A.; Melo, Sandra E., 2020, Universidad Nacional de Colombia.

La base de la metodología de superficies de respuesta (MSR) es encontrar el nivel o niveles óptimos de un factor o factores sobre una respuesta. En general, se hacen pocos experimentos y se enfoca la atención sobre aquellos niveles en que la respuesta de interés es óptima, lo que implica una experimentación secuencial (Melo, López, & Melo, 2020).

# CAPÍTULO III

# METODOLOGIA DE LA EXPERIMENTACIÓN

# CAPITULO III
# METODOLOGÍA DE LA EXPERIMENTACIÓN

Para la ejecución del presente proyecto se realizan diferentes pruebas con el fin de cumplir los objetivos planteados de acuerdo al siguiente Flujograma:

**Figura 18.** Proceso general
**Fuente.** Elaboración propia.

## 3.1. Caracterización de la materia prima

### 3.1.1. Recolección de materia prima

La materia prima es recolectada de la zona Santa Bárbara (provincia Murillo) del departamento de La Paz. Para tal recolección se prosigue de acuerdo a las normas: Norma Boliviana NB/ISO 874:1980, Norma Técnica Colombiana NTC 4580 y NTC 5166 de las cuales se adapta el procedimiento de recolección que se muestra en la siguiente Flujograma:

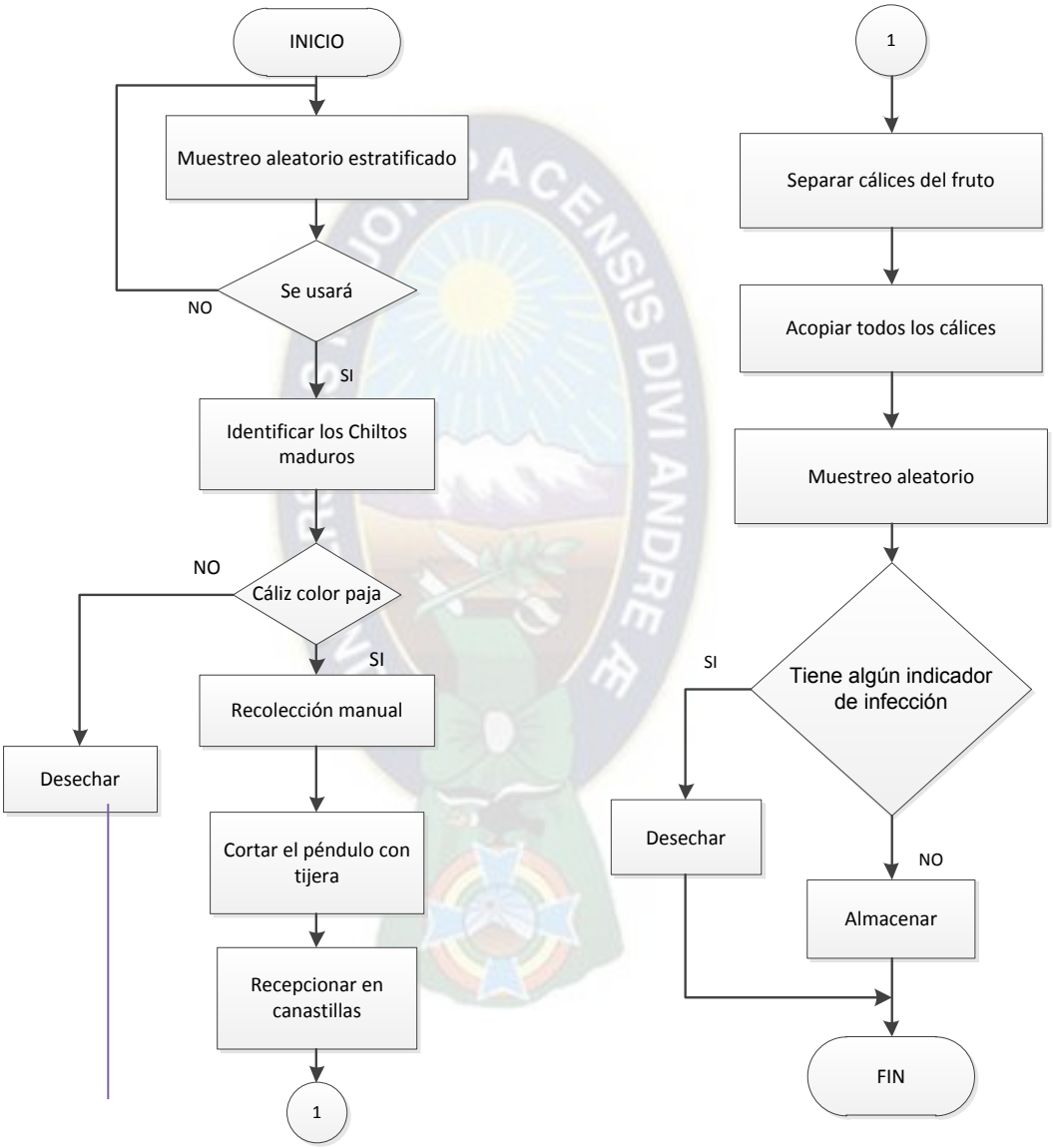



**Figura 19.** Procedimiento para el muestreo y recolección del material vegetal.
**Fuente.** Modificado de la norma boliviana NB/ISO 874:1980, Normas Técnicas Colombianas NTC4580 y NTC5166. Transcripción propia.

### 3.1.2. Identificación botánica en el Herbario Nacional

Para la identificación botánica se elabora un herbario que es entregado al Herbario Nacional de Bolivia. El procedimiento de elaboración y el aval de identificación otorgada por el Herbario Nacional de Bolivia se encuentran en el Anexo B.

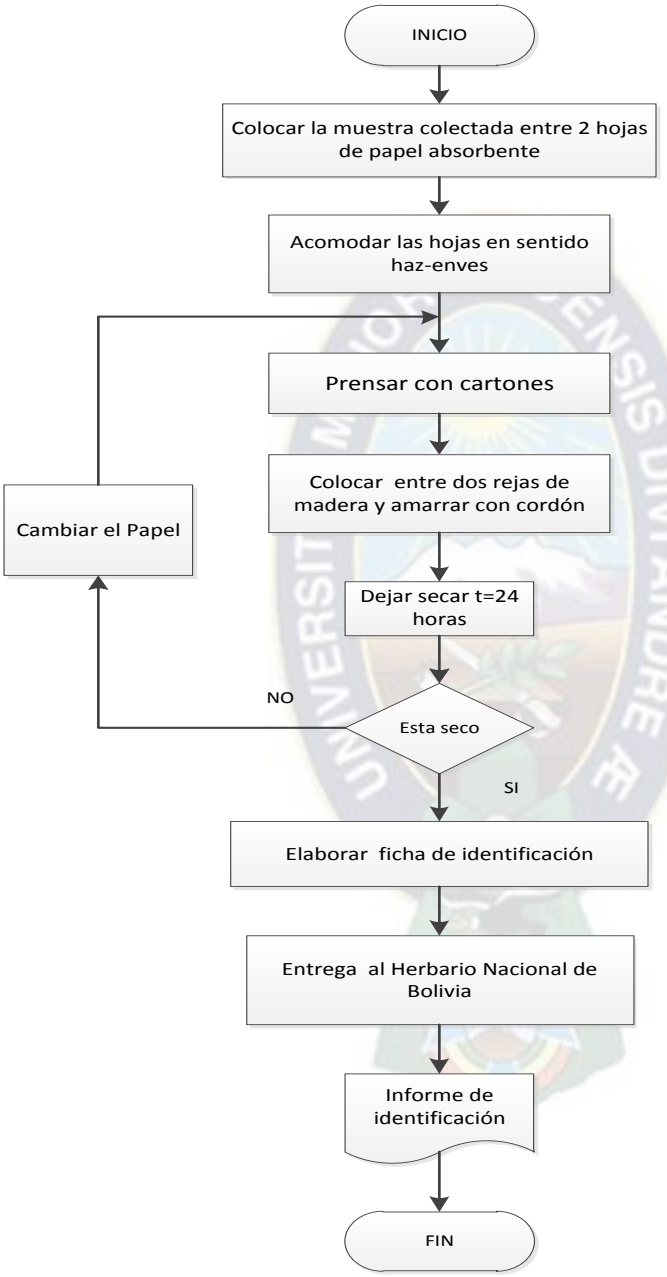



**Figura 20.** Procedimiento de elaboración de herbario para la identificación de Chilto.
**Fuente.** Información otorgada por el Herbario Nacional de Bolivia. Transcripción propia.

### 3.1.3. Secado de materia prima

Para el procedimiento de secado de la materia prima se procede de acuerdo al siguiente flujograma:

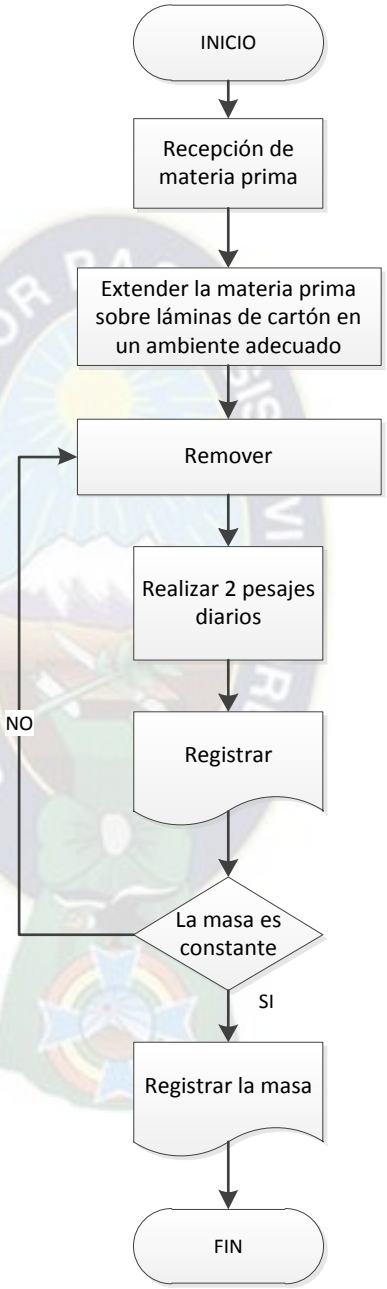



**Figura 21.** Procedimiento de Secado de Materia prima
**Fuente.** Metodología del Instituto de investigaciones Químicas IIQ. Transcripción propia.

### 3.1.4. Determinación de propiedades físicas y químicas

La determinación de las propiedades físicas y químicas se realiza sobre la muestra de materia prima seca. Las propiedades a determinar son:

a) **Densidad del solvente**.- Se determina la densidad del solvente mediante la técnica del picnómetro adaptado de la guía OIML.G-14 de la Organización Internacional de Metrología Legal como se puede observar en el siguiente flujograma:

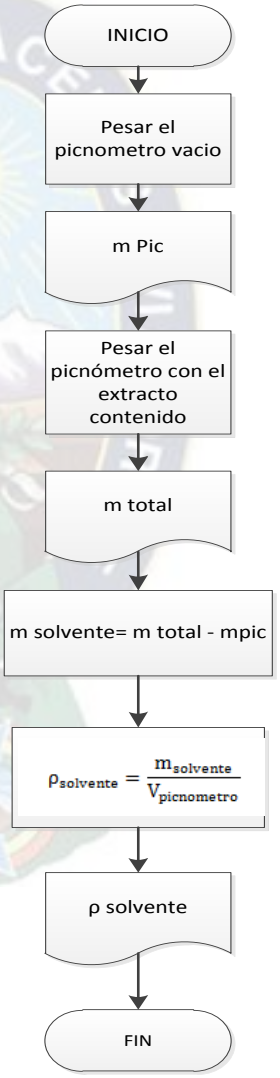



**Figura 22.** Procedimiento de determinación de densidad de solvente
**Fuente.** Guía OIML.G-14 de la Organización Internacional de Metrología Legal. Transcripción propia.

b) **Densidad de sólido.-** Se determina la densidad del solido en forma experimental con uso de probeta de acuerdo al siguiente flujograma.

**Figura 23.** Procedimiento de determinación de densidad de sólido.
**Fuente.** Metodología del Instituto de investigaciones Químicas IIQ. Transcripción propia.

c) **Densidad de extracto**.- Se determina la densidad del extracto mediante la técnica del picnómetro adaptado de la guía OIML.G-14 de la Organización Internacional de Metrología Legal como se puede observar en el siguiente flujograma:

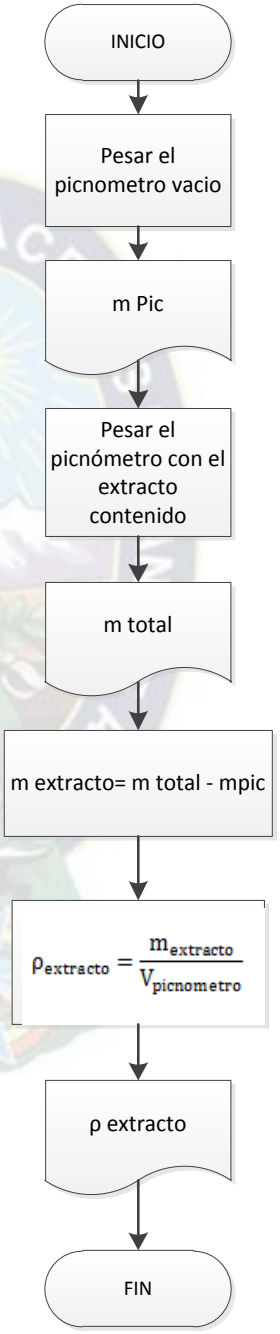



**Figura 24.** Procedimiento de determinación de densidad de extracto.
**Fuente.** Guía OIML.G-14 de la Organización Internacional de Metrología Legal. Transcripción propia.

d) **Viscosidad del extracto.-** La viscosidad se determina de forma experimental aplicando la ley de Stokes.

**Figura 25**. Procedimiento de determinación de Viscosidad.
**Fuente.** Metodología del Instituto de investigaciones Químicas IIQ. Transcripción propia.
.

e) **Determinación de cenizas.-** La determinación de cenizas se realiza mediante la norma Boliviana NB/ISO 746:1996, como se observa en el siguiente flujograma.

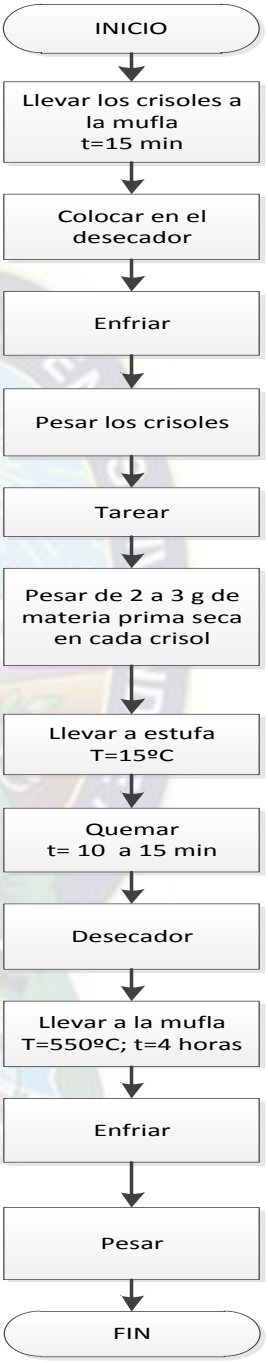



**Figura 26.** Procedimiento de determinación de cenizas.
**Fuente.** Modificado de la norma boliviana NB/ISO 746:1996. Transcripción propia.

f) **Determinación del valor de pH.-** Se determina el PH del sustrato mediante el uso de papel pH indicativo.

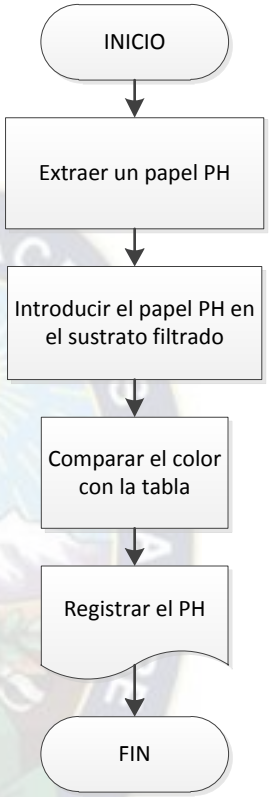



**Figura 27**. Procedimiento de determinación de PH del sustrato.
**Fuente.** Metodología del Instituto de investigaciones Químicas IIQ. Transcripción propia

### 3.1.5. Determinación de compuestos

#### 3.1.5.1. Estudio Fitoquímico

La finalidad de estas pruebas es determinar compuestos específicos presentes en la materia prima mediante un Screening fitoquímico. Las pruebas se encuentran a mayor detalle en el anexo C.

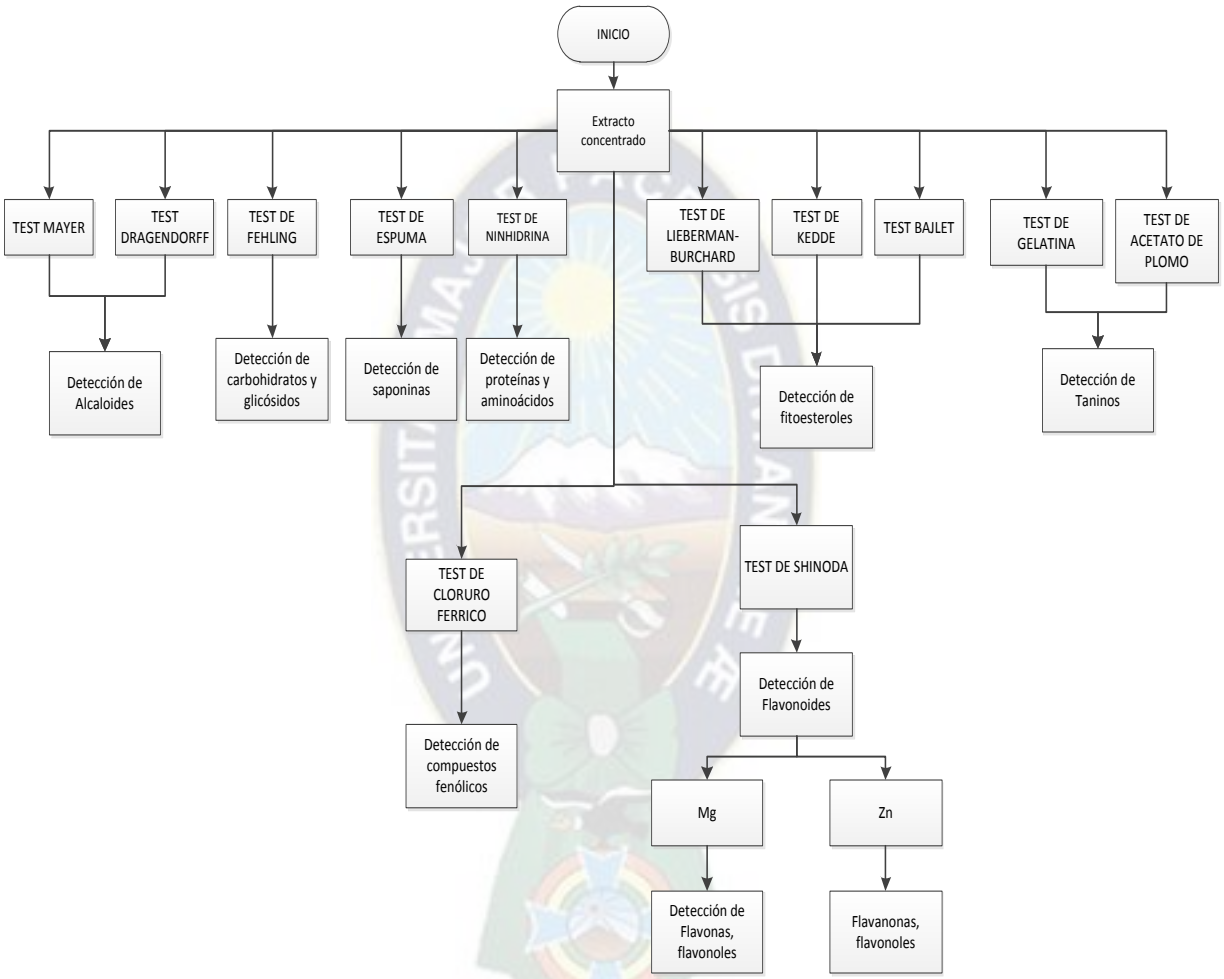



**Figura 28.** Proceso de Screening fitoquímico para determinar la presencia de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal.
**Fuente.** Metodología del Instituto de investigaciones Químicas IIQ. Transcripción propia.

## 3.2. Identificación de variables que influyen en el proceso para la obtención de sustrato de cáliz

### 3.2.1. Identificación de variables del proceso

Para la selección de variables se utiliza el diagrama de Ishikawa siguiente:

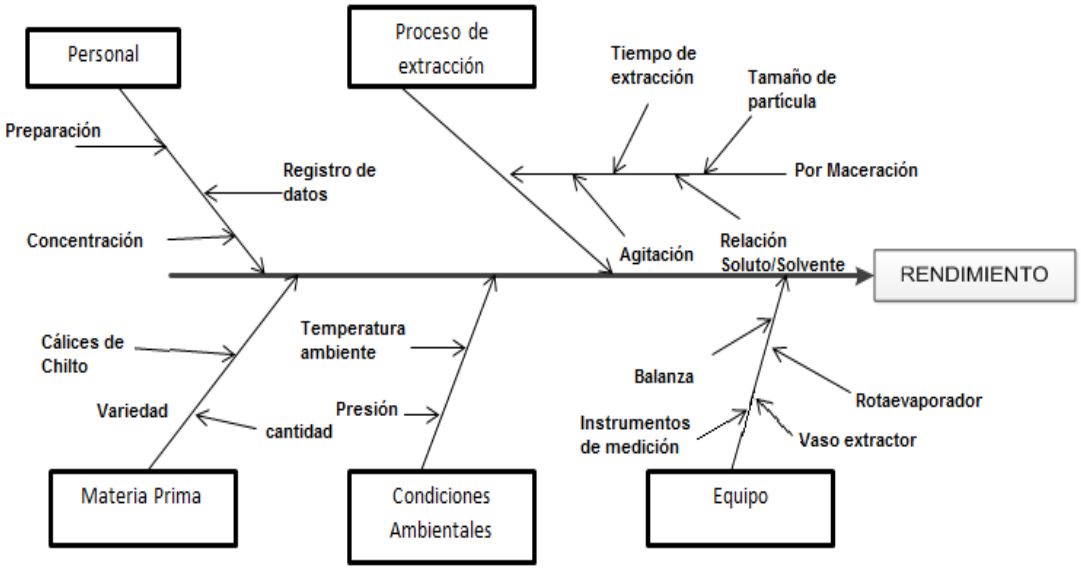



**Figura 29.** Diagrama de Ishikawa
**Fuente.** Elaboración propia

Las variables independientes del proceso son las siguientes:

- Tamaño de partícula
- Tiempo de extracción
- Relación soluto/solvente
- Agitación
- Temperatura

La variable dependiente del proceso:

- Rendimiento.

### 3.2.2. Metodología para la selección de variables de proceso

Se realiza una serie de pruebas preliminares para identificar las variables que sean más influyentes en el proceso de extracción.

#### 3.2.2.1. Determinación del efecto del tamaño de partícula

##### 3.2.2.1.1. Molienda y tamizado de la materia prima

Para este proceso la materia prima es molida y tamizada para aumentar la superficie de contacto.

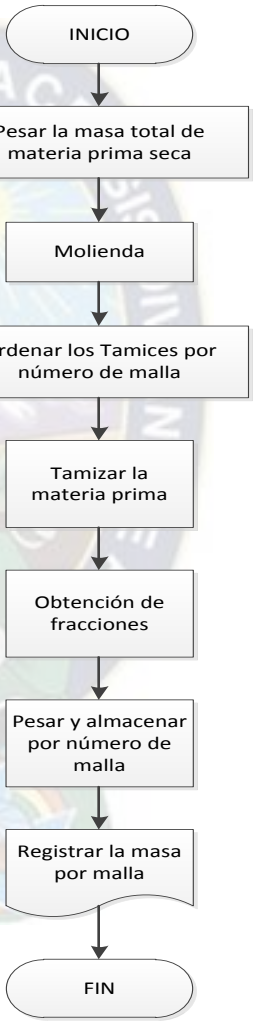



**Figura 30.** Proceso de molienda y tamizado de materia prima
**Fuente.** Metodología del Instituto de investigaciones Químicas IIQ. Transcripción propia.

Las características de tamaño de tamices se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 5.** Detalle de tamices

| Numero de malla | Tamaño de partícula (micrón) | Apertura (mm) |
|---|---|---|
| 35 | 500 | 0,500 |
| 40 | 425 | 0,425 |
| 45 | 355 | 0,355 |
| 50 | 300 | 0,300 |
| 60 | 250 | 0,250 |

Nota. mm= milímetros.
**Fuente.** Elaboración propia.

La prueba se realiza de acuerdo a las especificaciones que se detalla en el siguientes flujograma:

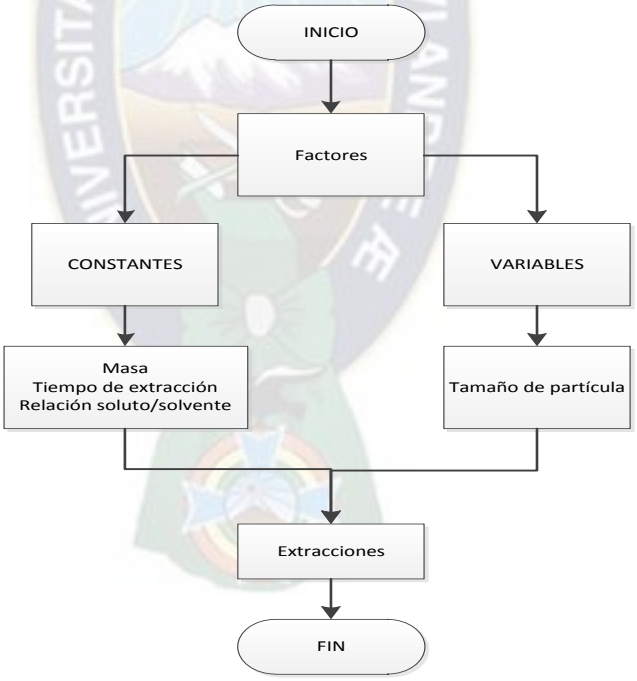



**Figura 31.** Flujograma para efecto de tamaño de partícula
**Fuente.** Elaboración propia.

### 3.2.2.2. Determinación del efecto de la agitación

La prueba se realiza de acuerdo a las especificaciones que se detalla en el siguiente flujograma:

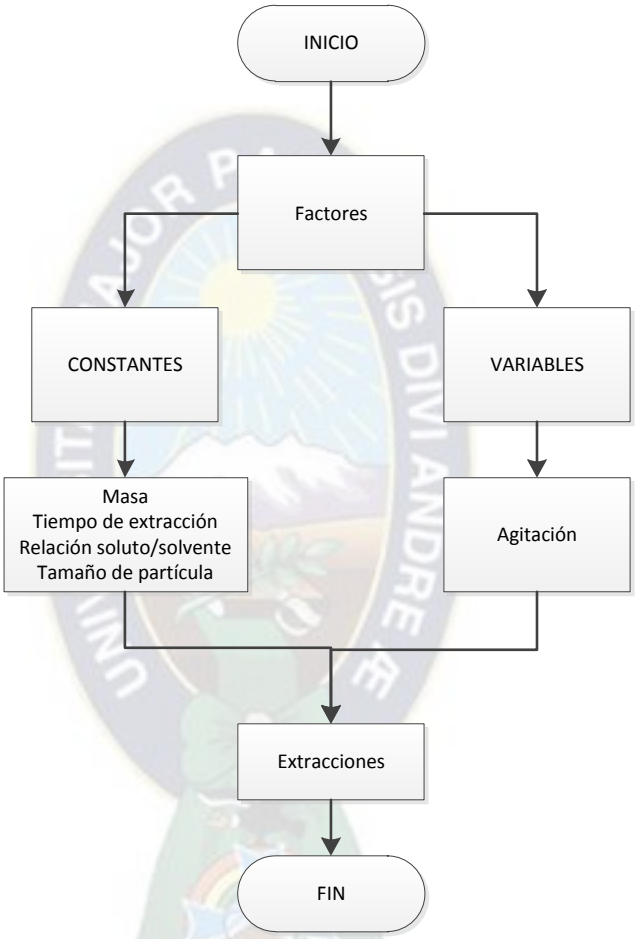



**Figura 32.** Flujograma para efecto de agitación
**Fuente.** Elaboración propia.

### 3.2.2.3. Determinación del efecto de la relación soluto/solvente

#### 3.2.2.3.1. Selección del Solvente

La finalidad de estas pruebas es seleccionar el mejor solvente para la extracción.

**Figura 33.** Proceso de elección de Solvente.
**Fuente.** Metodología del Instituto de investigaciones Químicas IIQ. Transcripción propia.

La prueba para la determinación del efecto de la relación soluto/solvente se realiza de acuerdo a las especificaciones que se detalla en el siguiente flujograma:

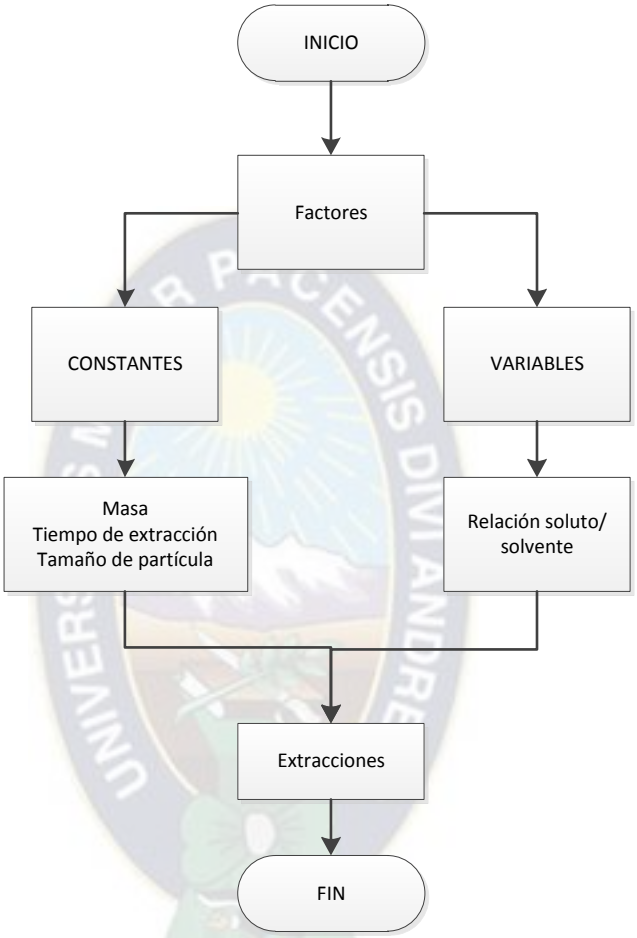



**Figura 34.** Flujograma para efecto de la relación soluto/solvente
**Fuente.** Elaboración Propia.

### 3.2.2.4. Determinación del efecto del tiempo de extracción

La prueba se realiza de acuerdo a las especificaciones que se detalla en el siguientes flujograma:

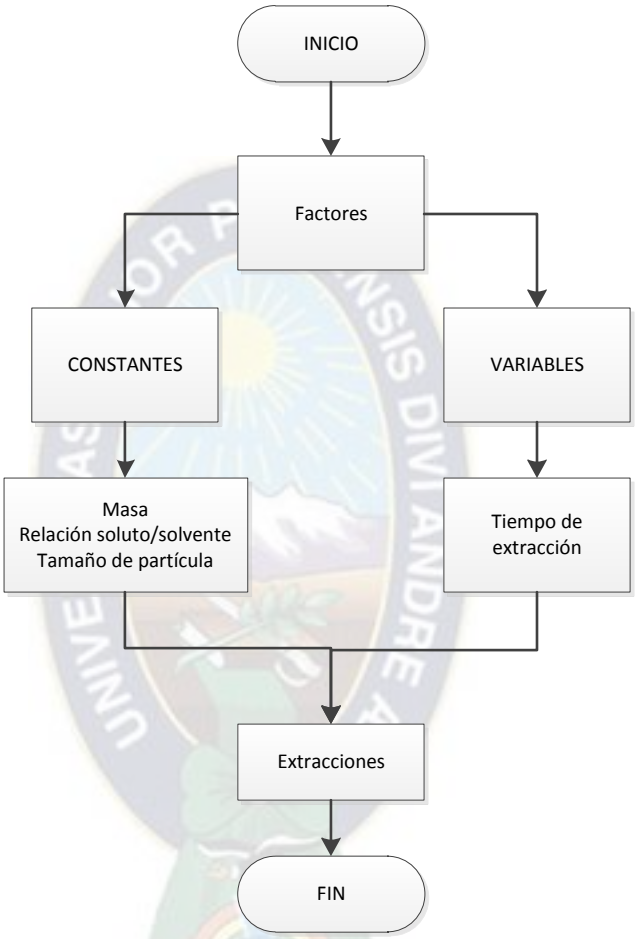



**Figura 35.** Flujograma para efecto del tiempo de extracción
**Fuente.** Elaboración propia.

### 3.3. Identificación de las variables de mayor influencia en el proceso a través del diseño experimental

Se realiza el diseño experimental mediante el análisis con el programa Desing Expert, se utiliza los límites superior e inferior que se identificaron como las variables del proceso y la interacción de las variables del proceso.

**Figura 36.** Procedimiento de Diseño experimental.
**Fuente.** Elaboración propia.

## 3.4. Caracterización del producto final

### 3.4.1. Separación de compuestos

Para la separación de compuestos presentes en la materia prima y su purificación, se realiza la aplicación de diferentes métodos cromatográficos de acuerdo al procedimiento que se detalla en el siguiente flujograma:

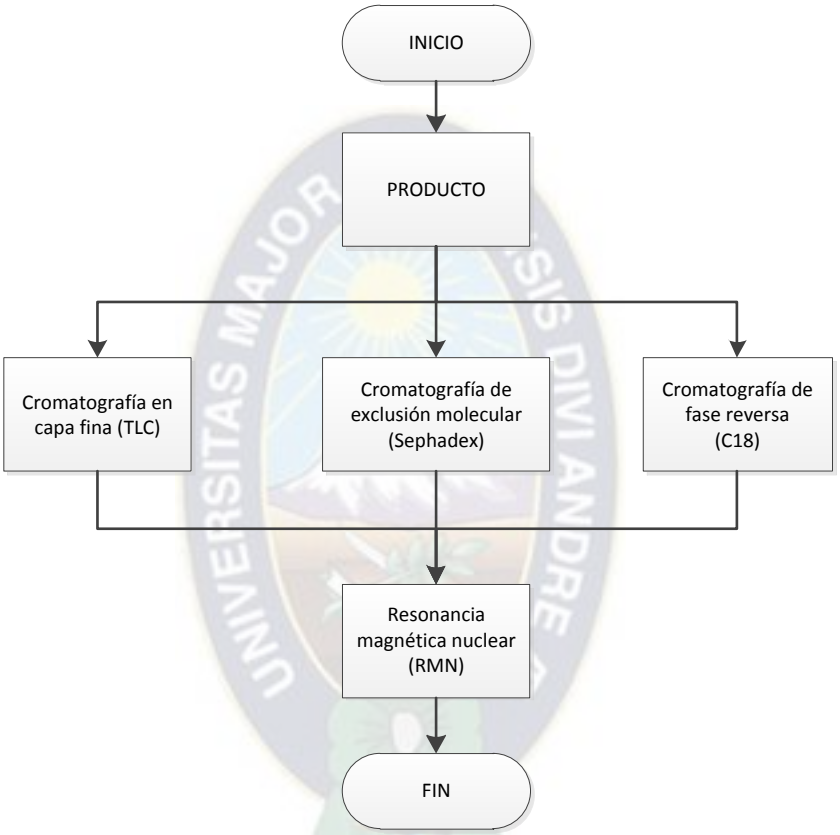



**Figura 37.** Flujograma de proceso de identificación del producto
**Fuente.** Elaboración propia

### 3.4.2. Método cuantitativo

Tiene la finalidad de determinar la concentración del flavonoides en el extracto, mediante el proceso que se detalla en el siguiente flujograma:

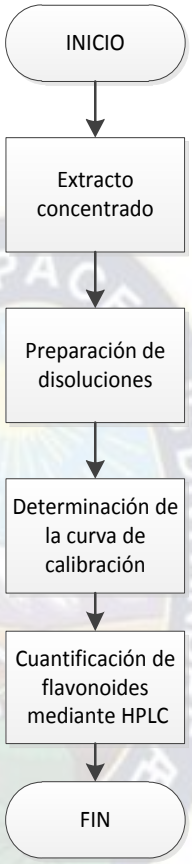



**Figura 38.** Determinación cuantitativa de Flavonoides
**Fuente.** Elaboración propia.

### 3.4.3. Pruebas Biológicas

La determinación de las pruebas Biológicas se realiza en la Unidad de Vigilancia Ambiental y Genotoxicología del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Mayor de San Andrés sobre la muestra de sustrato de cálices seco y molécula extraída.

# CAPÍTULO IV

# RESULTADOS

# CAPITULO IV
# RESULTADOS

## 4.1. Caracterización de la materia prima

### 4.1.1. Recolección de materia prima

De acuerdo a la norma la recolección se realiza 2 veces por semana ya que el chilto presenta crecimiento indeterminado (siempre se encuentran frutos en diferentes estados de desarrollo o maduración en la planta). Recolectando un total 16 kilos de chiltos (fruto y cáliz) para obtener 500 g de cáliz.

**Figura 39.** Recolección de chilto.
**Fuente.** Elaboración propia.

### 4.1.2. Identificación botánica en el Herbario Nacional

La materia prima en estudio se identifica por el Herbario Nacional de Bolivia como ***Physalis peruviana L***. (El aval se encuentra en el anexo B)

**Figura 40.** Physalis peruviana L.
**Fuente.** Elaboración propia.

### 4.1.3. Secado de materia prima

La materia prima se pesa dos veces al día, en un ambiente cerrado y al abrigo de la luz solar. A partir del sexto día se observa un peso constante.

Para el porcentaje de humedad inicial:

$$m_{H_2O} = m_o - m_f$$

Donde:

$m_o$= masa inicial

$m_f$= masa final

$m_{H_2O}$= masa de agua

Reemplazando

$$m_{H_2O} = 500 - 388{,}055 = 111{,}940g$$

$$\%_{H_2O} = \frac{m_{H_2O}}{m\ inicial_{caliz}} * 100\%$$

$$\%_{H_2O(inicial)} = \frac{111{,}940}{500{,}000} * 100\% = 22{,}389\%$$

$$\%_{H_2O(final)} = \frac{0{,}045}{500{,}000} * 100\% = 0{,}009\%$$

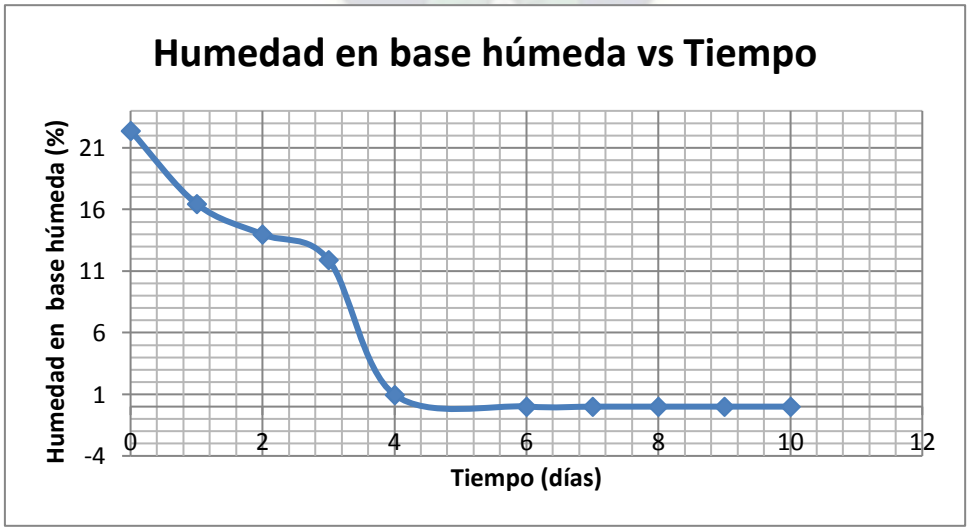



**Figura 41.** Humedad en base húmeda vs Tiempo
**Fuente.** Elaboración propia

### 4.1.4. Determinación de propiedades físicas y químicas

**Picnómetro de vacío** **Picnómetro con solvente** **Picnómetro con extracto**

**Figura 42**. Determinación de densidades.

**Fuente.** Elaboración propia.

**a) Densidad del solvente**

La masa del extracto contenida en un picnómetro es $m_{solvente} = 4{,}308\ g$

Volumen del picnómetro es $V_{picnometro} = 5\ ml$

Por tanto la densidad del solvente es:

$$\rho_{solvente} = 0{,}862\ {}^{g}/_{ml}$$

**b) Densidad de sólido**

La masa del solido contenido en una probeta $m_{PCMs} = 36{,}200\ g$

Volumen de la probeta $V_{probeta} = 10\ ml$

Por tanto la densidad de sólido es:

$$\rho_{solido} = 3{,}620\ {}^{g}/_{ml}$$

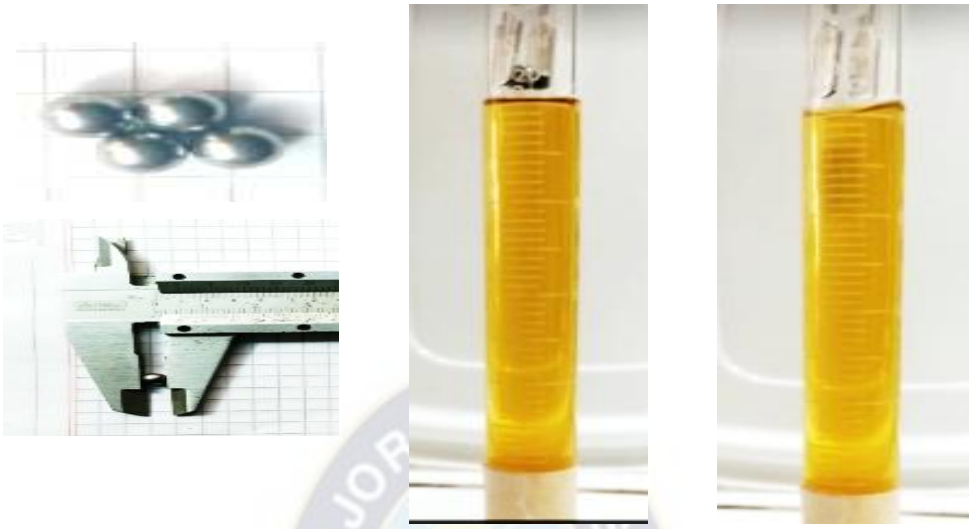
**c) Densidad de extracto**

La masa del extracto contenida en un picnómetro es $m_{extracto} = 4{,}265\ g$

Volumen del picnómetro $V_{picnometro} = 5\ ml$

Por tanto la densidad del extracto es:

$$\rho_{extracto} = 0{,}850\ {}^{g}/_{ml}$$



**Perdigones y medición** **Inicio de la prueba** **Final de la prueba**

**Figura 43.** Determinación de la viscosidad
**Fuente.** Elaboración propia.

**d) Viscosidad del extracto.-**

Para obtener la viscosidad se utiliza una probeta de 10 ml.

$$D_{probeta} = 14\ mm$$

Se utiliza un perdigón con las siguientes características:

**Tabla 6.**Características del perdigón.

| | **Masa de la esfera (g)** | **Diámetro de la esfera (mm)** |
|---|---|---|
| | 0,509 | 5,060 |
| | 0,508 | 5,000 |
| | 0,509 | 5,060 |
| **Promedio** | **0,508** | **5,040** |

**Fuente.** Elaboración propia

Dando los siguientes resultados:

**Tabla 7.** Resultados de prueba de viscosidad

| | **Distancia (cm)** | **Tiempo de caída (s)** | **Viscosidad (Pa*s)** |
|---|---|---|---|
| | 7,800 | 2,700 | 0,094 |
| | | 3,000 | 0,095 |
| | | 3,000 | 0,094 |
| **Promedio** | **7,800** | **2,900** | **0,094** |

**Fuente.** Elaboración propia

**e) Determinación de cenizas.-**

**Crisoles con muestra en la estufa para su quema**

**Crisoles con la muestra ya en cenizas**

**Figura 44.** Imágenes del proceso de determinación de cenizas.
**Fuente.** Elaboración propia.

Se realiza el cálculo mediante:

$$C = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} * 100$$

Donde:

C= Cenizas en % en masa

$M_0$= Masa del crisol vacío

$M_1$= Masa del crisol con la porción de la muestra de ensayo antes de ser calcinado (g)

$M_2$= Masa del crisol con la porción de la muestra de ensayo después de ser calcinado.

**Tabla 8.** Resultados de la determinación de cenizas

| Mo (g) | M1 (g) | M2(g) | C | %C |
|---|---|---|---|---|
| 38,490 | 40,858 | 38,625 | 0,057 | 5,730 |
| 38,317 | 40,359 | 38,426 | 0,054 | 5,370 |
| 37,810 | 39,846 | 37,919 | 0,054 | 5,370 |
| | | | **PROMEDIO** | **5,490** |

**Fuente.** Elaboración propia

**f) Determinación del valor de pH.-**

Dada la coloración obtenida del papel pH podemos observar que corresponde a un pH=5 para el sustrato.

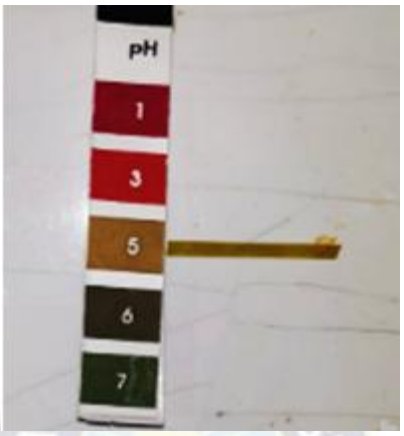



**Figura 45.** Determinación de pH
**Fuente.** Elaboración propia

En resumen tenemos:

**Tabla 9.** Resumen de propiedades físicas y químicas

| PARAMETRO | VALOR |
|---|---|
| Densidad del solvente | 0,862 g/ml |
| Densidad del solido | 3,620g/ml |
| Densidad del extracto | 0,850g/ml |
| Viscosidad | 0,094 Pa*s |
| Cenizas | 5,490% |
| pH | 5,000 |

**Fuente.** Elaboración propia

### 4.1.5. Determinación de compuestos

#### 4.1.5.1. Estudio Fitoquímico

De acuerdo al proceso estandarizado en el instituto de Investigaciones Químicas (IIQ) se realiza las pruebas para la determinación de grupos de compuestos específicos, el proceso realizado se encuentra detallado en el anexo C.

| PRUEBA | | Observaciones | Interpretación |
|---|---|---|---|
| KEDDE | (-) | Sin cambio de color | Ausencia de Glicosidos cantiotónicos |
| BALJET | x | Presencia de color rojo intenso | Positivo para presencia de Lactonas y cumarinas |
| MAYER | x | Leve presencia de precipitado | Positivo para alcaloides |
| DRAGENDORFF | x | Leve presencia de precipitado | Presencia de trazas de alcaloides |
| ACETATO DE PLOMO | xx | Presencia de precipitado | Positivo para taninos |
| SHINODA (Mg) | xx | Presencia de color rosa pardo | Positivo para flavonoides |
| SHINODA (Zn) | xx | Presencia de color rosa fucsia | Positivo para flavonoides |
| CLORURO FERRICO | xxx | Presencia de color verde azulado oscuro | Abundante presencia de compuestos fenólicos |
| ESPUMA | x | Poca presencia de espuma y poco tiempo de permanencia | Presencia de trazas de saponinas |
| LIEBERMAN BURCHARD | (-) | Sin cambio de color | Negativo para Triterpenos y esteroides |
| GELATINA | x | Poca presencia de precipitado blanco | Presencia de trazas de Taninos |
| FEHLING | (-) | Sin presencia de precipitado rojo | Negativo para azucares reductores |
| NINHIDRINA | (-) | Sin cambio de color | Negativo para aminoácidos |

Ausencia (-), Trazas (x), Positivo (xx), Abundante (xxx).
**Figura 46.** Resultados de estudio fitoquímico para la materia prima.
**Fuente.** Elaboración propia

**Interpretación.-** Se observa en el test de Shinoda tanto con la prueba de virutas de cinc y virutas de magnesio resultados positivos confirmando la presencia del grupo flavonoides y con los otros test una leve presencia de Alcaloides, Saponinas, Lactonas, Cumarinas y abundante presencia de compuestos fenólicos.

## 4.2. Identificación de variables que influyen en el proceso para la obtención de sustrato de cáliz.

### 4.2.1. Identificación de variables del proceso

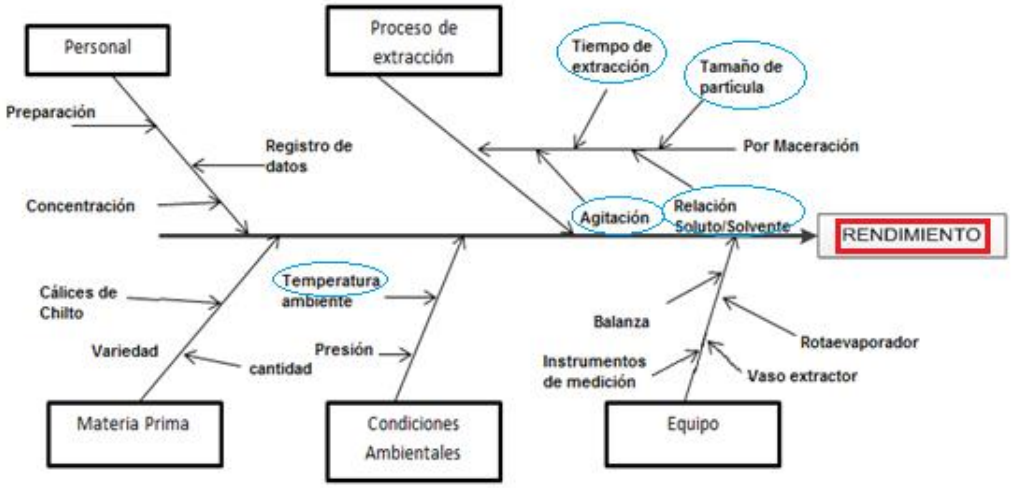



**Figura 47**. Diagrama Ishikawa con identificación de variables.
**Fuente:** Elaboración propia

Mediante un análisis al diagrama Ishikawa tenemos la identificación las variables influyentes al rendimiento que son:

- Tamaño de partícula
- Tiempo de extracción
- Relación soluto/solvente
- Agitación
- Temperatura

### 4.2.2. Pruebas preliminares para la selección de variables de proceso

Para determinar las variables que influyen en función de un parámetro mínimo y máximo se realiza las pruebas preliminares de acuerdo a las especificaciones que se detalla en el anexo D.

#### 4.2.2.1. Determinación del efecto del tamaño de partícula

##### 4.2.2.1.1. Molienda y tamizado de la materia prima

El proceso de molienda se ejecuta con un procesador de cuchillas que es el más apto por las características propias de la materia prima. Se puede observar el detalle en la tabla siguiente:

$$fracción\ de\ masa\ retenida = \frac{masa\ del\ tamiz}{masa\ total}$$

$$fraccion\ masa\ acumulada = fraccion\ masa\ retenida\ (n) + fracción\ masa\ retenida\ (n-1)$$

**Tabla 10.** Detalle de proceso de tamizado

| TAMIZ | | APERTURA | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nº** | **Número de malla** | **Tamaño de apertura (micrón)** | **mm** | **Masa retenida (g)** | **Fracción de masa retenida** | **Fracción de masa acumulativa** |
| 1 | 30 | 600 | 0,600 | 0 | 0 | |
| 2 | 35 | 500 | 0,500 | 166,250 | 0,518 | 0,518 |
| 3 | 40 | 425 | 0,425 | 45,750 | 0,143 | 0,661 |
| 4 | 45 | 355 | 0,355 | 17,650 | 0,055 | 0,716 |
| 5 | 50 | 300 | 0,300 | 21,000 | 0,065 | 0,781 |
| 6 | 60 | 250 | 0,250 | 10,100 | 0,031 | 0,813 |
| BASE | 0 | | | 60,100 | 0,187 | 1,000 |
| | | | **TOTAL** | **320,850 g** | | |

**Fuente.** Elaboración propia

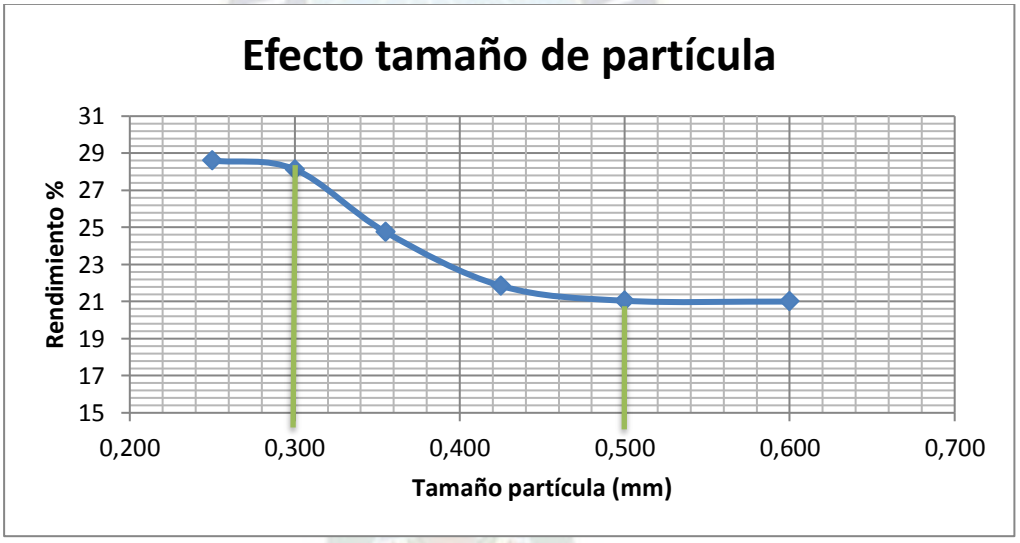



**Figura 48.** Rendimiento vs Tamaño de partícula
**Fuente.** Elaboración propia

**<u>Interpretación.-</u>** Se puede observar que a menor tamaño de la partícula llegamos a tener una mayor superficie de contacto por lo que obtenemos mayor rendimiento a mayor superficie de contacto a 0,250 mm de tamaño de partícula sin embargo por característica propia de la materia prima a este tamaño genera un polvillo adicional que provoca perdida de materia prima por tano se establece como límite superior 0,300 mm y límite inferior 0,500 mm.

#### 4.2.2.2. Determinación del efecto de la agitación

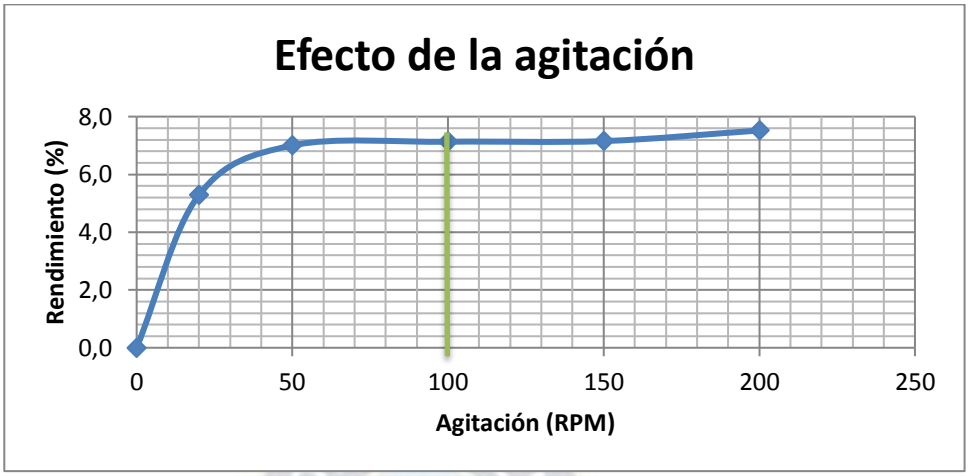



**Figura 49.** Rendimiento vs Agitación
**Fuente.** Elaboración propia

**Interpretación.-** Podemos observar en el grafico que no existe una diferencia considerable en el rendimiento con la agitación y se elige una agitación de 100 RPM.

#### 4.2.2.3. Determinación del efecto de la relación soluto/solvente

##### 4.2.2.3.1. Selección del Solvente

De acuerdo a los principios de selección de solvente se obtuvo como resultado la siguiente tabla resumen. Las especificaciones de criterio y discusión se detallan en el anexo D.

**Tabla 11.** Selección de solvente

| Principio de Selección | Opción 1 | Opción 2 | Opción 3 |
|---|---|---|---|
| Selectividad | Metanol | Etanol | Agua |
| Reactividad | NO | NO | NO |
| Recuperabilidad | Media | Alta | Media |
| Disponibilidad y costo (1 litro) | 174 Bs | 4,50 Bs | 10 Bs |
| Impacto ambiental | Alto | Bajo | Bajo |
| Objetivo o Finalidad | NO | SI | SI |

**Fuente.** Elaboración propia

**Interpretación.-**. Se puede observar en la tabla 11 que los solventes Agua y Etanol son los más convenientes para el proceso porque cumplen adecuadamente los principios requeridos de selección de solvente.

De acuerdo a la metodología establecida por el Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), al tener dos solventes óptimos se debe ejecutar cuatro extracciones a diferentes disoluciones como se encuentran establecidas en el anexo D.

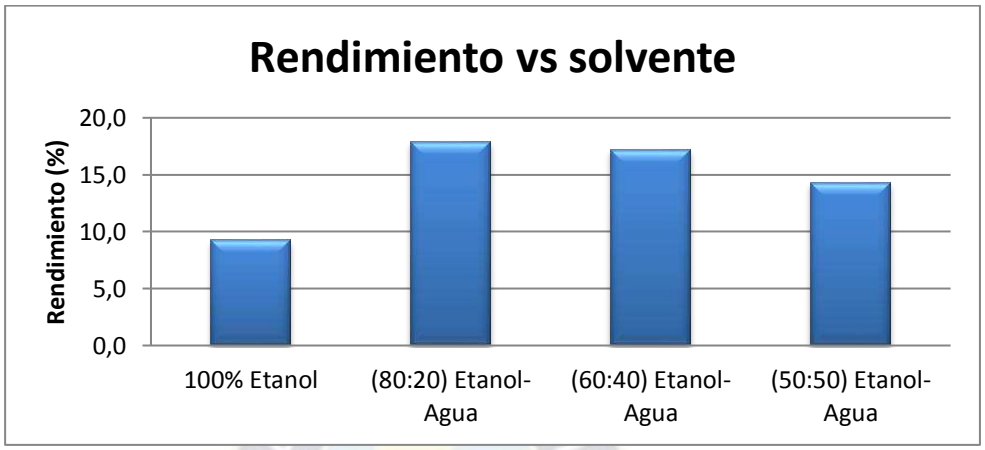



**Figura 50.** Rendimiento vs Agitación
**Fuente.** Elaboración propia

**Interpretación.-** En la figura 50 se puede observar que la relación (80% Etanol: 20%$H_2O$) se obtiene mayor rendimiento de extracción en comparación con las diferentes disoluciones, así mismo en esta disolución no existe presencia de espuma.

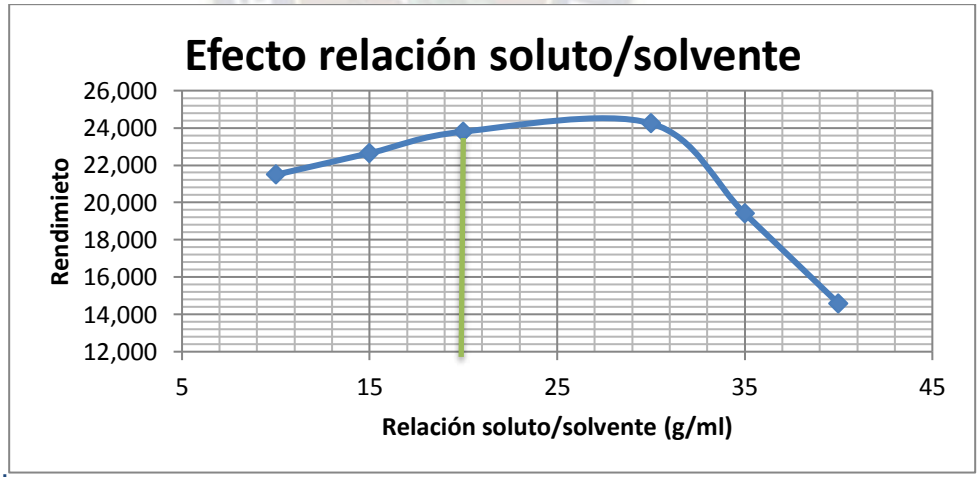



**Figura 51.** Rendimiento vs Relación soluto/solvente
**Fuente.** Elaboración propia

**Interpretación.-** En el grafico se puede observar que a partir de una relación de 1:30 existe un descenso en el rendimiento de la extracción, mediante el comportamiento que se puede observar entre una relación 1:20 a 1:30 existe un incremento mínimo de rendimiento por lo tanto se toma la relación 1:20 y se considera esta variable como una constante.

#### 4.2.2.4. Determinación del efecto del tiempo de extracción

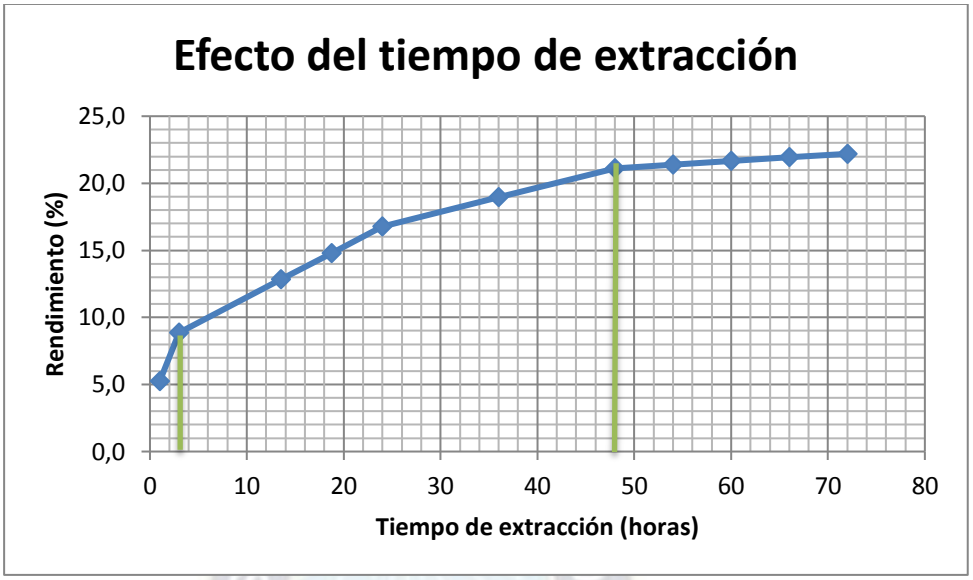



**Figura 52.** Rendimiento vs Tiempo de extracción optimizado
**Fuente.** Elaboración propia

**Interpretación.-** En el grafico se puede observar que a partir de un tiempo de 48 horas el rendimiento se mantiene constante con un poco de variación llegando a las 72 horas por ende se establece como límite inferior 3 horas y límite superior 48 horas respectivamente.

#### 4.2.2.5. Efecto de la Temperatura

Rostango & Prado indican que cuando se utiliza una temperatura elevada puede afectar al perfil y a la concentración de los fitoquímicos presentes en la materia prima, ya que algunos de ellos pueden ser sometidos a la degradación térmica. Por lo tanto, cuando se trata de productos naturales, siempre es preferible utilizar temperaturas bajas o al medio ambiente (2013). La temperatura que se presenta en el Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ) es de 20ºC.

#### 4.2.2.6. Rendimiento

Mediante los anteriores análisis se observa que esta variable se encuentra influida en función del Tiempo de extracción y Tamaño de partícula.

## 4.3. Identificación de las variables de mayor influencia en el proceso a través del diseño experimental.

### 4.3.1. Variables para el diseño experimental

**Tabla 12**. Variables de límite superior e inferior

| **Variables independientes** | | | |
|---|---|---|---|
| **Variable** | **Unidad** | **Límite Inferior** | **Límite superior** |
| Tiempo de extracción | (horas) | 3 | 48 |
| Tamaño de partícula | (mm) | 0,500 | 0,300 |
| **Variables Constantes** | | | |
| Agitación | RPM | 100 | |
| Relación soluto/solvente | g/ml | 1:20 | |
| Temperatura | ºC | 20 | |

**Fuente:** Elaboración propia

### 4.3.2. Diseño experimental

#### 4.3.2.1. Identificación de modelo de diseño

De acuerdo a las pruebas preliminares las variables influyentes para el diseño experimental son: Tiempo de extracción y Tamaño de partícula. En consecuencia el modelo de diseño factorial es: $\mathbf{2^K = 2^2}$.

#### 4.3.2.2. Secuencia de trabajo

Establecido los límites inferior y superior de cada variable se procede a ingresar los datos al software Design expert para obtener la secuencia de trabajo para el modelo de diseño factorial $2^2$.

**Tabla 13.** Secuencia de trabajo proporcionado por el software Design expert.

| Std | Run | Factor1 A: Tiempo de extracción (horas) | Factor 2 B: Tamaño de partícula (mm) | Reponse 1 Rendimiento (%) |
|---|---|---|---|---|
| 2 | 1 | 3,000 | 0,300 | 19,810 |
| 6 | 2 | 3,000 | 0,500 | 18,400 |
| 3 | 3 | 48,000 | 0,300 | 28,500 |
| 5 | 4 | 3,000 | 0,500 | 21,000 |
| 7 | 5 | 48,000 | 0,500 | 13,800 |
| 8 | 6 | 48,000 | 0,500 | 13,950 |
| 1 | 7 | 3,000 | 0,300 | 20,570 |
| 4 | 8 | 48,000 | 0,300 | 28,600 |

**Fuente.** Software Desing-Expert 7.0.0 Trial.

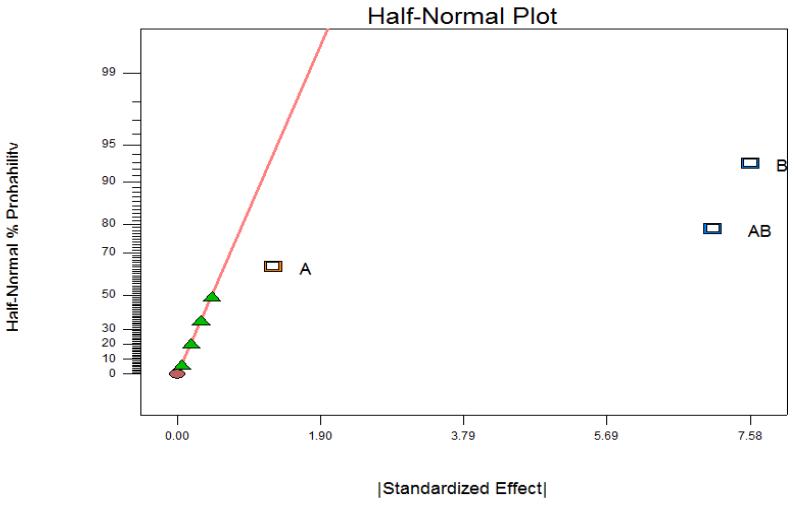



**Figura 53.** Grafica Normal de Daniel
**Fuente.** Software Desing-Expert 7.0.0 Trial.

**Interpretación. -** La grafica de Daniel se observa que los efectos A, B, AB son los más significativos dados que se encuentran alejados de la tendencia.

#### 4.3.2.2. ANOVA

Se realiza un análisis de varianza (ANOVA) de la variable de estudio Rendimiento, en tal análisis se muestra los factores e interacciones más significativas para el modelo.

**Tabla 14.** Factores e interacciones más significativas para el modelo

| ANOVA for selected factorial model | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sum of | | Mean | F | p-value | |
| Source | Squares | Df | Square | Value | Prob>F | |
| Model | 218,810 | 3 | 72,940 | 79,170 | 0,0005 | significant |
| A - Tiempo de extracción | 3,210 | 1 | 3,210 | 3,490 | 0,1352 | |
| B- Tamaño de partícula | 114,990 | 1 | 114,990 | 124,820 | 0,0004 | |
| AB | 100,610 | 1 | 100,610 | 109,210 | 0,0005 | |
| Pure Error | 3,690 | 4 | 0,920 | | | |
| Cor Total | 222,49 | 7 | | | | |

**Fuente**. Software Desing-Expert 7.0.0 Trial

**Interpretación.**- En la tabla de análisis de varianza se observa que el valor F de 218,810 nos confirma que el modelo es significativo. Valores de prob>F menores a 0,05 indican que los términos del modelo son significativos por lo que los efectos B, AB son significativos.

#### 4.3.2.3. Análisis de desviaciones.

**Tabla 15.** Coeficientes de variación y de correlatividad

| | | | |
|---|---|---|---|
| Std. Dev | 0,960 | R-squared | 0,9834 |
| Mean | 20,580 | Adj- R-squared | 0,9710 |
| C.V% | 4,600 | Pred R-squared | 0,9338 |
| PRESS | 14,740 | Adeq Precision | 21,622 |

**Fuente.** Desing-Expert 7.0.0 Trial.

**Interpretación.-** El “Pred R-Squared” de 0,9834 está en acuerdo razonable con el “Adj R-Squared” de 0,9710. El coeficiente de variación obtenido es igual a 4,600%. El término “Adeq Precision” de 21,622 nos confirma un correcto modelado.

### 4.3.2.4. Análisis mediante gráficos

#### 4.3.2.4.1. Gráficas de interacciones

**a) Interacción tiempo de extracción – tamaño de partícula.**

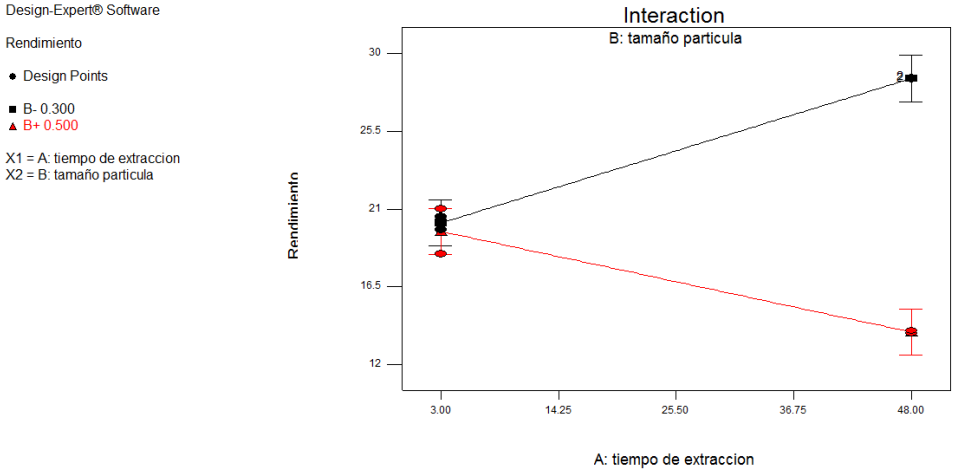



**Figura 54.** Interacción entre la relación soluto-solvente y el tamaño de partícula
**Fuente.** Software Desing-Expert 7.0.0 Trial.

**<u>Interpretación.-</u>** El grafico nos muestra la interacción de forma lineal entre el tiempo de extracción y el tamaño de partícula indicándonos que a mayor tiempo de extracción y menor tamaño de partícula aumenta el rendimiento.

### 4.3.2.5. Análisis de superficie de respuesta y contorno de superficie

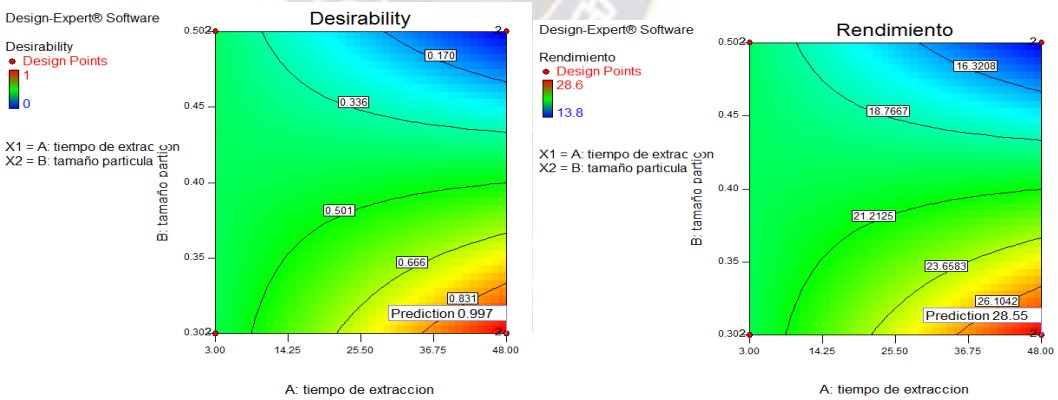



**Figura 55.** Contorno de superficie para el tiempo de extracción y el tamaño de partícula.
**Fuente.** Software Desing-Expert 7.0.0 Trial

**<u>Interpretación.-</u>** En el grafico se puede observar que la mejor interacción entre el tiempo de extracción y el tamaño de partícula se produce a menor tamaño de partícula y un tiempo extenso de extracción llegando a la zona de color roja que indica zona de alto Rendimiento.

#### 4.3.2.6. Ecuación del modelo.

La ecuación de modelo que se obtiene mediante el software Design Expert considerando que **A** (tiempo de extracción), **B**( Tamaño de partícula) y **R** (Rendimiento) tenemos la ecuación de modelo codificada.

$$R = 20{,}58 + 0{,}63\,A - 3{,}79\,B - 3{,}55\,AB$$

#### 4.3.2.7. Optimización del proceso

El software propone métodos de optimización de los procesos de estudio para maximizar el rendimiento de la extracción se determina las mejores condiciones de operación.

**Tabla 16.** Optimización del proceso

| Constraints | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Name | Goal | Lower Limit | Upper Limit | Lower Weight | Upper Weight | Importance |
| Tiempo de extracción | Is in range | 3 | 48 | 1 | 1 | 3 |
| Tamaño partícula | is in range | 0,300 | 0,500 | 1 | 1 | 3 |
| Rendimiento | Maximize | 13,800 | 28,600 | 1 | 1 | 3 |

**Fuente.** Software Desing-Expert 7.0.0 Trial

**Tabla 17.** Solución del proceso

| Number | Tiempo de extracción | Tamaño partícula | Rendimiento | Desirability | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 48 | 0,300 | 28,550 | 0,997 | Selected |

**Fuente.** Software Desing-Expert 7.0.0 Trial

**Interpretación.-** De acuerdo a la tabla de solución se observa que el programa selecciona la corrida que mejor cumple con el criterio de deseabilidad el cual alcanza un rendimiento de 28,550%.

**Tabla 18.** Mejores condiciones de operación

| VARIABLE | VALOR |
|---|---|
| Tiempo de extracción (horas) | 48 |
| Tamaño de partícula (mm) | 0,300 |

**Fuente.** Software Desing-Expert 7.0.0 Trial

#### 4.3.2.7.1. Extracción en mejores condiciones para el rendimiento optimo

De acuerdo a las variables determinadas, se realiza la extracción a mejores condiciones de operación, de la misma determinamos el rendimiento de acuerdo a:

$$Rendimiento = \frac{masa\ de\ extracto\ (g)}{masa\ de\ caliz\ de\ chilto\ (g)} * 100$$

$$Rendimiento = \frac{109{,}213\ g}{388{,}06\ g} * 100 = 28{,}143\%$$

**Interpretación.-** Realizada la extracción tomando en cuenta las mejores condiciones de operación otorgadas por el Design Expert se obtiene un rendimiento de 28,143% de forma experimental muy próximo al valor teórico de mayor rendimiento de 28,550%.

## 4.4. Caracterización del producto final

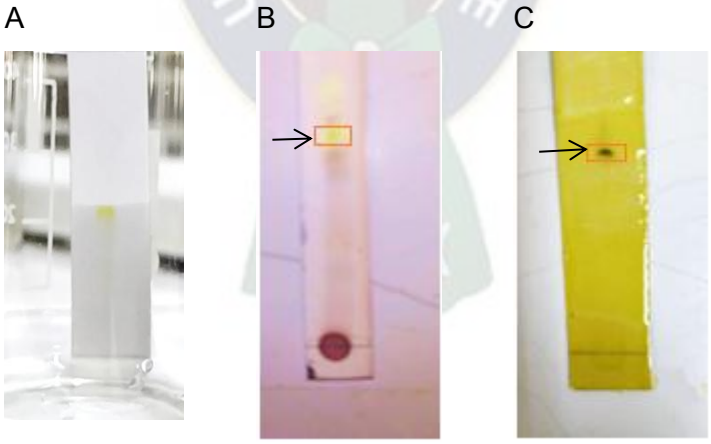
### 4.4.1. Separación de compuestos

Para la identificación de flavonoides se realiza separaciones mediante cromatografía con la finalidad de aislar e identificar los compuestos puros en el sustrato.

#### 4.4.1.1. Métodos cromatográficos.

**a) Cromatografía en capa fina TLC**

Se utiliza una placa de fase reversa y como fase móvil: 60% $H_2O$ (al 10 % ácido fórmico) y 40% Acetonitrilo.




**Desarrollo de la placa en la fase móvil** | **Placa revelada con $H_2SO_4$ al 5%** | **Placa revelada con $FeCl_3$ al 5%**

**Figura 56.** Cromatografía en capa fina
**Fuente.** Elaboración propia

**Interpretación.-** Se aprecia en la Figura 56 (B) una mancha amarilla de alta intensidad característica de los flavonoides y en (C) se aprecia una mancha azul oscuro confirmando la presencia de un flavonoide mayoritario.

**b) Cromatografía por exclusión molecular Sephadex**

Como fase móvil se utilizó Etanol al 96%

**Siembra de la muestra en la columna LH20** **Desarrollo de la columna** **Colecta de fracciones**

**Figura 57.** Cromatografía por columna Sephadex LH20.
**Fuente.** Elaboración propia

**Interpretación.-** Se puede observar que en la columna al transcurrir del tiempo la muestra llega a mostrar dos coloraciones una de amarillo intenso y la de color verde hierba en el desplazamiento de columna Shepadex LH-20. Las fracciones colectadas de la parte coloreada de verde llegaron a presentar la presencia de flavonoides por control de placa TLC.

**c) Cromatografía fase reversa C18**

La columna a utilizar es de fase reversa y como fase móvil: 60% $H_2O$ (al 10 % ácido fórmico) y 40% Acetonitrilo.

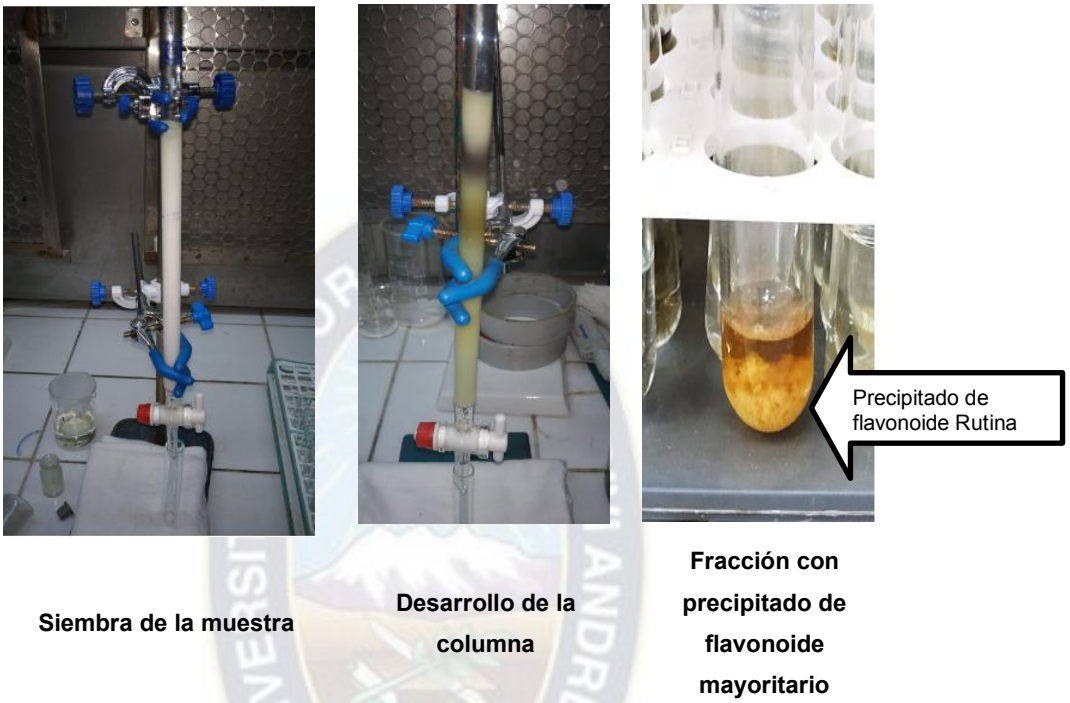



**Figura 58.** Cromatografía por columna fase reversa C18
**Fuente.** Elaboración propia

### 4.4.1.2. Determinación de estructura por Resonancia Magnética Nuclear

Mediante Resonancia Magnética Nuclear se identifica la estructura del flavonoide mayoritario.

#### 4.4.1.2.1 Compuesto flavonoide mayoritario

La muestra obtenida se lleva a resonancia magnética nuclear nombrada como muestra LSA.MR1. Dados los espectros de Carbono y Protón detectamos que la muestra LSA.MR1 es flavonoide Rutina.

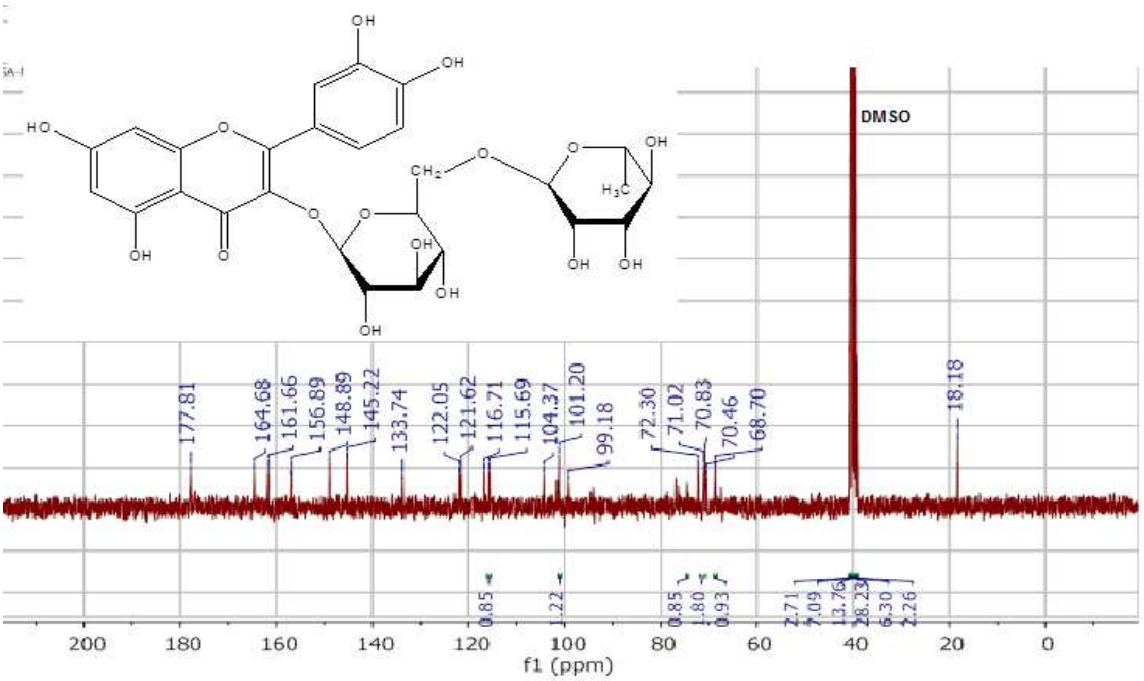



**Figura 59**. Espectro de Carbono 13 de Resonancia magnética nuclear de LSA.MR1
**Fuente.** Colaboración del Instituto de Investigaciones Químicas IIQ.

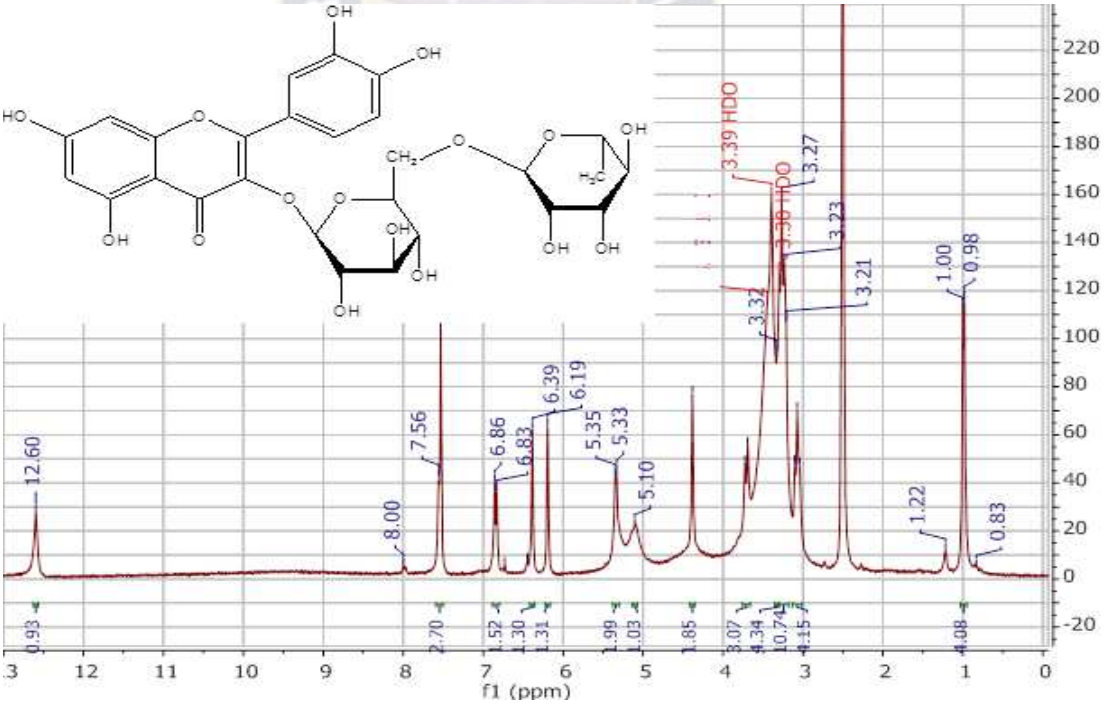
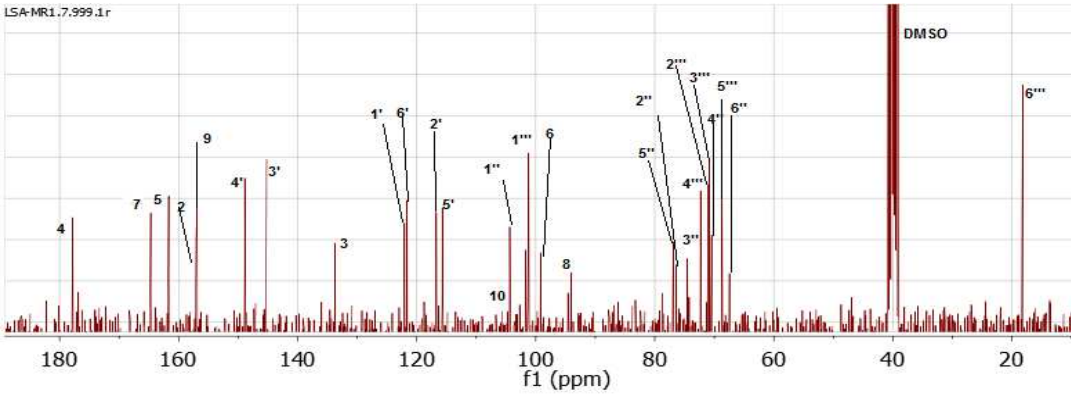
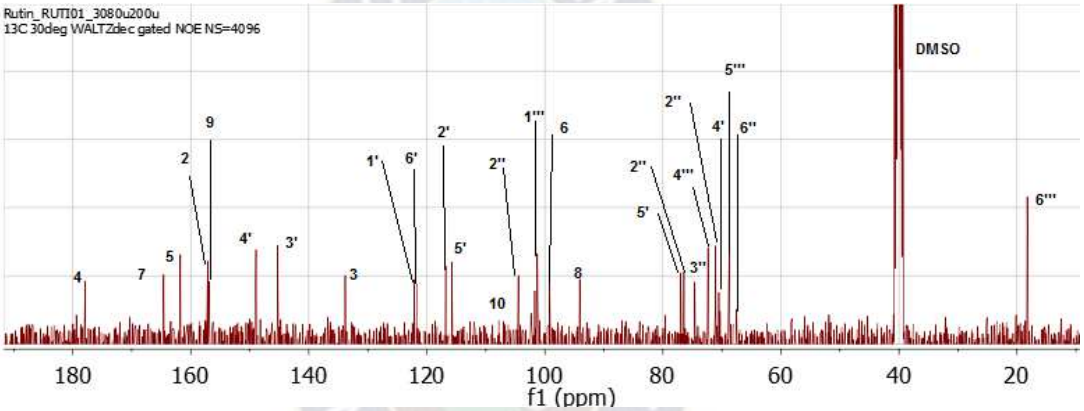



**Figura 60.** Espectro de Protón de Resonancia magnética nuclear de LSA.MR1
**Fuente.** Colaboración del Instituto de Investigaciones Químicas IIQ.

Espectro de Carbono de muestra LSA-MR1




Espectro de Carbono de muestra RUTINA PURA (Instituto de Investigaciones Químicas)




Espectro de Carbono de Rutina de articulo cientifico de (da Silda Junior & Severo menezes, 2017)

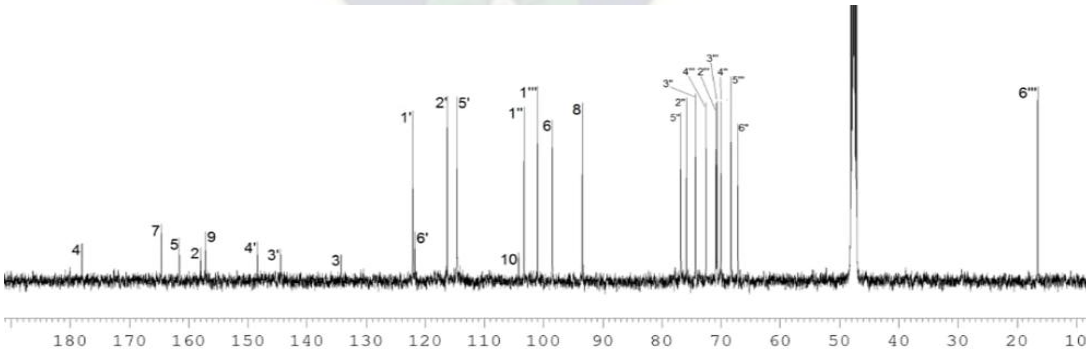
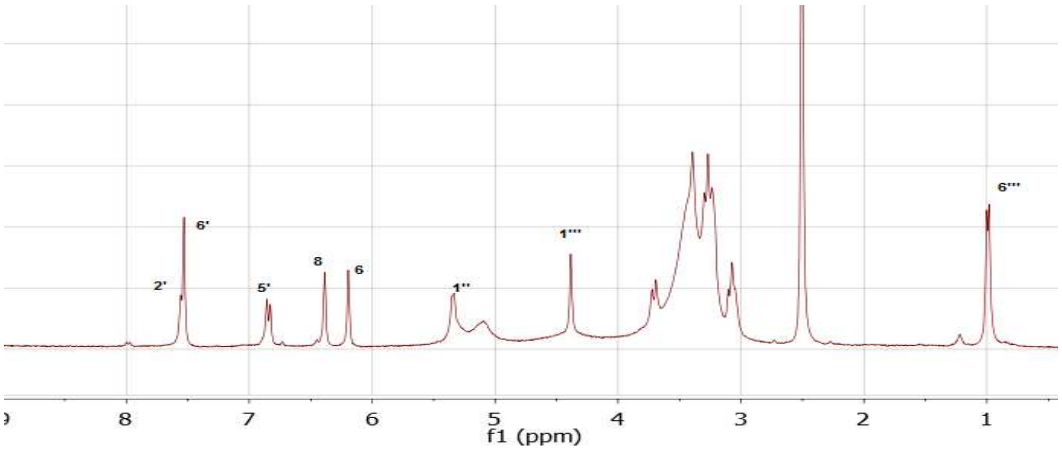
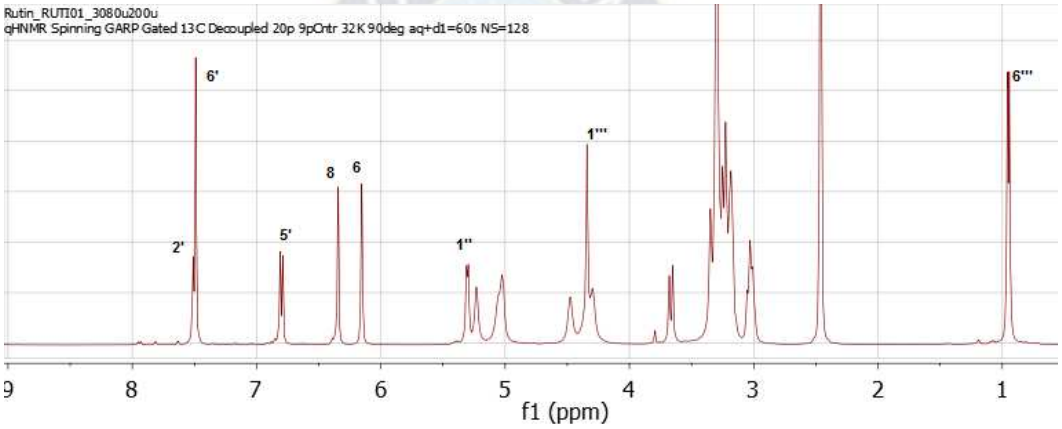


**Figura 61.** Comparación de espectros de carbono otorgados por resonancia magnética nuclear.
**Fuente.** Colaboración del Instituto de Investigaciones químicas IIQ.

Espectro de Protón de muestra LSA-MR1




Espectro de Protón de muestra RUTINA PURA (Instituto de Investigaciones Químicas)




Espectro de Protón de Rutina de articulo cientifico de (da Silda Junior & Severo menezes, 2017)

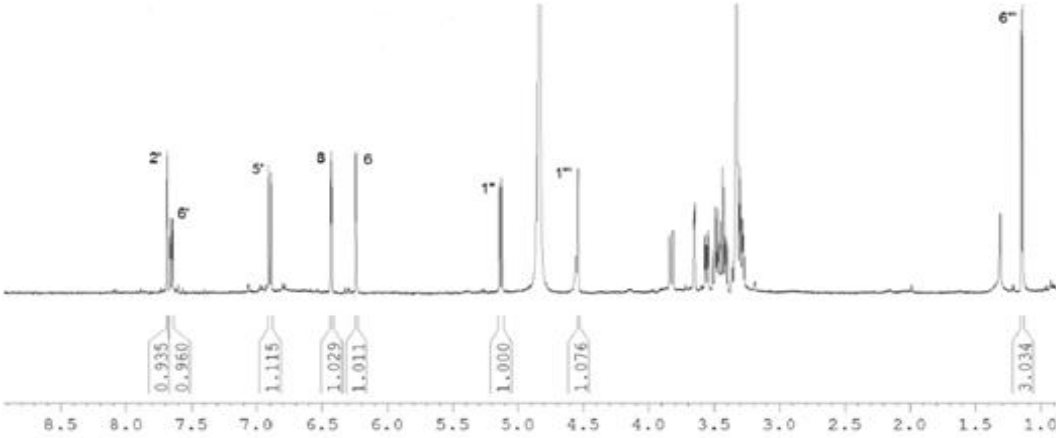



**Figura 62.** Comparación de espectros de protón otorgados por resonancia magnética nuclear. Colaboración del
**Fuente.** Colaboración del Instituto de Investigaciones químicas IIQ.

En las figuras 61 y 62 se aprecia un análisis minucioso de comparación visual de los espectros de Rutina pura, espectros avalados por el articulo cientifico de la universidad de Goiás (Aislamiento y determinación estructural de constituyentes químicos de hojas de Odontadenia lutea) (da Silda Junior & Severo menezes, 2017) con los espectros de la muestra extraída LSA.MR1. La similitud y posición de picos en los espectros, confirman que la muestra LSA.MR1 se trata del flavonoide Rutina.

En la figura 63 se puede observar la estructura del flavonoide Rutina con la numeración de los carbonos y sus enlaces como se detallan en los espectros.

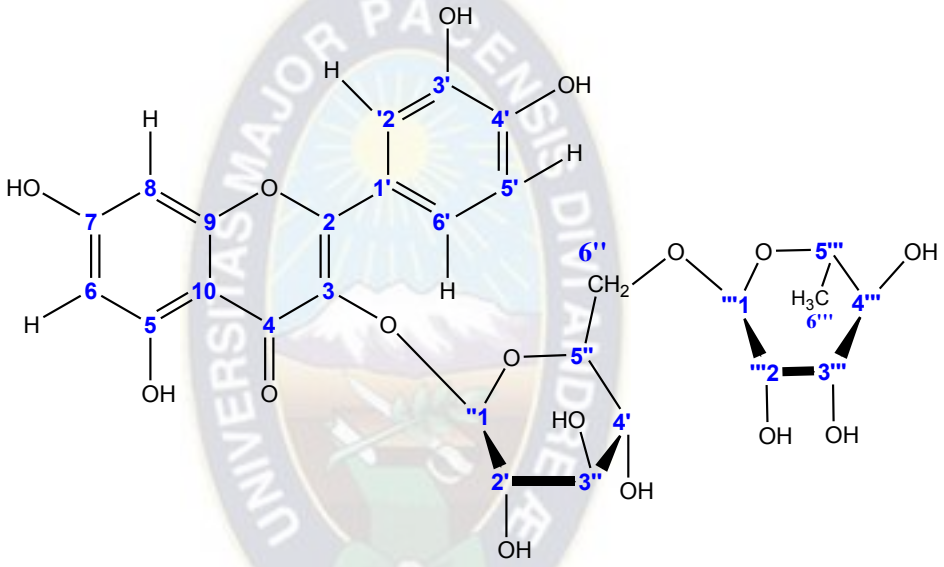



**Figura 63.** Estructura química de flavonoide Rutina con posición de carbonos
**Fuente.** Elaboración propia

**Figura 64.** Compuesto Rutina aislada
**Fuente.** Elaboración propia

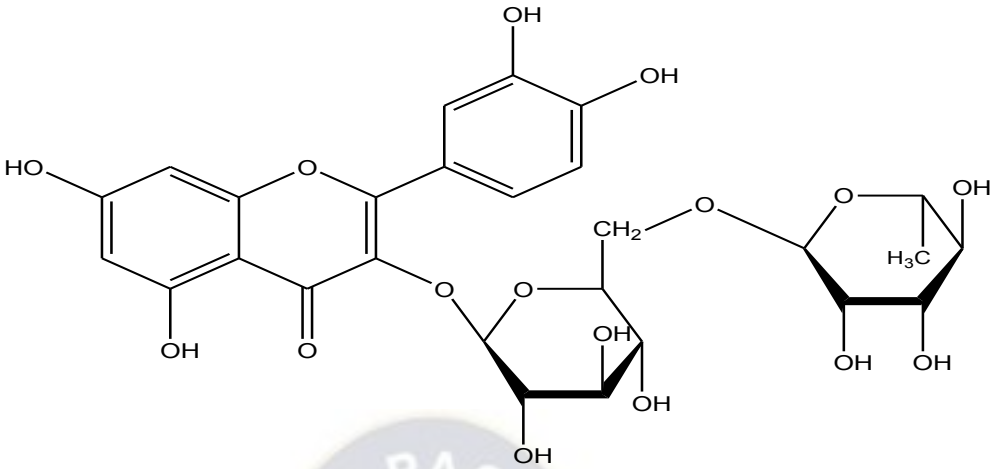



**Figura 65.** Estructura desarrollada de flavonoide Rutina.
**Fuente.** Elaboración propia

### 4.4.2. Método cuantitativo

#### 4.4.2.2. Determinación de la curva de calibración

Los análisis se realizaron en un equipo de Cromatografía de Alta Eficiencia HPLC Agilent 1100. "La fase móvil se prepara utilizando agua ultra purificada con ácido fosfórico ($H_3PO_4$) al 0,1% (solución A) y Acetonitrilo grado HPLC (solución B) en la proporción 80A:20B. El caudal de 1,0 ml min-1 con un tiempo de ejecución de 15 minutos y un volumen inyectado de 20µl" (Nogueira Oliveira, Ribeiro da Silva, Silva de Lima, de Almeida, Pontes Silva Ricardo, & Teixeira de Figueiredo, 2020). Las inyecciones se realizaron por triplicado.

**Tabla 19.** Resultado a diferentes concentraciones de muestra pura Rutina

| Concentración de Rutina en ppm | Promedio (mAU/s) |
|---|---|
| 100,000 | 0,502 |
| 200,000 | 1,008 |
| 300,000 | 1,559 |
| 400,000 | 2,162 |
| 500,000 | 2,698 |

Nota. Promedio (mAU/s) = promedio de absorbancia

**Fuente.** Elaboración propia

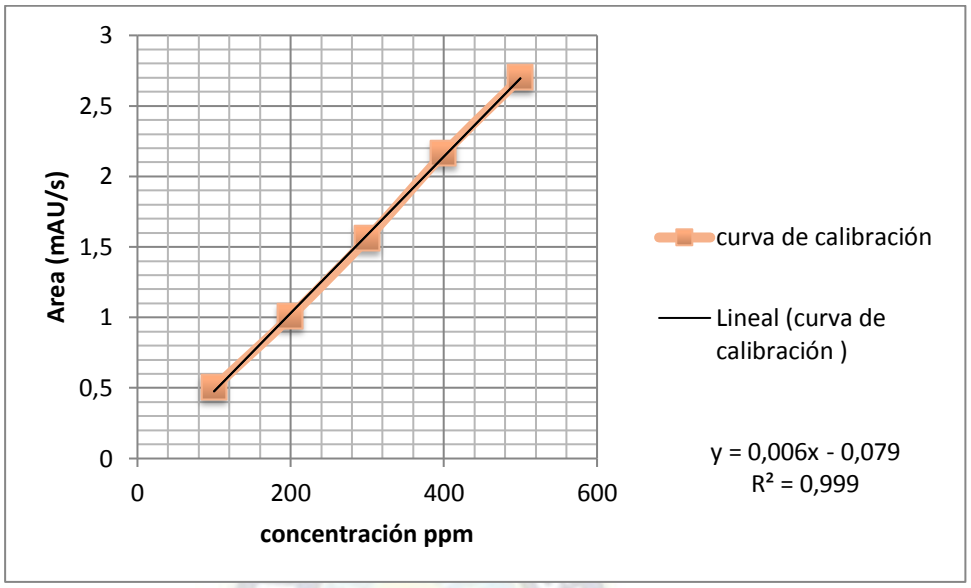



**Figura 66.** Curva de calibración de muestra pura Rutina
**Fuente.** Elaboración propia

Mediante el análisis espectral y la absorbancia máxima se observa que el flavonoide Rutina tiene una buena linealidad mediante la ecuación:

$$y = 0{,}006x - 0{,}079$$

### 4.4.2.2. Cuantificación de flavonoide mayoritario Rutina

Para la determinación de Rutina en la muestra se preparó una dilución del sustrato como se muestra detalladamente en el anexo H.

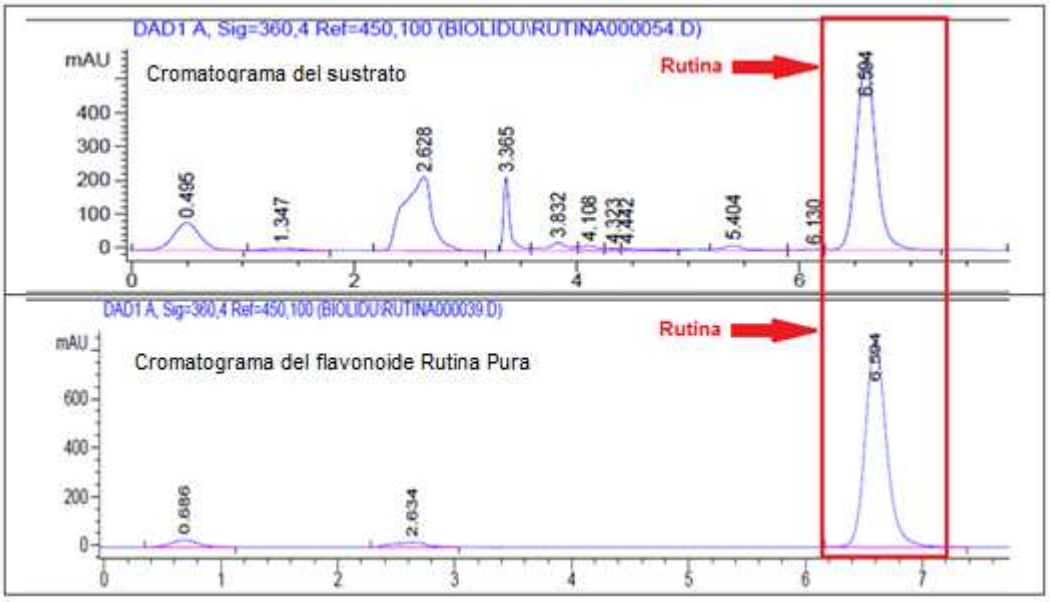



**Figura 67.** Identificación del flavonoide Rutina en el sustrato
**Fuente.** Elaboración propia

En la figura 67 podemos identificar la presencia del flavonoide Rutina dentro del cromatograma del sustrato, identificándolo con un tiempo de retención de 6,594 min. Mediante la columna de calibración determinamos la concentración de Rutina en el sustrato:

$$x = \frac{y - 0{,}079}{0{,}006}$$

De acuerdo al procedimiento detallado en el anexo G. la dilución preparada del sustrato es de 2,5 ml, volumen que se utiliza para determinar la masa de la Rutina.

$$2{,}500\ ml * \frac{273{,}608}{1000{,}000} = 0{,}684\ mg$$

$$0{,}036\ g\ de\ extracto * \frac{0{,}685\ mg\ de\ Rutina}{0{,}020\ g\ de\ extracto} = 1{,}224\ mg\ de\ rutina$$

$$1{,}000\ g\ de\ extracto * \frac{1{,}224}{0{,}036} = 34{,}200\ {}^{mg\ de\ rutina}/_{g\ de\ extracto}$$

La prueba se realizó por triplicado para obtener mayor confiabilidad de resultados.

**Tabla 20.** Datos de concentración de Rutina en el sustrato

| Concentración de extracto al (%) | mAU/s | X | Masa (mg) | mg de rutina | mg Rutina/g sustrato |
|---|---|---|---|---|---|
| 30,000 | 1,426 | 273,608 | 0,684 | 1,224 | 34,200 |
| 30,000 | 1,732 | 329,307 | 0,823 | 1,474 | 41,160 |
| 30,000 | 1,664 | 316,760 | 0,792 | 1,417 | 39,590 |
| | | | Promedio resultante | | **38,320** |

**Fuente.** Elaboración propia

**<u>Interpretación.-</u>** De la tabla 20 tenemos como resultado 38,320 mg de Rutina por cada gramo de extracto concentrado de cálices de Chilto.

$$38{,}320\ \frac{mg\ de\ Rutina}{g\ extracto} * \frac{12{,}900\ g\ extracto}{100{,}050\ g\ calices\ secos\ molido} = 4{,}940\ \frac{mg\ de\ Rutina}{g\ calices\ seco\ molido}$$

Obteniendo como resultado:

$$4{,}940\ \frac{mg\ de\ Rutina}{g\ calices\ seco\ molido} * \frac{1000\ g\ calices\ secos\ molidos}{1\ kg\ calices\ secos\ molidos} * \frac{1\ g\ de\ Rutina}{1000\ mg\ \ de\ Rutina}$$

$$= 4{,}940\ \frac{g\ de\ Rutina}{kg\ de\ calices\ secos\ molidos}$$

### 4.4.3. Pruebas Biológicas

En la gráfica 68, se observa la capacidad antiproliferativa del extracto etanolico del cáliz. Como se puede ver, todas las concentraciones analizadas disminuyen la proliferación de células de cáncer de colon CaCo-2 dependiente de la dosis, habiendo una inhibición de 55% a la concentración de 100 µg/ml, mostrando el extracto un IC50 de 182 µg/ml.

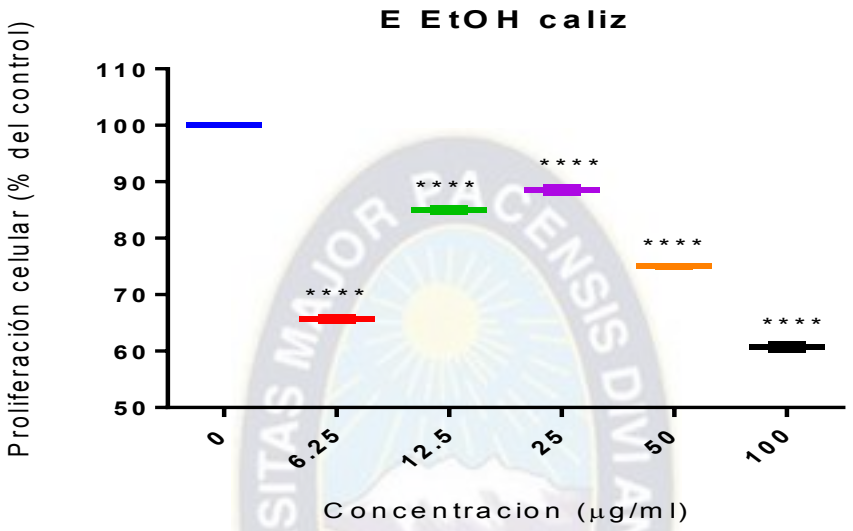



**Figura 68.** Concentración extracto de Cáliz vs. Proliferación celular
**Fuente.** Unidad de Vigilancia Ambiental y Genotoxicología del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Mayor de San Andrés

**Tabla 21**. Detalle de test de proliferación de células de cáncer de colon CaCo-2

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Number of families | | 1 | | |
| Number of comparisons per family | | 5 | | |
| Alpha | | 0,05 | | |
| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff, | SE of diff, |
| 0 vs. 6,25 | 100,000 | 66,000 | 34,000 | 0,500 |
| 0 vs. 12,5 | 100,000 | 85,000 | 15,000 | 0,500 |
| 0 vs. 25 | 100,000 | 89,000 | 12,000 | 0,500 |
| 0 vs. 50 | 100,000 | 75,000 | 25,000 | 0,500 |
| 0 vs. 100 | 100,000 | 61,000 | 39,000 | 0,500 |
| | | | | |
| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
| 0 vs. 6,25 | 34,000 | 33 to 36 | Yes | (****) |
| 0 vs. 12,5 | 15,000 | 13 to 17 | Yes | (****) |
| 0 vs. 25 | 12,000 | 9,8 to 13 | Yes | (****) |
| 0 vs. 50 | 25,000 | 23 to 27 | Yes | (****) |
| 0 vs. 100 | 39,000 | 38 to 41 | Yes | (****) |

**Fuente:** Unidad de Vigilancia Ambiental y Genotoxicología del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Mayor de San Andrés

**Interpretación.-** A partir de 25 µg/ml se ve una respuesta dosis dependiente. El hecho de que haya una diferencia significativa de (****) cuando comparamos estos tratamientos con el control, indica que hay actividad. Por tanto el sustrato EtOH cáliz contiene moléculas activas contra cáncer de colon, se recomienda seguir fraccionando y evaluar fracciones y moléculas puras para tratar de encontrar una molécula mayoritaria con buena actividad. En el sustrato EtOH-H2O cáliz a partir de 25 µg/ml, el extracto promueve la proliferación celular de las células de cáncer de colon, no tiene actividad anti proliferativa.

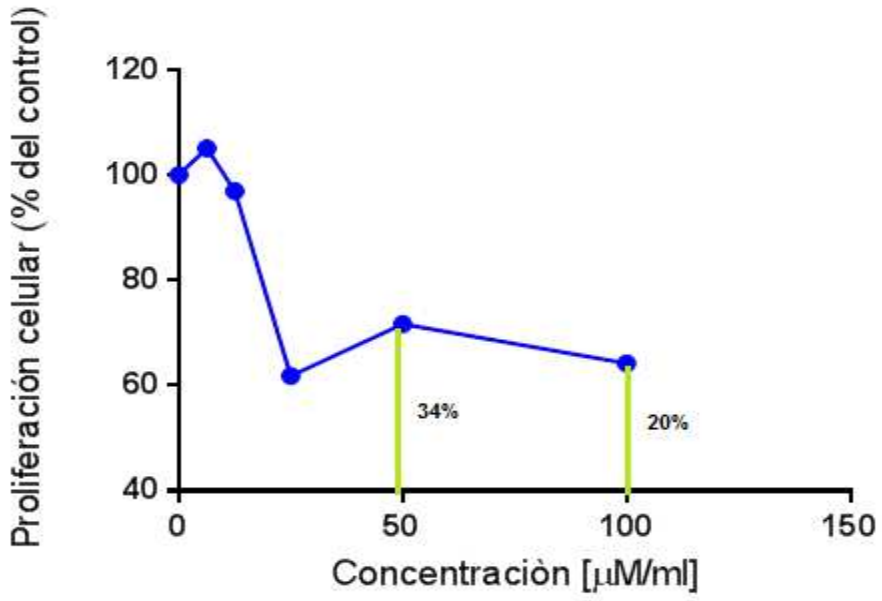
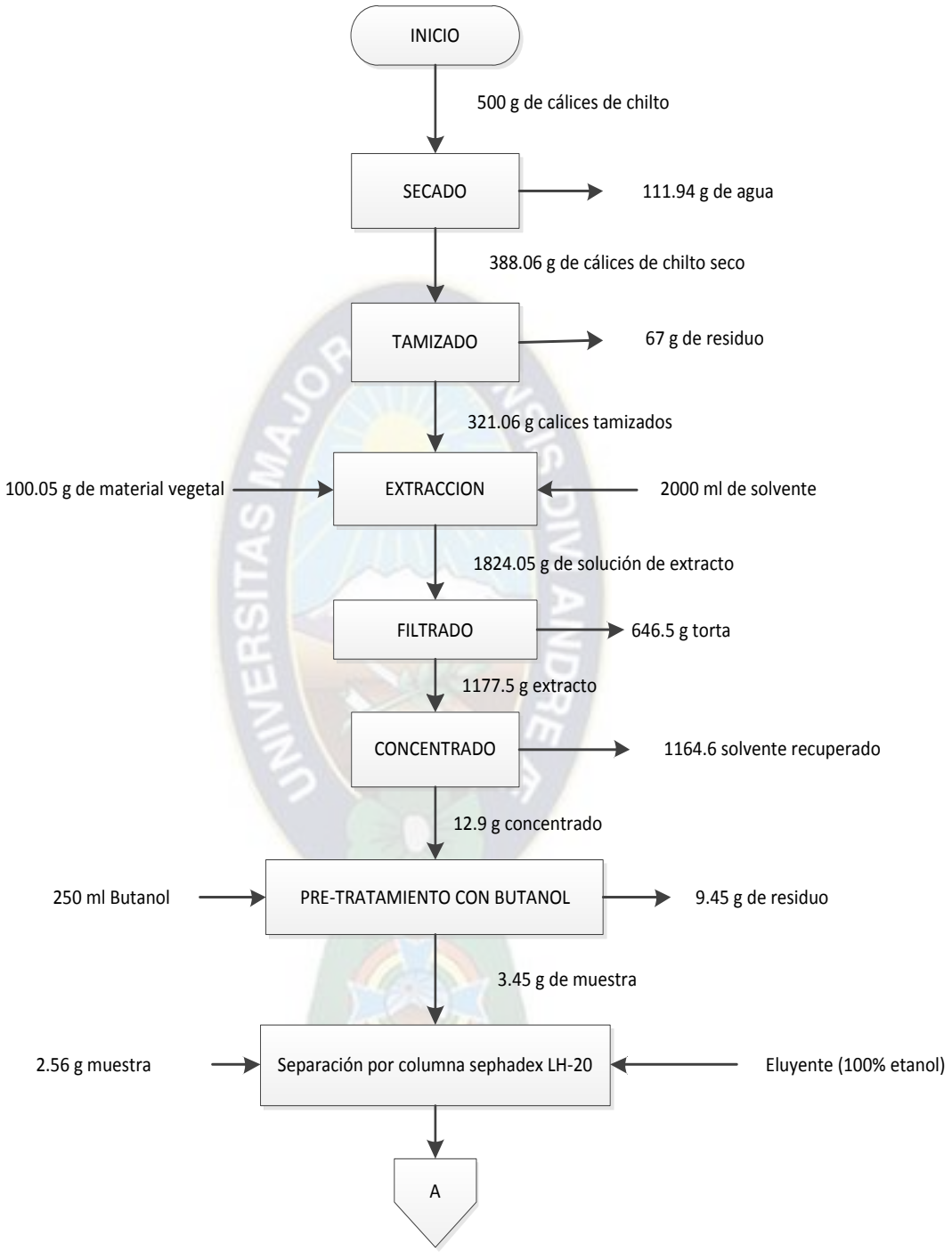



**Figura 69.** Concentración molécula flavonoide Rutina vs. Proliferación celular
**Fuente:** Unidad de Vigilancia Ambiental y Genotoxicología del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Mayor de San Andrés

**Interpretación.-** La molécula de flavonoide Rutina muestra actividad antiproliferativa a concentraciones elevadas. A una concentración de 50 µM inhibe en 34% el crecimiento de células de cáncer de colon y en concentración de 100 µM inhibe en 20% el crecimiento de células de cáncer de colon.

### 4.4.4. Balance de materia

El balance de materia para cada proceso se encuentra a mayor detalle en el anexo H.



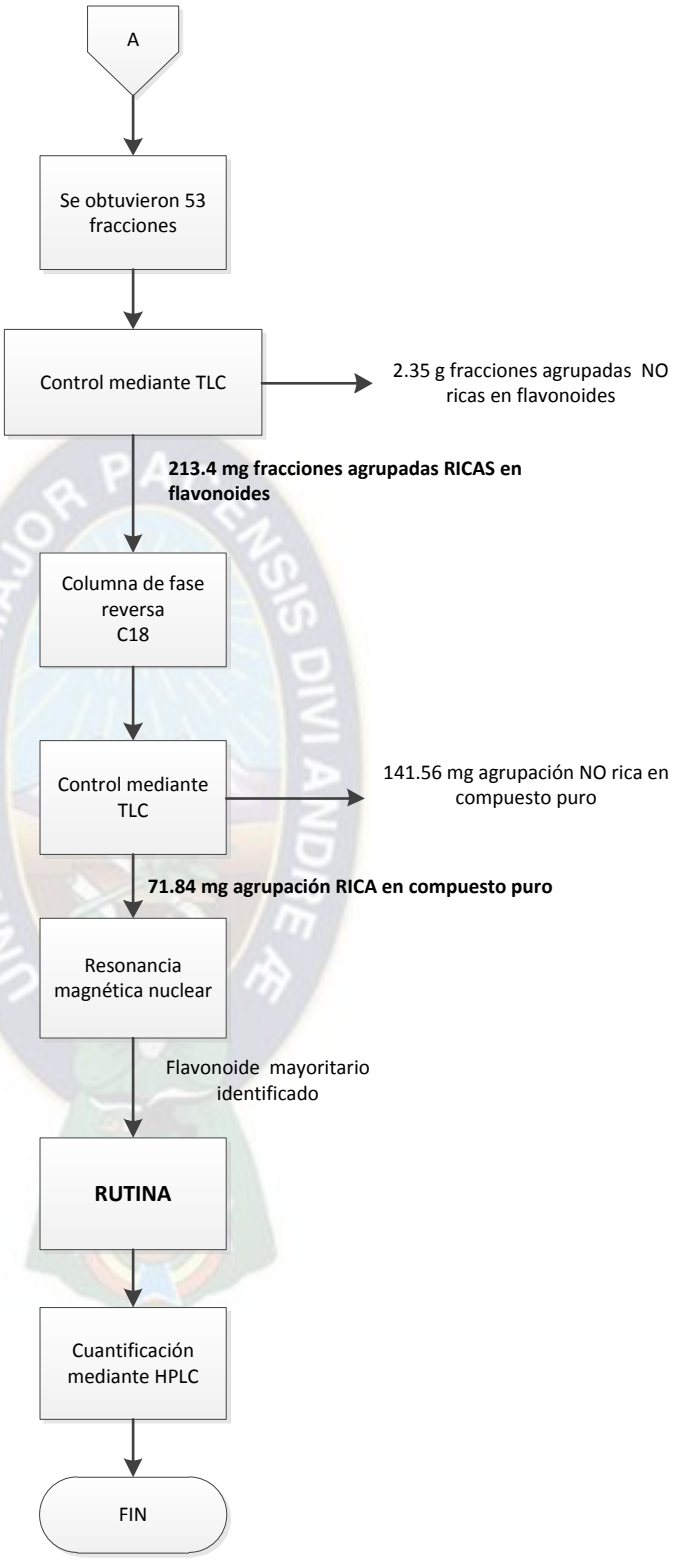



**Figura 70.** Resumen del balance de masa
**Fuente.** Elaboración propia

# CAPÍTULO V

# DISEÑO DEL EXTRACTOR NIVEL BENCH SCALE

# CAPITULO V
# DISEÑO DEL EXTRACTOR A NIVEL BENCH SCALE

Para el diseño del extractor se parte de los datos obtenidos en las pruebas preliminares y las mejores condiciones de extracción otorgadas mediante el Design expert en un capitulo anterior.

**Tabla 22.** Condiciones de operación

| VARIABLE | VALOR |
|---|---|
| Tiempo de extracción (horas) | 48 |
| Tamaño de partícula (mm) | 0,300 |
| Relación soluto solvente (g/ml) | 1:20 |
| Agitación (RPM) | 100 |
| Temperatura (ºC) | 20 |

**Fuente**: Elaboración propia.

**Tabla 23.** Propiedades físicas

| | |
|---|---|
| Densidad del solvente | 0,862 g/ml |
| Densidad del extracto | 0,850 g/ml |
| Densidad del solido | 3,620 g/ml |
| Viscosidad | 0,094 Pa*s |

El solvente de trabajo es una mezcla de Etanol al 80% y Agua al 20%. Para un proceso de extracción con solventes sólido- líquido el equipo más recomendado es el reactor de tanque agitado (Treybal, 1988). Un reactor de tanque agitado tiene la forma de un cilindro por lo que inicialmente requerimos el volumen de este.

$$10\ gRutina * \frac{1\ kg\ materia\ prima}{4{,}940\ g\ Rutina} * \frac{1000\ g\ materia\ prima}{1\ Kg\ materia\ prima} * \frac{20\ cm^3\ solvente}{1\ g\ materia\ prima} * \\ * \frac{1\ m^3}{1000000\ cm^3}$$

$$V_{solvente} = 0{,}0405\ m^3$$

$$10\ g\ de\ Rutina * \frac{1\ kg\ materia\ prima}{4{,}940\ g\ de\ Rutina} * \frac{1000\ g\ materia\ prima}{1\ Kg\ materia\ prima} \\ * \frac{1\ cm^3}{3{,}620\ g\ materia\ prima} * \frac{1m^3}{1000000\ cm^3}$$

$$V_{solido} = 0{,}0006\ m^3$$

$$V_{total} = V_{solido} + V_{solvente} \quad (6.1)$$

$$V_{total} = 0{,}0006\ m^3 + 0{,}0405\ m^3 = 0{,}041\ m^3$$

El objetivo de diseño planteado es tener un tanque de extracción a nivel Bench Scale y el volumen de 0,041 $m^3$ en su equivalencia de 41 litros él cual se encuentra en el rango permitido para el escalamiento a nivel Bench Scale que poseen capacidades entre 5 a 50 litros (Cerpa Chávez, 2007).

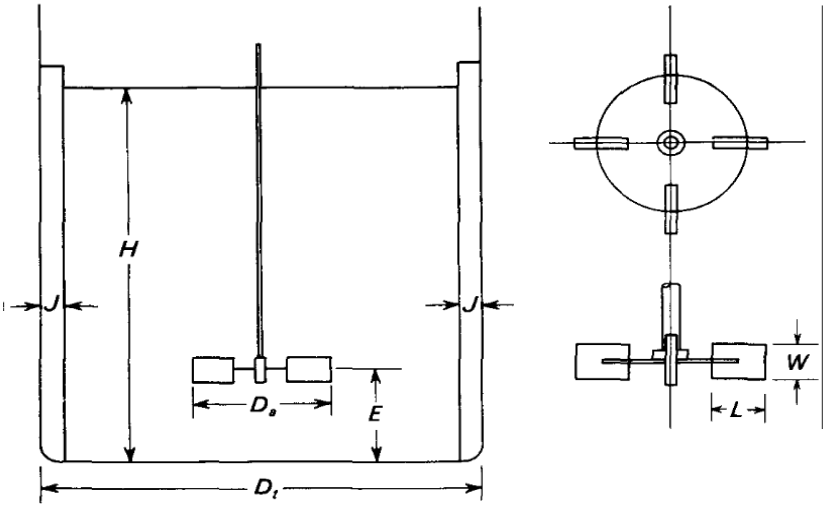



**Figura 71.** Especificaciones del tanque
**Fuente.** Operaciones unitarias en ingeniería química (McCabe, Smith, & Harriott, 1991),

Donde:

$D_t$= Diámetro del tanque

H= Altura del líquido en el tanque

J= Ancho del deflector

Da= Diámetro del agitador

E= Altura de la base al tanque

W= Altura del agitador

L= Base del agitador

El volumen de la mezcla nos relaciona el diámetro del tanque y la altura máxima de líquido en la cual hay suspensión completa de sólidos, utilizamos la relación con el volumen hallado para el tanque:

$$V_{tk} = \frac{\pi D_t^2 H}{4} \tag{6.2}$$

Asumiendo que:

$$H = D_t \tag{6.3}$$

$$D_t = \sqrt[3]{\frac{4V_t}{\pi}} = \sqrt[3]{\frac{4 * 0{,}041\ m^3}{\pi}} \tag{6.4}$$

$$D_t = 0{,}374\ m$$

Para el dimensionamiento de tanques en todos los casos se sigue el código ASME (ASME, 2001). Que indica que para cumplir con las medidas de seguridad en todos los casos se sobredimensiona el parámetro influyente en cuestión, de tal manera que se aplica la siguiente ecuación:

$$\beta_D = \beta_T * 1{,}2 \tag{6.5}$$

Donde $\beta$ hace referencia al parámetro influyente, en nuestro caso es el volumen, el subíndice D hace referencia al valor del volumen de diseño y T al valor teórico. Por lo tanto el volumen de diseño es:

$$V_D = V_T * 1{,}2 = 0{,}041 m^3 * 1{,}2$$

$$V_D = 0{,}049 m^3$$

Para el volumen del tanque se considera un 20% del volumen por concepto de sobrellenado y así evitar derrames.

$$V_{tk} = V_D + V_{sd} \tag{6.6}$$

$$V_{tk} = 0{,}049 m^3 + (0{,}041 * 0{,}20) m^3$$

$$V_{tk} = 0{,}057\ m^3$$

Para determinar la altura

$$H = \frac{4V_t}{\pi D_t^2} \tag{6.7}$$

$$H = \frac{4 * 0{,}057 m^3}{\pi (0{,}374 m)^2}$$

$$H = 0{,}519\ m$$

Las placas deflectoras son necesarias para lograr una mezcla eficaz por lo que se ubican al interior del tanque.

El ancho del deflector denominado con la letra J será:

$$J = \frac{1}{12} D_t = \frac{0{,}374\ m}{12} = 0{,}031 m \tag{6.8}$$

### 6.1.1. Diseño del agitador

Se considera un agitador de turbina de placas planas de 6 aspas "ya que producen un buen flujo radial en el plano del rodete, dividiendo el flujo hacia la pared para formar dos modelos distintos de circulación." (McCabe, Smith, & Harriott, 1991)

Para el diámetro del agitador:

$$D_a = \frac{1}{3} D_t = \frac{0{,}374\ m}{3} = 0{,}125\ m \tag{6.9}$$

Para la altura de la paleta con relación al fondo del tanque:

$$\frac{E}{D_a} = 1\ donde\ E = D_a = 0{,}125\ m \tag{6.10}$$

La altura de la paleta:

$$W = \frac{1}{5} D_a = \frac{0{,}374\ m}{5} = 0{,}075\ m \tag{6.11}$$

El espesor de paleta:

$$L = \frac{1}{4} D_a = \frac{0{,}374\ m}{4} = 0{,}093\ m \tag{6.12}$$

### 6.1.2. Calculo del número de Reynolds

Para determinar el número de Reynolds se necesita la velocidad de agitación y densidad del extracto liquido en sus respectivas unidades. La velocidad de agitación del proceso es de 100 RPM, convirtiendo a las unidades necesarias:

$$\eta = 100 \frac{rev}{min} * \frac{1\ min}{60\ s} = 1{,}667\ rev/s \tag{6.13}$$

El factor de conversión para la densidad de la solución:

$$\rho = 0{,}850\ \frac{g}{cm^3} * \frac{1\ kg}{1000g} * \frac{(100\ cm)^3}{1m^3} = 850\ {}^{kg}/_{m^3} \tag{6.14}$$

En la ecuación del número de Reynolds

$$N_{Re} = \frac{D_a^2\ \eta\rho}{\mu} \tag{6.15}$$

$$N_{Re} = \frac{(0{,}125\ m)^2 * 1{,}667\ {}^{rev}/_{s} * 850{,}0\ {}^{kg}/_{m^3}}{0{,}094\ Pa\ s} = 235{,}530$$

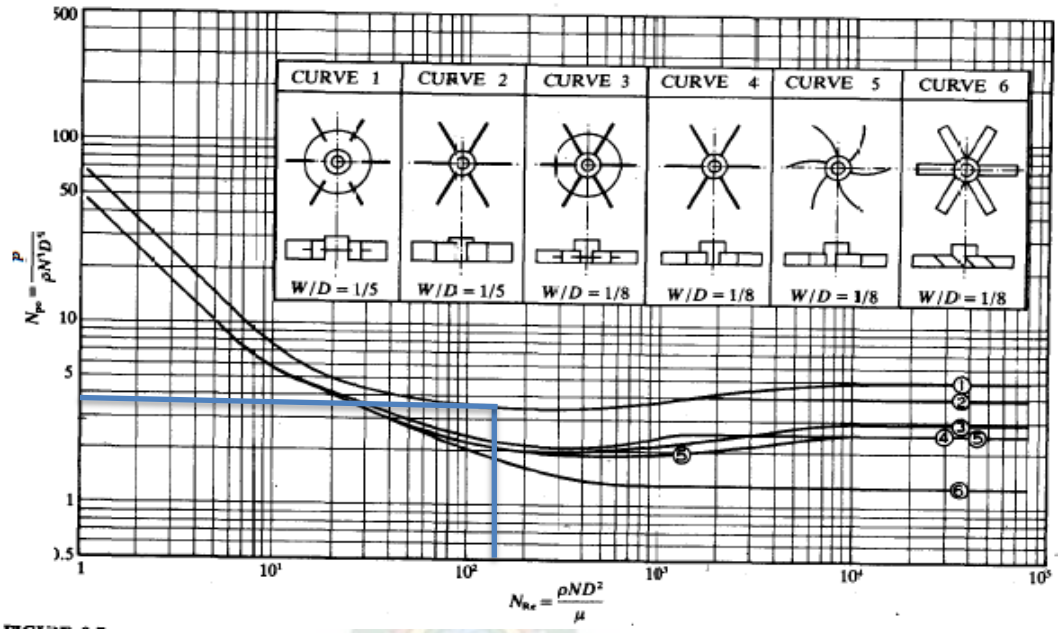



**Figura 72.** Correlación de potencia para diferentes turbinas
**Fuente.** Transport phenoma a Unified, 1988, Robert S. Brodkey; Harry C. Hershey, The Ohio State University

Debido a que el número de Reynolds es menor a 2300, el flujo es laminar por tanto la relación ${}^{W}/_{Da} = \frac{1}{5}$, se utiliza la curva 2 de la figura 72 para hallar el número de potencia el cual se muestra a continuación:

$$N_p = 4 \tag{6.16}$$

Entonces en la ecuación de potencia será:

$$P = N_P * \rho * \eta^3 * D_a^5 \tag{6.17}$$

$$P = 4 * 850{,}0 \frac{Kg}{m^3} * \left(1{,}667 \frac{rev}{s}\right)^3 * (0{,}125m)^5$$

$$P = 0{,}481\ W$$

La altitud es un factor muy importante que influye en los motores, los mecánicos indican que por cada 1000 msnm la pérdida de potencia es aproximadamente del 10%. Entonces, manteniendo este concepto en la ciudad de La Paz se tiene

$$3600\ msnm * \frac{10\%}{1000\ msnm} = 36\%$$

$$P_{real} = 0{,}481\ W + (0{,}481W * 0{,}36) = 0{,}654\ W \tag{6.18}$$

Por tanto la potencia del extractor debe ser de:

$$P_{real} = 0{,}654\ W$$

### 6.1.3. Selección del material

La mayoría de los extractores a nivel Bench Scale son construidos en vidrio pyrex, acero inoxidable o cobre. De estos materiales el más recomendado para estar en contacto con material vegetal es el acero inoxidable esto por su alta resistencia a la corrosión, resistente a golpes y tensiones mecánicas, se puede limpiar en profundidad sin ser alterado el material evitando así la formación de hongos y la eliminación de bacterias que pueden afectar a la materia prima, al no estar recubierto de ningún protector que se degrade no llegara a afectar al proceso a largo plazo.

Según la norma API 650 indica que es importante seleccionar el material adecuado dentro de la variedad de aceros que existen en el mercado. El acero 304 según las propiedades físicas, los aspectos que determinan su uso mecánico, químico y térmico, su porcentaje, es suficiente para que sea una aleación más flexible que otros, tiene buena resistencia a la corrosión y su accesible costo (API, 1988).

### 6.1.4. Espesor de la pared

La norma estándar API 650 indica que el espesor de la pared por condición de diseño, se calcula con base al nivel del líquido, tomando la densidad relativa del fluido establecido por el usuario. El espesor por condiciones de prueba hidrostática se obtiene considerando el mismo nivel de diseño, pero ahora utilizando la densidad relativa del agua (API, 1988).

El estándar API 650 provee el método llamado “1-pie” para el cálculo del espesor de diseño y el espesor de prueba hidrostática. Bajo este método, los valores del espesor de diseño y espesor de la prueba hidrostática son calculados mediante:

$$t_d = \frac{4{,}9D(H-0{,}3)G}{S_d} + CA \tag{6.19}$$

$$t_t = \frac{4{,}9D(H-0{,}3)}{S_t} \tag{6.20}$$

Donde:

Td= espesor por condiciones de diseño

Tt= espesor por prueba hidrostática

D= diámetro nominal del tanque

H= nivel del líquido de diseño

G= gravedad especifica del líquido

CA= tolerancia de corrosión

Sd= esfuerzo permisible de diseño

St= esfuerzo permisible para la prueba hidrostática

$$t_d = \frac{4{,}9 * 0{,}374m\ (0{,}519m - 0{,}3) * \frac{0{,}850}{1}}{155{,}13\ MPa} + 1{,}587\ mm = 1{,}589\ mm$$

$$t_t = \frac{4{,}9 * 0{,}374m\ (0{,}519m - 0{,}3)}{171MPa} = 0{,}002\ mm$$

Ajustando a un 20% de factor de seguridad el espesor requerido es:

$$t_{dreal} = 1{,}589 + (1{,}589\ mm * 0{,}20) = 1{,}906\ mm \tag{6.21}$$

Las láminas de acero inoxidable 304 tienen un espesor mínimo de 3 mm por lo que de acuerdo al espesor encontrado con ajuste de seguridad las láminas a utilizar son de acero inoxidable 304 de 3 mm.

### 6.1.5. Diseño de la canasta

Para extraer fácilmente la materia prima tratada, se incluirá en el tanque agitado una canasta perforada con un diámetro de poro inferior al menor tamaño de partícula. Tomando en cuenta el espesor del material y el ancho de los deflectores tenemos para el diámetro del canastillo:

$$D_{canastillo} = D_t - 2e - J \tag{6.22}$$

$$D_{canastillo} = 0{,}374\ m - 2(0{,}003\ m) - 4(0{,}031\ m) = 0{,}244\ m$$

Para la altura del canastillo

$$H_{canastillo} = H_{TK} = 0{,}519\ m \tag{6.23}$$

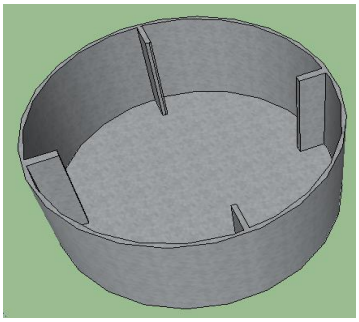
Dados los resultados tenemos las dimensiones del extractor:

**Tabla 24.** Dimensiones para el extractor en acero inoxidable.

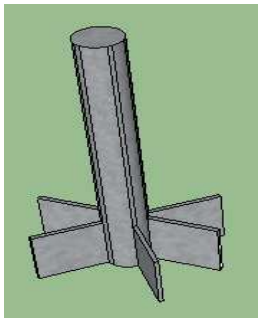
| Características | Valor |
|---|---|
| Diámetro del tanque | $0{,}374\ m$ |
| Altura del tanque | $0{,}519\ m$ |
| Ancho del deflector | $0{,}031\ m$ |
| Diámetro del agitador | $0{,}125\ m$ |
| Altura de la base del tanque al agitador | $0{,}125\ m$ |
| Altura del agitador | $0{,}075\ m$ |
| Base del agitador | $0{,}093\ m$ |
| Reynolds | $235{,}530$ |
| Np | 4 |
| Potencia | $0{,}654\ W$ |
| Material | Acero inoxidable 304 |
| Espesor de la lámina | $3\ mm$ |
| Diámetro de canastilla | $0{,}244\ m$ |
| Altura de la canastilla | $0{,}519\ m$ |

**Fuente.** Elaboración propia

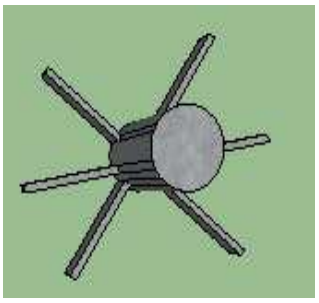
### 6.1.6. Imágenes 3D del extractor.



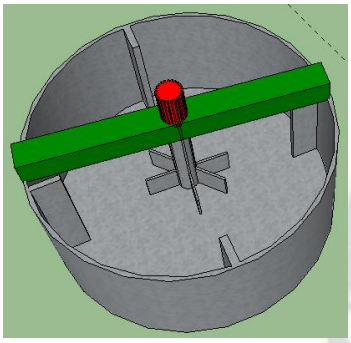
Tanque con deflectores



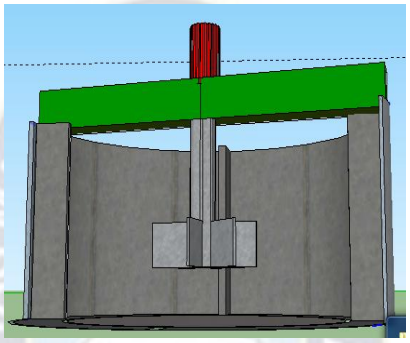
Vista lateral de agitador



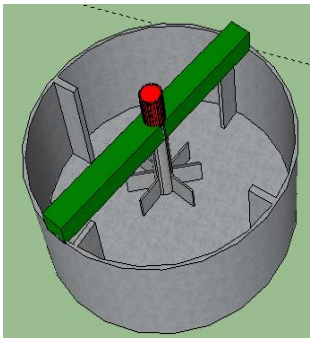
Vista espacial de agitador



Agitador armado

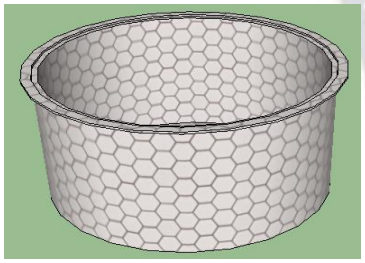


Vista de corte transversal de agitador

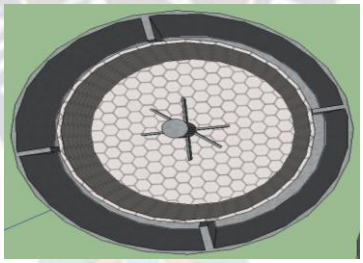


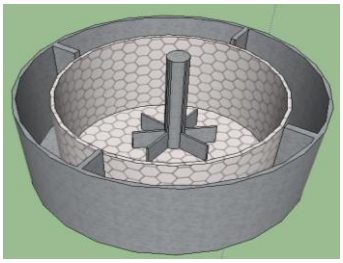
Vista espacial del agitador

**Figura 73.** Vistas de extractor en 3D a escala
**Fuente:** Elaboración propia

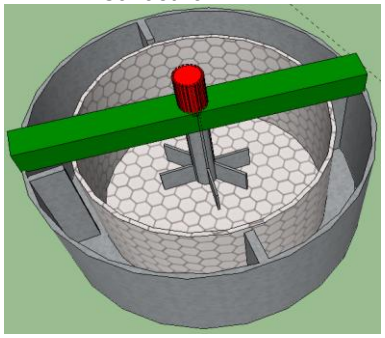


Canastilla

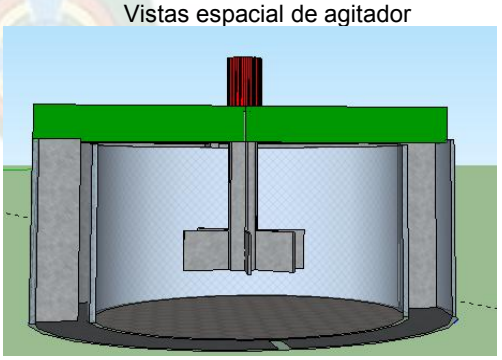




Vistas espacial de agitador



Extractor montado



Vista de Corte transversal del extractor

**Figura 74.** Vistas de extractor con canastillas en 3D a escala
**Fuente.** Elaboración propia

# CAPÍTULO VI

# CONCLUSIONES

# Y

# RECOMENDACIONES

# CAPITULO VI
# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 6.1. Conclusiones

*De la caracterización de materia prima*

- Se determinó las siguientes propiedades:

| | |
|---|---|
| Densidad del solvente | 0,862 g/ml |
| Densidad del extracto | 0,850 g/ml |
| Densidad del solido | 3,620 g/ml |
| Humedad | 22,389 % |
| pH | 5 |
| Cenizas | 5,490 % |
| Viscosidad | 0,094 Pa*s |

- Mediante el estudio fitoquímico se determinó la presencia de Flavonoides, Taninos y compuestos fenólicos.

*De la identificación de variables de proceso*

- A través de las pruebas preliminares se determinó que las variables más influyentes para el proceso de extracción son el tiempo de extracción (LI: 3horas; LS: 48horas) y el tamaño de partícula ((LI: 0,500mm; LS: 0,300mm). Los parámetros como: Relación soluto/solvente (1:20 g/ml), temperatura (20ºC) y agitación (100 RPM) permanecen constantes.

*De las variables de mayor influencia*

- Se realizó el diseño experimental el Software Design Expert, con el cual se obtiene un diseño factorial $2^2$ con un coeficiente de correlación $r^2$ de 0,9834 y una desviación estándar de 0,960.
- Mediante el análisis de varianza y la gráfica de Daniel, se estableció que los efectos Tiempo de extracción, Tamaño de partícula y su interacción son significativos.
- Del análisis de superficie de respuesta, se indicó que el rendimiento incrementa conforme al aumento de los valores de las variables Tiempo de extracción y Tamaño de partícula.

- Mediante la optimización las mejores condiciones de operación determinadas por el Software Design Expert para el mejor rendimiento son las siguientes: Tiempo de extracción (48 horas) y tamaño de partícula (0,300 mm), para obtener un rendimiento de extracción de sustrato de 28,550%. Para el proceso tomando las variables influyentes se determina la ecuación ajustada:

$$Rendimiento = 20{,}58 + (0{,}630\ t) - (3{,}79\ TP) - (3{,}55\ t * TP)$$

- Utilizando las mejores condiciones de operación de forma experimental se llegó a tener un rendimiento de 28,143%.

*De la caracterización del producto*

- Mediante el proceso por cromatografía se realizó el aislamiento del flavonoide mayoritario presente en la materia prima (cálices de Chilto).
- Utilizando Resonancia magnética nuclear se determinaron los espectros de protón y carbono de la muestra LSA MR1 y por comparación de espectros de la muestra pura Rutina y artículo científico validado se determinó que el flavonoide mayoritario es el flavonoide Rutina.
- Mediante la técnica cromatografía de alta eficiencia HPLC se determinó el tiempo de retención y la cuantificación del flavonoide Rutina dando como resultado: tiempo de retención de 6,6076 minutos, 38,320 mg de Rutina/ g de extracto y 4,940 g de Rutina/kg de cálices secos de Chilto.

*Del diseño del extractor*

- El material de construcción del equipo es de acero inoxidable 304 para asegurar la calidad del producto, además facilita la limpieza, uso y durabilidad del equipo.
- Mediante el diseño del extractor se determina las siguientes características del mismo:

| | |
|---|---|
| Diámetro del tanque | $0{,}374\ m$ |
| Altura del tanque | $0{,}519\ m$ |
| Ancho del deflector | $0{,}031\ m$ |
| Diámetro del agitador | $0{,}125\ m$ |
| Altura de la base del tanque al agitador | $0{,}125\ m$ |
| Altura del agitador | $0{,}075\ m$ |

| | |
|---|---|
| Base del agitador | $0{,}093\ m$ |
| Reynolds | $235{,}530$ |
| Np | 4 |
| Potencia | $0{,}654\ W$ |
| Material | Acero inoxidable 304 |
| Espesor de la lámina | $3\ mm$ |
| Diámetro de canastilla | $0{,}244\ m$ |
| Altura de la canastilla | $0{,}519\ m$ |

- Los inconveniente que se puede presentar en la aplicación del proyecto es la falta de la cantidad requerida de materia prima y esté se encuentre libre de impurezas.
- La implementación de una pequeña planta en la comunidad de Comarapa presentaría los siguientes inconvenientes:

| | |
|---|---|
| Clima | Es variado de acuerdo a la época por lo que influye en la producción. |
| Recursos hídricos | El uso de agua para cultivos, ganado y consumo humano es a partir del aprovechamiento de los ríos Comarapa, San Isidro, San Mateo y San Juan del Potrero. |
| Servicios básicos | Ausencia de los mismos. |
| Accesos | La distancia de la ciudad de Santa Cruz a Comarapa demora un tiempo de 3 horas y 20 min y desde la ciudad de Cochabamba 3 horas y 15 min. No cuenta con caminos asfaltados para transporte. |

## 6.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar proyectos de grado que consideren:

- En elaborar un estudio económico con el propósito de estudiar la factibilidad del proyecto.
- Realizar el diseño a nivel planta piloto.
- Realizar un estudio de la actividad antioxidante y la actividad antiinflamatoria del extracto de los cálices de Chilto con el fin de obtener mayor información de sus beneficios medicinales.

- Realizar un trabajo multidisciplinario de difusión de los beneficios de Chilto en las localidades que tienen áreas erosionadas por los cultivos de hoja de coca, así motivando a la reactivación de estas áreas productoras.
- Realizar un trabajo multidisciplinario entre la Facultad de Ingeniería y la Facultad de Ciencias Puras y Naturales que permita proseguir con el estudio e identificación de los metabolitos secundarios que no fueron analizados en el proyecto.
- Se sugiere desarrollar un trabajo de difusión de los beneficios de los cálices de Chilto en las localidades productoras para que tengan un mayor cuidado, que permitirá un mejoramiento a los cultivos para obtener una mayor concentración de compuestos y mayor rendimiento económico de la venta de estos.

# BIBLIOGRAFÍA

**BIBLIOGRAFIA.-**


Amazónicas, I. d. (2020). *Catálogo de frutas amazónicas.* La Paz - Bolivia: Instituto de Investigaciones amazónicas .

Andersen, O., & Markham, K. (2006). *Flavonoids; Chemistry, Biochemistry and Applications.* New York: Taylor & Francis Group.

API, 6. (Noviembre de 1988). *API 650* (Octava edición ed.). Washintong, D.C.

ASME. (2001). *American Society Mechanical Enginieers, sección VIII.* New york.

Beltrán, A. (2009). Producción y exportación de uvilla (Physlis peruviana L.) al mercado de Alemania. *Msc. Thesis. Universidad Tecnologica Equinoccial.*

Brodkey, R., & Hershey, H. (1988). *Transport phenoma a Unified Approach.* Singapore: International Edition.

Calvo Villegas, I. (2009). *El cultivo de la Uchuva.* San José, Costa Rica: Proyecto Microcuenca Plantón- Pacayas.

Camacho, G., & Sanabria, G. (2005). *Alternaivas de procesamiento y transformación de la uchuva.*

Carballido, E. (3 de Junio de 2020). *Botanical online.* (E. d. Botanical-online, Ed.) Recuperado el 8 de Agosto de 2022, de https://www.botanical-online.com/dietas/rutina-propiedades

Cerpa Chávez, M. G. (2007). *Hidrodestilación de aceites esenciales: Modeladoy caracterización.* Universidad de Valladolid. Ciudad de Valladolid: Universidad de Valladolid.

da Silda Junior, W., & Severo menezes, A. (2017). Aislamiento y determinación estructural de constituyentes químicos de hojas de Odontadenia lutea. *Universidad Estatal de Goiás*.

Docencia, E. (19 de Septiembre de 2014). *Tipos de Cromatografía.* Recuperado el 1 de agosto de 2022, de blog.utp.edu.co: https://blog.utp.edu.co/docenciaedwin/files/2014/09/TIPOS-CROMATOGRAF%C3%8DA.pdf

Economy. (27 de Septiembre de 2018). *www.economy.com.bo*. Obtenido de www.economy.com.bo/negocios-economy/retail/862-crema-rejuvenecedora-uchuva-gana-premio-internacional-de-cosmetica.html.

Estrada Reyes, R., Ubaldo Suárez, D., & Araujo Escalona, A. G. (2012). Los flavonoides y el sistema Nervioso Central. *Salud mental*.

FAO. (2006). *Uchuva (Physalis peruviana L.).* Ficha tecnica .

Fernandez, M. (4 de Abril de 2022). Comarapa produce más de la mitad de la frutilla de Bolivia. *La región, Periodismo de Medioambiente y Turismo*, pág. marcovinculos13.

Fisher, A., & Sora, D. (2000). *Producción, post cosecha y exportación de la uchuva (Physalis peruviana L.9.* Bogotá, Colombia: Unibiblios.

Franco Ospina, L. (2013). Evaluacion in vitro del efecto total etéreo de los cálices de Physalis peruviana L. en un modelo de colitis en rata. *Universidad de Cartagena*.

Franco, L., Matiz, G., Calle, J., Pinzón, R., & Ospina, L. (2007). Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de Physalis peruviana L. *Universidad de Cartagena* .

Geankoplis, C. (1998). *Procesos de transporte y operaciones unitarial.* México: Compañia editorial continental, S.A. de C.V. México.

Grotewold, E. (2006). *The Science of Flavonoids.* Ohio: Springer Science+Business Media, Inc.

Guarachi, A. (2004). *Operaciones de separación por lotes.* La Paz.

Gutiérrez Pulido, H. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (Sedunda Edición ed.). Mexico D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.

Houghton, P., & Raman, A. (1998). *Laboratory Handbook for the fractionation of natural extracts.* London: Springer-Science+Business Media, B.V.

Laurella, S. L. (2017). *Resonancia magnética nuclear. Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares* (primera edición ed.). La Plata: Editorial de la Universidad de La Plata.

Lopez, S. (1978). Un nuevo cultivo de rentabilidad. *Revista Esso Agrícola*.

Martinez, M. (2005). Flavonoides. *Facultad de Química Farmacéutica*, 76.

McCabe, W. L., Smith, J. C., & Harriott, P. (1991). *Operaciones unitarias en ingenieria quimica* (cuarta edición ed.). Madrid: McGrawHill.

Melo, O., López, L., & Melo, S. (2020). *Diseño de experimentos métodos y aplicaciones* (segunda edición ed.). Bogotá D.C., Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

National Research, C. (1989). *Goldenberry (Cape Gooseberry). Lost crops of the Incxas Litle-known plants of the andes with promise for worldwide cultivation.* Washington D.C.: National academy Press.

Nogueira Oliveira, L. M., Ribeiro da Silva, L. M., Silva de Lima , A. C., de Almeida, R. R., Pontes Silva Ricardo, N. M., & Teixeira de Figueiredo, E. A. (21 de Marzo de 2020).

Caracterización de rutina, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de pulpas y subproductos de frutas tropicales. *Society and Development, 9*(4), 12.

Özdemir, Y., & Günal, N. (2012). Nueva planta cultivada en la llanura de Söke (Aydin): cereza molida/ grosella espinosa (Physalis peruviana). *Revista geográfica turca*.

Reich, E., & Schibli, A. (2006). *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants.* New York: Thieme Medical Publishers, Inc.

Rodríguez, S., & Rodríguez, E. (2007). Efecto de la ingesta de Physalis peruviana (aguaymanto) sobre la glicemia postprandial en adultos jóvenes. *Revista Medica Vallejiana*.

Rostango , M., & Prado, J. (2013). *Natural Product Extraction Principles and Applications.* United Kingdom: The Royal Society of Chemistry.

Treybal, R. E. (1988). *Operaciones de Transferencia de masa* (segunda ed.). McGRAW-HILL.

Valencia Ortiz, C. (1995). *Fundamentos de Fotoquímica* (primera edición ed.). México D.F.: TRILLAS.

Vargas, N. (1 de Julio de 2014). El vivero de los golden berries. *Diario página siete*.

Zabala, D., Quispe, M., Pelayo, A., Posso, M., Rojas, & Wolach, V. (2006). Efecto citotóxico de Physalis peruviana (capuli) en cancér de colon y leucemia mieloide crónica. *An Fac Med.*

# GLOSARIO

## GLOSARIO

**Acido.** Sustancia química que emite iones de hidrógeno en el agua y forma sales cuando se combina con ciertos metales.

**Activo.** Toda sustancia o mezcla de sustancias destinadas a la fabricación de un medicamento.

**ANOVA.** Análisis de la Varianza es una fórmula estadística que se utiliza para comparar las varianzas entre las medias de diferentes grupos.

**Anoxia.** Falta o disminución de oxígeno en las células, los órganos o la sangre.

**Antioxidante.** Sustancia que impide la formación de óxidos.

**Baya.** Fruto carnoso o pulposo con varias semillas en su interior que están envueltas directamente por la pulpa; suele tener forma redondeada o elipsoidal.

**Benzopirano.** Hidrocarburo poli aromático con tres anillos de benceno

**Bioactivos.** Componentes de los alimentos que influyen en las actividades celulares y fisiológicas obteniendo, tras su ingesta, un efecto beneficioso para la salud.

**Cáliz. E**s una estructura floral compuesta por hojas modificadas llamadas sépalos, ubicada en la parte más externa de la flor.

**Cáncer. E**nfermedad por la que algunas células del cuerpo se multiplican sin control y se diseminan a otras partes del cuerpo.

**Células.** Unidad anatómica fundamental de todos los organismos vivos, generalmente microscópica, formada por citoplasma, uno o más núcleos y una membrana que la rodea.

**Cenizas.** Polvo de color gris claro que queda después de una combustión completa y está formado generalmente por sales alcalinas y térreas, sílice y óxidos metálicos.

**Chilto.** Planta herbácea perteneciente a la familia Solanaceae nombre científico Physalis Peruviana

**Citrus.** Genero de plantas cuyo término común es cítrico.

**Cizallamiento.** Es la acción o el estrés resultante de fuerzas aplicadas que causa que dos partes contiguas de un cuerpo o dos cuerpos

**Columna. I**nstalación que se usa para realizar determinados procesos como son la destilación, la absorción, la adsorción, el agotamiento, etc; y cuya utilidad es la de separar los diversos componentes de una mezcla simple o compleja.

**Compuesto activo.** Es toda sustancia o mezcla de sustancias destinadas a la fabricación de un medicamento y que, al ser utilizadas en su producción, se convierten en un componente activo

**Contracorriente.** Corriente que fluye en sentido contrario a otra

**Corola.** Conjunto de pétalos que forman la flor y protegen sus órganos de reproducción

**Cromatografía.** Método de análisis que permite la separación de gases o líquidos de una mezcla por adsorción selectiva, produciendo manchas diferentemente coloreadas en el medio adsorbente; está basado en la diferente velocidad con la que se mueve cada fluido a través de una sustancia porosa.

**Curva de calibración.** Es la representación gráfica que relaciona una señal instrumental en función de la concentración de un analito y define un intervalo de trabajo en el cual, los resultados a informar tienen una precisión y exactitud conocida que ha sido documentada en la validación de cada método.

**Densidad.** Relación entre la masa y el volumen de una sustancia, o entre la masa de una sustancia y la masa de un volumen igual de otra sustancia tomada como patrón.

**Design Expert.** Software para diseñar un experimento ideal en un proceso que mezcla o combina factores y componentes.

**Diagrama.** Representación gráfica de las variaciones de un fenómeno o de las relaciones que tienen los elementos o las partes de un conjunto.

**Difusividad.** Propiedad específica de cada material para caracterizar conducción de calor en condiciones no estacionarias.

**Diseño.** Proceso sistemático, creativo y flexible, sustentado en las matemáticas, las ciencias naturales y las ciencias de la ingeniería.

**Efectividad. C**apacidad de conseguir el efecto deseado en lo que se realiza.

**Eficiencia.** Capacidad para realizar o cumplir adecuadamente una función.

**Equilibrio.** Estado de inmovilidad de un cuerpo sometido a dos o más fuerzas de la misma intensidad que actúan en sentido opuesto, por lo que se contrarrestan o anulan.

**Erosionado.** Desgaste o destrucción producidos en la superficie de un cuerpo por la fricción continúa o violenta de otro.

**Estándar.** Que sirve de patrón, modelo o punto de referencia para medir o valorar cosas de la misma especie.

**Estrés oxidativo.** Proceso que se produce en nuestro cuerpo debido a un exceso de radicales libre y a la falta de antioxidantes para contrarrestarlos.

**Evaporación.** Proceso físico que consiste en el paso lento y gradual de un estado líquido hacia un estado gaseoso, tras haber adquirido suficiente energía para vencer a la tensión superficial.

**Exclusión molecular.** Es el nombre general para los procesos de separación de biomoléculas de acuerdo a su tamaño cuando una solución fluye a través de una cama empacada con un medio poroso.

**Experimental.** Que sirve de experimento, con vistas a posibles perfeccionamientos, aplicaciones y difusión.

**Extracción.** Separación de un componente en el seno de una mezcla por la acción de un solvente, selectivamente.

**Farmacología.** Es la ciencia que estudia los productos farmacológicos o sustancias químicas abarcando los efectos biológicos.

**Ficha Técnica.** Es un documento en forma de sumario que contiene la descripción de las características de un objeto, material, proceso o programa de manera detallada.

**Fotoquímico.** Son compuestos químicos producidos por las plantas, estos generalmente juegan un papel en el crecimiento de la planta o en su defensa contra competidores, patógenos o depredadores.

**Flavonoides.** Serie de metabolitos secundarios de las plantas.

**Flexibilidad.** Capacidad de doblarse un cuerpo fácilmente y sin que exista peligro de que se rompa.

**Gel.** Materia con apariencia de sólido y aspecto gelatinoso que se forma al dejar en reposo una disolución coloidal

**Hermafroditas.** Planta en la que concurren los dos sexos en la misma flor.

**HPLC.** La cromatografía líquida de alta eficacia o high performance liquid chromatography es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica.

**Humedad.** Cantidad de agua, vapor de agua o cualquier otro líquido que está presente en la superficie o el interior de un cuerpo o en el aire.

**Inflamación.** Proceso en el que nuestras células inmunitarias atacan a las bacterias o los virus invasores, eliminan la destrucción de tejidos que causan, e inician el proceso de reparación.

**Lenticular.** Que tiene forma convexa por ambos lados, como la lenteja.

**Lixiviación.** Extracción de la materia soluble de una mezcla mediante la acción de un disolvente líquido.

**Metabolitos.** Sustancia producida durante el metabolismo, digestión u otros procesos químicos.

**Metabolitos secundarios.** Compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo, al contrario que los metabolitos primarios.

**Modelo.** Representación reducida de un sistema o realidad compleja que se elabora para facilitar su compresión y estudio.

**Molienda.** Proceso que consiste en desmenuzar una materia sólida, especialmente granos o frutos, golpeándola con algo o frotándola entre dos piezas duras hasta reducirla a trozos muy pequeños, a polvo o líquido.

**Partícula.** Cuerpo material de pequeñas dimensiones constituyente de la materia.

**Patógenos.** Que causa o produce enfermedad.

**Physalis.** Uno de los géneros más fáciles de reconocer dentro de la familia Solanaceae.

**Policíclico.** Compuesto cíclico con más de un ciclo hidrocarbonado.

**Porosidad.** Medida de espacios vacíos en un material, y es una fracción del volumen de huecos sobre el volumen total.

**Potencia.** Es una medida de la tasa a la que se realiza un trabajo.

**Presión.** Fuerza que ejerce un gas, un líquido o un sólido sobre una superficie.

**Pubescente.** Órgano vegetal que presenta su superficie vellosa, cubierta de pelos finos y suaves**.**

**Quelante.** Compuesto químico que se une con firmeza a los iones metálicos.

**Radical.** Especie química, caracterizada por poseer uno o más electrones desapareados.

**Reactivadora.** Capacidad para reaccionar en presencia de otras sustancias químicas o reactivas.

**Regeneración.** Proceso natural de reemplazar o reparar células, tejidos, órganos o, incluso, partes completas de los cuerpos dañados o faltantes para que funcionen completamente en las plantas y los animales.

**Reynolds.** Número adimensional utilizado en mecánica de fluidos, diseño de reactores y fenómenos de transporte para caracterizar el movimiento de un fluido.

**RMN.** La espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica analítica utilizada para determinar la estructura molecular y la composición química de una muestra.

**Rutina.** Es un glucósido flavonoide encontrado en algunas plantas.

**Screening fitoquímico.** Procedimiento que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción o fraccionamiento de los extractos**.**

**Secado.** Acción que consiste en eliminar totalmente el líquido o humedad contenido en una cosa.

**Sépalos.** Hoja que forma el cáliz de una flor.

**Shepadex.** Es una marca registrada de gel dextrano reticulado que se usa en laboratorio para la separación de moléculas por peso molecular.

**Síntesis.** Es el proceso por el cual se producen compuestos químicos a partir de compuestos simples o precursores químicos.

**Soluto.** Es la sustancia que se disuelve.

**Solvente.** Sustancia química en la que se disuelve un soluto, resultando en una disolución; normalmente el solvente es el componente de una disolución presente en mayor cantidad.

**Sustrato.** Es típicamente la especie química que se observa en una reacción química, que reacciona con un reactivo para generar un producto.

**Tamizado.** Método mecánico para separar dos sólidos formados por partículas de tamaños diferentes.

**Temperatura.** Magnitud escalar relacionada con la energía interna de un sistema termodinámico, definida por el principio cero de la termodinámica.

**Termosensibles.** Productos que son sensibles a los cambios de temperatura o que no resisten al calor.

**TLC.** Método de afinidad que se utiliza para separar los compuestos de una mezcla.

**Transposones.-** Elemento genético transponible en una secuencia de ADN.

**Turbina.** Máquina que consiste en una rueda en el interior de un tambor provista de paletas curvas sobre las cuales actúa la presión de un fluido haciendo que esta gire.

**UV.** Radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 100 nm y los 400 nm.

**Variables.** Propiedad que puede adquirir diferentes valores en un conjunto determinado y cuya variación es susceptible de ser medida.

**Viscosidad.** Medida de su resistencia a las deformaciones graduales producidas por tensiones cortantes o tensiones de tracción en un fluido.

# ANEXOS

**ANEXO A.**

**NORMA TÉCNICA COLOMBIANA** **NTC 4580**

1999-02-17

**FRUTAS FRESCAS.**
**UCHUVA. ESPECIFICACIONES**

ICONTEC

E: FRESH FRUITS. CAPE GOOSEBERRY. SPECIFICATIONS

CORRESPONDENCIA:

DESCRIPTORES: uchuva, frutas, producto vegetal.

I.C.S.: 67.080.10

Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC)
Apartado 14237 Bogotá, D.C. - Tel. 6078888 - Fax 2221435

Prohibida su reproducción

**PRÓLOGO**

El Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (**ICONTEC**) es el organismo nacional de normalización, según el Decreto 2269 de 1993.

**ICONTEC** es una entidad de carácter privado, sin ánimo de lucro, cuya Misión es fundamental para brindar soporte y desarrollo al productor y protección al consumidor. Colabora con el sector gubernamental y apoya al sector privado del país, para lograr ventajas competitivas en los mercados interno y externo.

La representación de todos los sectores involucrados en el proceso de Normalización Técnica está garantizada por los Comités Técnicos y el período de Consulta Pública, este último caracterizado por la participación del público en general.

La NTC 4580 fue ratificada por el Consejo Directivo de 1999-02-17

Esta norma está sujeta a ser actualizada permanentemente con el objeto de que responda en todo momento a las necesidades y exigencias actuales.

A continuación se relacionan las empresas que colaboraron en el estudio de esta norma a través de su participación en el Comité Técnico 11003 Frutas, legumbres, hortalizas y tubérculos frescos.

CARULLA Y CÍA
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ – CENCAFÉ-
FRUTEXTO
ICA
MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL
MINISTERIO DE SALUD
VICTORINCITA Y CÍA.

Además de las anteriores, en Consulta Pública el Proyecto se puso a consideración de las siguientes empresas:

ALL FRUIT LTDA.
CADENALCO S.A.
CARIBBEAN EXOTICS
CONABASTOS
CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL
EL TESORO FRUIT
FRUTIERREZ S.A.

**ICONTEC** cuenta con un Centro de Información que pone a disposición de los interesados normas internacionales, regionales y nacionales.

**DIRECCIÓN DE NORMALIZACIÓN**

FRUTAS FRESCAS.
UCHUVA. ESPECIFICACIONES

## 1. OBJETO

Esta norma establece los requisitos que debe cumplir la uchuva *Physalis peruviana* L.), destinada para el consumo fresco o como materia prima para el procesamiento.

## 2. DEFINICIONES, CLASIFICACIÓN Y CALIBRE

### 2.1 DEFINICIONES

Para efectos de la presente norma se consideran las siguientes definiciones:

2.1.1 Capacho o Cáliz: conjunto de hojas o sépalos que protegen el fruto.

2.1.2 Pedúnculo: tallo del fruto.

2.1.3 Rajadura: rompimiento superficial de la epidermis.

2.1.4 Tabla de color: indica el desarrollo de la madurez del fruto a través de los cambios de color externo. Se identifican los estados por una escala numérica que inicia en 0 y termina en 6.

2.1.5 Fruto fisiológicamente desarrollado: estado en el cual se inicia el proceso de maduración del fruto y corresponde al color 0 de la tabla de color.

2.1.6 Fruto no climatérico: se refiere a los productos que al ser cosechados, presentan una disminución de la tasa de respiración, ocasionando cambios poco notorios principalmente en los contenidos de azúcares y ácidos.

### 2.2 CLASIFICACIÓN

La uchuva se comercializa con o sin capacho.

Independiente del calibre y del color, se clasifica en tres categorías que se definen a continuación:





#### 2.2.1 Categoría extra

La uchuva debe cumplir los requisitos generales definidos en el numeral 3.1 y estar exenta de todo defecto que demerite la calidad del fruto (véase la Figura 1).

El capacho puede presentar manchas superficiales ocasionadas por humedad y/o por hongos (sin la presencia de éstos). Estos defectos en conjunto no deben exceder el 5 % del área total.

Figura 1. Categoría extra

#### 2.2.2 Categoría I

La uchuva debe cumplir los requisitos generales definidos en el numeral 3.1 y estar exenta de todo defecto que demerite la calidad del fruto (véase la Figura 2).

El capacho puede presentar manchas superficiales ocasionadas por humedad y/o por hongos (sin la presencia de éstos). Estos defectos en conjunto no deben exceder el 10 % del área total.

Figura 2. Categoría I

### 2.2.3 Categoría II

Comprende la uchuva que no puede clasificarse en las categorías anteriores, pero cumple los requisitos generales definidos en el numeral 3.1. Se admiten frutos rajados que no excedan el 5 % del área total (véase la Figura 3).

El capacho puede presentar manchas superficiales ocasionadas por humedad y/o por hongos (sin la presencia de éstos). Estos defectos en conjunto no deben exceder el 20 % del área total.

Figura 3. Categoría II

## 2.3 CALIBRE

Se determina por el diámetro ecuatorial de cada fruto, como se indica en el numeral 5.1, de acuerdo con la siguiente escala:

Tabla 1. Calibres de la uchuva

| Diámetro (mm) | Calibre |
|---|---|
| ≤ 15,0 | A |
| 15,1 - 18,0 | B |
| 18,1 - 20,0 | C |
| 20,1 - 22,0 | D |
| ≥ 22,1 | E |

Nota. Se pueden tener frutos de categoría extra y de las demás categorías, en cualquiera de los calibres establecidos en la Tabla 1.

## 3. REQUISITOS Y TOLERANCIAS

### 3.1 REQUISITOS GENERALES

El fruto y el capacho en todas las categorías deben estar sujetos a los requisitos y tolerancias permitidas. Además, deben tener las siguientes características físicas:

- Los frutos deben estar enteros.
- Deben tener la forma esférica característica de la uchuva.
- La coloración de los frutos debe ser homogénea dependiendo del estado de madurez definido en la tabla de color.
- Deben presentar aspecto fresco y consistencia firme, su corteza debe ser lisa y brillante.
- Deben estar sanos (libres de ataques de insectos y/o enfermedades, que demeriten la calidad interna del fruto).
- Deben estar libres de humedad externa anormal producida por mal manejo en las etapas poscosecha (recolección, acopio, selección, clasificación, adecuación, empaque, almacenamiento y transporte).
- Deben estar exentos de cualquier olor y/o sabor extraño (provenientes de otros productos, empaques o recipientes y/o agroquímicos con los cuales hayan estado en contacto).
- Deben estar exentos de materiales extraños (tierra, polvo, agroquímicos y cuerpos extraños), visibles en el producto o en su empaque.
- La longitud del pedúnculo no debe exceder de 25 mm.

Los residuos de plaguicidas no deben exceder los límites máximos establecidos en el Codex Alimentarius.

### 3.2 REQUISITOS DE MADUREZ

La madurez de la uchuva se aprecia visualmente por el cambio del color externo. Su estado se puede confirmar por medio de la determinación de sólidos solubles totales, acidez titulable e índice de madurez.

La siguiente descripción relaciona los cambios de color con los diferentes estados de madurez (véase la Figura 4):

COLOR 0: fruto fisiológicamente desarrollado de color verde oscuro.

COLOR 1: fruto de color verde un poco más claro.

COLOR 2: el color verde se mantiene en la zona cercana al cáliz y hacia el centro del fruto aparecen unas tonalidades anaranjadas.





COLOR 3: fruto de color anaranjado claro con visos verdes hacia la zona del cáliz.

COLOR 4: fruto de color anaranjado claro.

COLOR 5: fruto de color anaranjado.

COLOR 6: fruto de color anaranjado intenso.

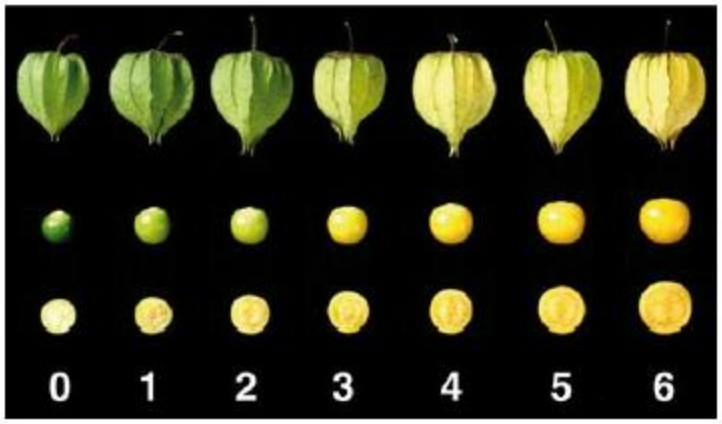



Figura 4. Tabla de color de la uchuva

El cambio en el color del capacho no es un indicativo del avance de la madurez del fruto.

### 3.3 REQUISITOS ESPECÍFICOS

#### 3.3.1 Sólidos solubles totales

Los valores mínimos de sólidos solubles totales, determinados como se indica en el numeral 5.2, que presenta cada uno de los estados identificados en la tabla de color (véase la Figura 4), son los siguientes:

Tabla 2. Contenido mínimo de sólidos solubles totales expresado como grados Brix (°Brix), de acuerdo con la tabla de color

| Color | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| °Bx (mínimo) | 9,4 | 11,4 | 13,2 | 14,1 | 14,5 | 14,8 | 15,1 |

### .3.2 Acidez titulable

os valores máximos de acidez titulable, determinados como se indica en el numeral 5.3, que resenta cada uno de los estados identificados en la tabla de color (véase la Figura 4), son los iguientes:

Tabla 3. Contenido máximo de acidez expresado como porcentaje de ácido cítrico, de acuerdo con la tabla de color

| Color | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % Ácido Cítrico (máximo) | 2,69 | 2,70 | 2,56 | 2,34 | 2,03 | 1,83 | 1,68 |

### .3.3 Índice de madurez

os valores mínimos del índice de madurez, determinados como se indica en el numeral 5.4, ue presenta cada uno de los estados identificados en la tabla de color (véase la Figura 4), son s siguientes:

Tabla 4. Índice de madurez mínimo expresado como ° Brix / porcentaje de ácido cítrico, de acuerdo con la tabla de color.

| Color | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| °Brix/% Ácido Cítrico (Mínimo) | 3,5 | 4,2 | 5,2 | 6,0 | 7,1 | 8,1 | 9,0 |

ara su comercialización se debe tener en cuenta que la uchuva es un fruto no climatérico véase el numeral 2.1.5).

l grado de madurez debe permitir la manipulación y el transporte de los frutos, sin deterioro iguno hasta su destino final.

## .4 TOLERANCIAS

e admiten tolerancias de calidad, color y calibre, en cada unidad de empaque para los roductos que no cumplan los requisitos de la categoría indicada.

### .4.1 Tolerancias de calidad

.4.1.1 Categoría extra. Para los frutos con o sin capacho se admite hasta el 5 % en número o en eso de uchuvas, que no correspondan a los requisitos de esta categoría, pero cumplan los equisitos de la categoría I.

.4.1.2 Categoría I. Para los frutos con o sin capacho se admite hasta el 10 % en número o en eso de uchuvas, que no correspondan a los requisitos de esta categoría, pero cumplan los equisitos de la categoría II.





3.4.1.3 Categoría II. Para los frutos con o sin capacho se admite hasta el 10 % en número o en peso de uchuvas, que no cumplan los requisitos de esta categoría, ni los requisitos generales definidos en el numeral 3.1, con excepción de los productos que presenten magulladuras severas. En esta categoría se admite máximo hasta el 20 % en número en peso de frutos rajados, con un área superior al 5 %.

### 3.4.2 Tolerancias de calibre

Para todas las categorías se acepta hasta el 10 % en número o en peso de frutos que correspondan al calibre inmediatamente inferior o superior, al señalado en el empaque.

### 3.4.3 Tolerancias de color

Para todas las categorías se acepta hasta el 10 % en número o en peso de frutos que correspondan al color inmediatamente inferior o superior, al señalado en el empaque.

## 4. TOMA DE MUESTRAS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN O DE RECHAZO

## 4.1 TOMA DE MUESTRAS

Para determinar la muestra destinada a medir el diámetro ecuatorial, se debe consultar la siguiente tabla:

Tabla 5. Tamaño de la muestra

| Tamaño del lote (Plantas, empaques, frutos) | Tamaño de la muestra (Plantas, empaques, frutos) |
|---|---|
| Hasta 150 | 5 |
| 151 - 1.200 | 20 |
| 1.201 - 10.000 | 32 |
| 10.001 - 35.000 | 50 |
| 35.001 - 500.000 | 80 |
| 500.001 y más | 125 |

Nota. En el Anexo A se contempla un ejemplo de aplicación de la Tabla 5.

Para identificar el estado de madurez se realizan los análisis físicos y químicos al jugo obtenido a partir de 400 g de frutos por cada color (véase la NTC 756).

## 4.2 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN O DE RECHAZO

Si la muestra evaluada no cumple los requisitos especificados en esta norma, se debe rechazar el lote. En caso de discrepancia, se deben repetir los ensayos sobre la muestra reservada para tal fin. Cualquier resultado no satisfactorio en este segundo caso debe ser motivo para rechazar el lote.

$$\text{Índice de madurez} = \frac{S.S.T.}{\text{Acidez titulable}}$$

## 6. EMPAQUE Y ROTULADO

### 6.1 EMPAQUE

El contenido de cada unidad de empaque debe ser homogéneo y estar compuesto únicamente por frutos del mismo origen, variedad, categoría, color y calibre. La parte visible del contenido del empaque debe ser representativa del conjunto.

Los empaques deben estar limpios y compuestos por materiales que no causen alteraciones al producto. Se acepta el uso de etiquetas con indicaciones comerciales siempre que se utilicen materiales no tóxicos y que permitan ser reciclados. Para ilustrar los sistemas de empaque véanse las Figuras 5 y 6.

Para el mercado interno se debe utilizar una canastilla plástica de fondo liso (véase la Figura 5) Las medidas externas son de 600 mm x 400 mm x 130 mm ó 500 mm x 300 mm x 150 mm (submúltiplos de las estibas de 1200 mm x 800 mm ó 1 200 mm x 1 000 mm). Si se empaca a granel se debe llenar la canastilla hasta 80 mm de altura como máximo y con una capacidad máxima de 6,5 kg de fruta. Si se requiere dosificar el producto en la canastilla plástica, éste se debe empacar en unidades de 250 g a 450 g.

Figura 5. Empaque para el mercado interno

Para el mercado de exportación (véase la Figura 6), el producto se debe presentar dosificado en envases plásticos perforados en unidades de 250 g a 450 g. Las dimensiones externas de la base de los empaques deben ser 400 mm x 300 mm ó 500 mm x 300 mm (submúltiplos de las estibas de 1200 mm x 800 mm ó 1 200 mm x 1 000 mm).

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 4580

## 5. ENSAYOS

### 5.1 DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO

Se mide el diámetro ecuatorial de cada fruto con un calibrador y el resultado se expresa en milímetros (mm).

### 5.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES

Se determina por el método refractométrico y se expresa en grados Brix (°Bx). La lectura se debe corregir utilizando el porcentaje de ácido cítrico, mediante la siguiente ecuación:

$$S.S.T_{corr} = 0.194 \times A + S.S.T$$

Donde:

$A$ = % Ácido cítrico

$S.S.T.$ = sólidos solubles totales en grados Brix

Si el refractómetro utilizado no realiza la corrección por temperatura, se debe corregir la lectura como se indica en el Anexo B.

### 5.3 DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TITULABLE

Se determina por el método de titulación potenciométrica. Se expresa como porcentaje de ácido cítrico y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\%\,\text{Ácido Cítrico} = \frac{V_1 \cdot N}{V_2} \times K \times 100$$

Donde:

$V_1$ = volumen de NaOH consumido (ml)

$V_2$ = volumen de la muestra (5 ml)

$K$ = peso equivalente del ácido cítrico (0,064 g/meq)

$N$ = normalidad del NaOH (0,1 meq/ml)

### 5.4 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE MADUREZ

Se obtiene de la relación entre el valor mínimo de los sólidos solubles totales y el valor máximo de la acidez titulable. Se expresa como °Brix / % ácido cítrico.

Figura 6. Empaque para el mercado de exportación

## 5.2 ROTULADO

El rótulo debe llevar la siguiente información tanto para el mercado interno como para el externo:

- Identificación del productor, exportador o empacador (marca comercial, nombre, dirección o código)
- Nombre del producto: **UCHUVA** o **PHYSALIS**
- País de origen y región productora
- Características comerciales: categoría, calibre, peso neto y coloración en el momento del empaque
- Fecha de empaque
- Impresión con la simbología que indique el manejo adecuado del producto (véase la NTC 2479)



# 7. APÉNDICE

## 7.1 NORMAS QUE SE DEBEN CONSULTAR

Las siguientes normas contienen disposiciones que, mediante la referencia dentro de este texto, constituyen la integridad de esta norma. En el momento de la publicación eran válidas las ediciones indicadas. Todas las normas están sujetas a actualización, los participantes, mediante acuerdos basados en esta norma, deben investigar la posibilidad de aplicar la última versión de las normas mencionadas a continuación.

NTC 756:1973, Frutas y Hortalizas. Toma de muestras.

NTC 2479:1988, Embalajes. Indicaciones gráficas para el manejo de artículos.

## Anexo B

**Corrección de la lectura de °Bx por temperatura, estandarizado A 20 °C.**

| °Bx | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 |
|---|---|---|---|---|---|
| °C | | | Restar | | |
| 10 | 0,50 | 0,54 | 0,58 | 0,61 | 0,64 |
| 11 | 0,46 | 0,49 | 0,53 | 0,55 | 0,58 |
| 12 | 0,42 | 0,45 | 0,48 | 0,50 | 0,52 |
| 13 | 0,37 | 0,40 | 0,42 | 0,44 | 0,46 |
| 14 | 0,33 | 0,35 | 0,37 | 0,39 | 0,40 |
| 15 | 0,27 | 0,29 | 0,31 | 0,33 | 0,34 |
| 16 | 0,22 | 0,24 | 0,25 | 0,26 | 0,27 |
| 17 | 0,17 | 0,18 | 0,19 | 0,20 | 0,21 |
| 18 | 0,12 | 0,13 | 0,13 | 0,14 | 0,14 |
| 19 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,07 |
| °C | | | Sumar | | |
| 21 | 0,06 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 |
| 22 | 0,13 | 0,13 | 0,14 | 0,14 | 0,15 |
| 23 | 0,19 | 0,20 | 0,21 | 0,22 | 0,22 |
| 24 | 0,26 | 0,27 | 0,28 | 0,29 | 0,30 |
| 25 | 0,33 | 0,35 | 0,36 | 0,37 | 0,38 |
| 26 | 0,40 | 0,42 | 0,43 | 0,44 | 0,45 |
| 27 | 0,41 | 0,50 | 0,52 | 0,53 | 0,54 |
| 28 | 0,56 | 0,57 | 0,60 | 0,61 | 0,62 |
| 29 | 0,64 | 0,66 | 0,68 | 0,69 | 0,71 |
| 30 | 0,72 | 0,74 | 0,77 | 0,78 | 0,80 |



## Anexo A (Informativo)

**Ejemplo de aplicación de la tabla 5**

### Muestreo a nivel de huerto

Para el cultivo de uchuva varían las distancias de siembra que van desde 1 m x 1 m hasta 3 m x 3 m, generando diferentes densidades por unidad de área. Por ejemplo, si en 1 hectárea las plantas están a una distancia de 3 m x 2 m, entonces la densidad de siembra es de 1666 plantas, el tamaño de la muestra es el siguiente:

- Número total de plantas .....1666
- Plantas a cosechar .....32
- Recolectar de cada planta todos los frutos que cumplan con los criterios de cosecha manejados por el agricultor.

### Muestreo de la fruta empacada

**A granel:** si el lote a evaluar tiene 500 cajas con un peso aproximado de 6,5 Kg cada una, el tamaño de la muestra es de 20 cajas escogidas al azar y debido a que cada caja contiene aproximadamente 1300 frutos, de cada una se toman 32 frutos, por lo tanto el total de la muestra para este lote será de 640 frutos.

**Dosificada:** si el lote a evaluar tiene 500 cajas, el procedimiento es el siguiente:

1. Se escojen al azar 20 cajas.
2. De cada caja se toman 5 canastillas (100 canastillas en total)
3. De cada canastilla se calibran 5 frutos.

**Anexo C (informativo)**

La presente Norma Técnica Colombiana fue estructurada con base en los resultados obtenidos de la caracterización física y química de la uchuva, en las zonas representativas de producción, mediante el trabajo de investigación desarrollado por el Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFÉ, dentro de los términos de referencia del convenio suscrito entre el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia para la ejecución del Proyecto de Normalización y Homologación Internacional de Frutas y Hortalizas para Colombia a nivel nacional.

Durante la realización del trabajo de investigación, se contó con la participación de los productores y comercializadores de Santa Rosa de Osos (Antioquia), Villa de Leyva (Boyacá) y Granada (Cundinamarca) y la colaboración de las firmas exportadoras C.I. Frutiérrez y Caribbean Exotic.

Cenicafé, Chinchiná, Caldas. Octubre de 1998

# NORMA TÉCNICA COLOMBIANA

# NTC 5166

2003-05-28

**FRUTAS FRESCAS.**
**UCHUVA. ESPECIFICACIONES DEL EMPAQUE**

ICONTEC

E: FRESH FRUITS. CAPE GOOSEBERRY. PACKING SPECIFICATIONS

CORRESPONDENCIA:

DESCRIPTORES: fruta; uchuva; empaque.

I.C.S.: 67.080.10

Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC)
Apartado 14237 Bogotá, D.C. - Tel. 607 8888 - Fax 3331 031

Prohibida su reproducción Edición 2004-01-30

## PRÓLOGO

El Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, **ICONTEC**, es el organismo nacional de normalización, según el Decreto 2269 de 1993.

**ICONTEC** es una entidad de carácter privado, sin ánimo de lucro, cuya Misión es fundamental para brindar soporte y desarrollo al productor y protección al consumidor. Colabora con el sector gubernamental y apoya al sector privado del país, para lograr ventajas competitivas en los mercados interno y externo.

La representación de todos los sectores involucrados en el proceso de Normalización Técnica está garantizada por los Comités Técnicos y el período de Consulta Pública, este último caracterizado por la participación del público en general.

La NTC 5166 fue ratificada por el Consejo Directivo del 2003-05-28.

Esta norma está sujeta a ser actualizada permanentemente con el objeto de que responda en todo momento a las necesidades y exigencias actuales.

A continuación se relacionan las empresas que colaboraron en el estudio de esta norma a través de su participación en el Comité Técnico 39 Frutas, hortalizas y tubérculos frescos.

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ -CENICAFÉ-
C.I. PREEXEX S.A.
INDUSTRIAS ESTRA S.A.
OCATI LTDA.
SENA

Además de las anteriores, en Consulta Pública el Proyecto se puso a consideración de las siguientes empresas:

AGROAMERICAN PRODUCTO Y EMPAQUE
ANALDEX
ASOHOFRUCOL
BIOTEC
CAJAS PLÁSTICAS
CARULLA VIVERO S.A.
CENPACK
CORCHO Y ASOCIADOS
COLSUBSIDIO
CORPICOL
CORPIFROM
CORPOICA
CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL
CORPORACIÓN DE ABASTOS DE BOGOTÁ -CORABASTOS-
EL TESORO FRUIT S.A.
FRUTERA DEL PACÍFICO
IAC COLOMBIA
INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO -ICA-
INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES -UDCA-
KIWI LTDA
MINISTERIO DE AGRICULTURA
MINISTERIO DE COMERCIO, INDUSTRIA Y TURISMO
MORAS DE ORIENTE
LA QUIEBRA
OLÍMPICA
PASIFLORA COLOMBIANA
POSTOBÓN S.A.
PRODUCTORA DE JUGOS S.A.
PROEXPORT
SMURFIT CARTÓN DE COLOMBIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**FRUTAS FRESCAS.**
**UCHUVA. ESPECIFICACIONES DEL EMPAQUE**

## 1. OBJETO

Esta norma establece los requisitos que debe cumplir el empaque utilizado para la recolección y la comercialización de la uchuva (*Physalis peruviana* L.), tanto para el mercado fresco (nacional o de exportación) como para la agroindustria.

## 2. DEFINICIONES Y CLASIFICACIÓN

### 2.1 DEFINICIONES

**2.1.1**
**empaque o embalaje**
recipiente destinado a contener temporalmente la uchuva durante su manipulación, transporte, almacenamiento y su presentación para la venta, con el fin de protegerla, identificarla y facilitar dichas operaciones. Para efectos de esta norma se asume que empaque es igual a embalaje.

**2.1.2**
**paletización**
apilamiento o arrume sobre una superficie (paleta o estiba) de cierta cantidad de empaques de difícil manejo individual, pesados o voluminosos, que contienen el producto, con el fin de transportarlo al punto deseado con un mínimo esfuerzo y en una sola operación.

**2.1.3**
**módulo de empaque (minicontenedor)**
plano rectangular propuesto por la ISO[1], cuyas dimensiones del módulo básico son 600 mm por 400 mm. Sirve como referencia para la elaboración de empaques rectangulares resistentes de dimensiones mayores o menores.

**2.1.4**
**empaque dosificado**
unidad de empaque para productos muy perecederos, utilizada para contener frutos pequeños. Su capacidad varía de 150 g a 500 g.

[1] International Organization for Standardization





**2.1.5**
**empaque primario**
es el que está en contacto directo con las frutas.

**2.1.6**
**empaque secundario**
es el empaque múltiple que se utiliza para manejar varios empaques dosificados.

**2.1.7**
**densidad básica**
es la relación entre el peso de la madera que se obtiene después de un proceso de secado al horno a 103 °C ± 2 °C (según la NTC 206) y el volumen de la madera verde (sin secar). Esta propiedad física clasifica a la madera como dura (pesada) o blanda (liviana).

**2.1.8**
**madera seca al aire**
madera que ha alcanzado un contenido de humedad (12 %) en condiciones de secado natural (al aire), y que está en equilibrio con las condiciones atmosféricas del lugar.

### 2.2 CLASIFICACIÓN

#### 2.2.1 Recipientes de cosecha

Estos deben cumplir los requisitos generales definidos en el numeral 3.1.1 y los requisitos específicos definidos en el numeral 3.2.1 (véase la Figura 1).

Figura 1. Recipiente de cosecha

#### 2.2.2 Empaques de comercialización

Se clasifican de acuerdo al mercado de destino en:

**2.2.2.1 Mercado nacional**

**2.2.2.1.1 Empaques primarios**

Se utilizan para el mercado fresco o para la agroindustria. Deben cumplir con los requisitos generales definidos en el numeral 3.1.2 y los requisitos específicos definidos en el numeral 3.2. 2.

**No dosificados**: canastillas plásticas, cajas de madera y de cartón (véase la Figura 2).

Figura 2. Empaques no dosificados





**Dosificados**: empaques plásticos en unidades de 0,25 kg y de 0,50 kg (véase la Figura 3).

Figura 3. Empaques dosificados

**2.2.2.1.2 Empaques secundarios**

Empaques de plástico, cartón y madera que cumplan los requisitos generales definidos en numeral 3.1.2 y los requisitos específicos definidos en el numeral 3.2.2 (véase la Figura 4).

Figura 4. Empaques secundarios



**2.2.2.2. Mercado de exportación**

Los empaques primario y secundario, deben ser resistentes de cartón corrugado, madera o la combinación de ellos, siempre que cumplan con los requisitos generales definidos en el numeral 3.1.2 y los requisitos específicos definidos en el numeral 3.2.2 (véase la Figura 5).

Figura 5. Empaques para exportación.

## 3. REQUISITOS

Todos los recipientes o empaques utilizados para la uchuva deben cumplir con las siguientes características:

### 3.1 REQUISITOS GENERALES

**3.1.1 Recipientes de cosecha**

- Deben estar limpios (lavados y desinfectados) y secos antes de su uso.
- No haber estado en contacto con residuos de agroquímicos, ni sustancias tóxicas (combustibles o lubricantes).
- No deben presentar grietas o roturas que afecten la calidad del producto (magulladuras o heridas) y la resistencia del recipiente.
- Deben tener contornos redondeados sin rebabas ni aristas que puedan causar daño al producto.
- Deben tener paredes interiores lisas, sin aristas que maltraten el producto.

**3.1.2. Empaques de comercialización**

- Deben estar en buen estado (enteros, sin fracturas), para permitir la manipulación y el estibamiento del producto durante el transporte y almacenamiento.
- El diseño debe permitir una adecuada ventilación del producto.
- Deben estar construidos en material resistente a los impactos y a las vibraciones que ocurren durante el transporte.

- Deben estar construidos con materiales inertes, inocuos y que no afecten al medio ambiente.
- Deben estar libres de cualquier material extraño, ajeno al producto o al material de construcción del empaque.
- Utilizar empaques dosificados nuevos.
- Los empaques fabricados en plástico deben estar limpios (lavados y desinfectados) y secos antes de su uso.
- Los empaques de plástico y cartón deben tener el fondo y las superficies de contacto lisas. Los costados de las canastillas plásticas no podrán estar perforados en forma de malla.
- Los empaques secundarios de plástico pueden reutilizarse en la comercialización de este producto.
- Los empaques de madera deben limpiarse para eliminar los residuos de fabricación.
- La madera utilizada en la fabricación de empaques debe ser blanda (liviana), no transferir olores y sabores extraños al producto y provenir de plantaciones comerciales.
- Los empaques de madera no deben tener astillas, ni puntillas que dañen el producto.
- Las tablillas de la base de los empaques de madera deben estar separadas máximo 5 mm. Se recomienda colocar sobre ellos una capa amortiguadora de cartón o de papel.
- Utilizar empaques de cartón y de madera nuevos.
- Los empaques de cartón deben construirse utilizando impermeabilizantes (retardantes de humedad), cuya proporción confiera resistencia en condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad relativa).

NOTA 1 La uchuva empacada con capacho se protege de golpes y rozamientos, además, se prolonga el tiempo de vida comercial.

NOTA 2 La fruta destinada al empaque de comercialización debe ser homogénea en categoría y color de acuerdo con lo establecido en la NTC 4580.

## 3.2 REQUISITOS ESPECÍFICOS

### 3.2.1 Recipientes de cosecha

Las características de fabricación de los recipientes son las siguientes:

- Material plástico: polietileno de alta densidad o polipropileno recomendado para el manejo de alimentos.
- Independiente de la forma, debe tener una altura máxima de 250 mm y la capacidad no debe exceder a 8 kg.





NOTA En caso de utilizar directamente en el cultivo el empaque de comercialización, éstos deben cumplir los requisitos del numeral 3.2.2.1.

### 3.2.2 Empaques de comercialización

El material de fabricación de los empaques para la uchuva destinados para el mercado nacional como de exportación, debe cumplir con los requisitos especificados en la Tabla 1.

**Tabla 1. Especificaciones de los materiales**

| Material | Especificaciones | |
|---|---|---|
| Cartón* | La resistencia mínima a la compresión vertical (RCV) de la caja utilizada para el mercado nacional es de 620 kgf/m y la usada para el mercado de exportación es de 720 kgf/m o 790 kgf/m. | |
| Madera* | Utilizar madera de las siguientes especies:<br>Aliso dulce o Chaquiro (*Alnus jurulensis* H.B.K.)<br>Ciprés o pino común (*Cupressus lusitanica* Mill)<br>Chingalé o cedro blanco (*Jacaranda copaia* Aubl)<br>Nogal cafetero o Nogal canelo (*Cordia alliodora*)<br>Eucalipto salifa (*Eucalyptus saligna* Smith)<br>Fresno cedrillo (*Tapirira guianensis* Aublet)<br>Pino pátula (*Pinus patula* Schlecht et Cham)<br>Densidad básica entre 0,3 g/cm$^3$ y 0,48 g/cm$^3$<br>Madera seca al aire, con contenido de humedad inferior al 12 %. | |
| Plástico | Cubeta dosificada (empaque primario) | Polipropileno PP<br>Tereftalato de polietileno PET |
| | Canastilla* | Polietileno de alta densidad |

* Empaque primario y secundario.

NOTA Las especificaciones del cartón corrugado se definen según la NTC 452.

Las medidas de la base de los empaques deben ser submúltiplos de las estibas de 1 200 mm x 800 mm y 1 200 mm x 1 000 mm.

#### 3.2.2.1 Mercado nacional

El empaque para la comercialización en fresco o para la agroindustria de la uchuva, debe cumplir con los siguientes requisitos:

##### 3.2.2.1.1 Uchuva con capacho

##### 3.2.2.1.1.1 Empaque no dosificado

- Independiente del calibre y del estado de madurez, la altura debe ser igual o inferior a 250 mm.
- La capacidad máxima es de 8 kg.

**3.2.2.1.1.2 Empaque dosificado:** capacidad máxima 0,2 kg.

**3.2.2.1.2 Uchuva sin capacho**

**3.2.2.1.2.1 Empaque no dosificado**

- Independiente del calibre y del estado de madurez, la altura del empaque debe ser igual o inferior a 100 mm.
- La capacidad máxima es de 10 kg.

**3.2.2.1.2.2 Empaque dosificado**

- La capacidad máxima 0,5 kg.

**3.2.2.2 Mercado de exportación**

El producto se debe presentar en empaques dosificados, de plástico y perforados. Las especificaciones del embalaje pueden variar según lo acordado con el comprador del país de destino, siempre y cuando se tengan en cuenta los requisitos definidos en la Tabla 1 y en el numeral 3.2.2.1.

## 4. PALETIZACIÓN

Las estibas o paletas pueden ser plásticas, de madera, de cartón corrugado o prensado, dependiendo del medio de transporte utilizado (véase la Figura 6).

Las dimensiones de las estibas son:

- Estiba o paleta europea para el transporte aéreo, 1 200 mm x 800 mm.
- Estiba o paleta europea para el transporte marítimo, 1 200 mm x 1 000 mm.

Las estibas o paletas deben tener, preferiblemente, cuatro (4) entradas para las uñas del montacargas, patines de 70 mm de altura mínima y una separación máxima de 50 mm entre las diferentes secciones de madera de la plataforma.

La altura del apilamiento o arrume debe garantizar la adecuada circulación del aire (máxima de 2 050 mm para el transporte marítimo y de 2 500 mm para el transporte aéreo).

Para el mercado de exportación las cajas se apilan en columnas con protección de esquineros de cartón. Se pueden envolver en películas plásticas perforadas (de un material permitido en el país de destino), que preferiblemente estarán impresas con el nombre de la empresa y el símbolo de identificación del plástico utilizado. Éstas se sujetarán con zunchos de polipropileno que, preferiblemente, lleven escrito el nombre de la empresa y el símbolo de identificación del plástico utilizado.

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 5166

a)

b)

Figura 6. Estibas o paletas

Se recomienda el uso de minicontenedores para empacar la uchuva (véase la Figura 7). Estos pueden contener de 5 bandejas a 6 bandejas. Si se utiliza este sistema debe tenerse en cuenta que las medidas de 600 mm x 400 mm de base corresponden al exterior del minicontenedor.

Figura 7. Minicontenedor de empaques de uchuva

## 5. ROTULADO

Para la identificación o el marcado pueden emplearse papel o sellos con las especificaciones comerciales, siempre y cuando la impresión o los sellos estén fabricados con tintas o pegantes no tóxicos.

Cada empaque deberá llevar la siguiente información con caracteres visibles:

a) Identificación de productor, exportador o empacador o ambos (nombre y dirección).

b) Naturaleza del producto: "Uchuva o Physalis".

c) Origen del producto y región productora.

d) Características comerciales:

- Fecha de empaque.
- Categoría.
- Peso neto en el momento de empacar.
- Coloración en el momento de empacar.

e) Identificación del exportador o distribuidor (nombre y dirección).

f) Certificado de sanidad.



g) Impresión de la simbología que indique el manejo adecuado del producto (véase la Figura 8), de acuerdo con lo indicado en la NTC 2479.

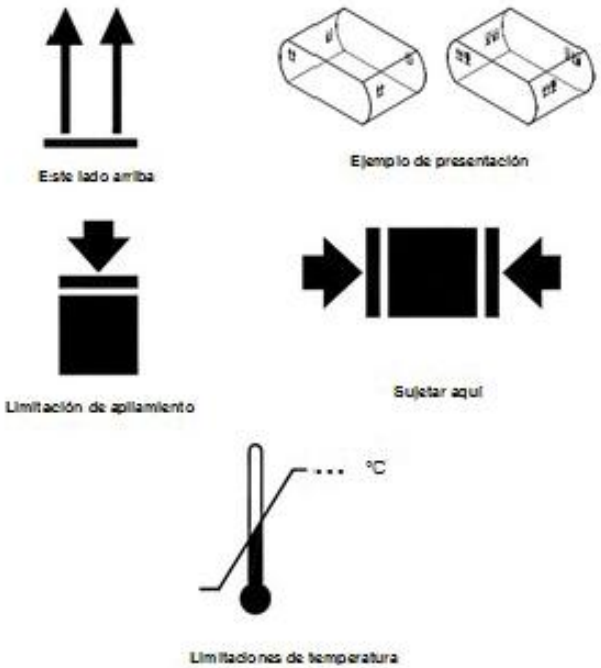



Figura 8. Ejemplos de la información impresa que deben llevar los empaques

## 6. APÉNDICE

### 6.1 REFERENCIAS NORMATIVAS

Los siguientes documentos normativos referenciados son indispensables para la aplicación de este documento normativo. Para referencias fechadas, se aplica únicamente la edición citada. Para referencias no fechadas, se aplica la última edición del documento normativo referenciado (incluida cualquier corrección).

NTC 206:1992, Maderas. Determinación del contenido de humedad para ensayos físicos y mecánicos.

NTC 452:1999, Cajas de cartón corrugado. Especificaciones.

NTC 512-1:2002, Industrias alimentarias. Rotulado o etiquetado. Parte 1: Norma general.

NTC 2479:1988, Embalajes. Indicaciones gráficas para el manejo de artículos.

NTC 3832:1995, Estibas planas de propósito general para el transporte de mercancías. Requisitos fitosanitarios para las estibas de madera.

NTC 4580:1999, Frutas Frescas. Uchuva. Especificaciones.

NTC-ISO 6780:1995, Estibas planas de propósitos generales para el transporte de mercancías. Principales dimensiones y tolerancias.

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 5166

## ANEXO A
(Informativo)

El anteproyecto de norma para el empaque de uchuva, presentado por el Centro Nacional de Investigaciones de Café -CENICAFÉ-, está respaldado por los resultados de la investigación que permitió la Caracterización y el Diseño de los sistemas de empaque utilizados en Colombia para la uchuva, en las zonas representativas de producción. La estructuración de este documento, se realizó de acuerdo con el procedimiento establecido por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación - ICONTEC-.

Este trabajo se llevó a cabo dentro de los términos de referencia del convenio suscrito entre el Servicio Nacional de Aprendizaje –SENA- (Grupo de Competitividad) y la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia para la ejecución del Proyecto denominado "Diseño y Normalización del Empaque y Embalaje para Pitahaya Amarilla y Uchuva".

El grupo ejecutor de este proyecto está compuesto por:

- María Cristina Chaparro C. Tec. Alimentos, Química.
- Claudia Rocío Gómez P. Tec. Química Industrial.
- Gloria Esperanza Aristizábal V. Bióloga M. Sc.
- Alda Esther Peñuela M. Ingeniera de Alimentos.
- Juan Mauricio Rojas A. Ingeniero de Alimentos.
- Arthemo López Ríos. Ingeniero Agrónomo.
- Juliana Marcela Naranjo M. Química.

Durante la realización del trabajo de investigación, se contó con la participación de:

- Productores y comercializadores de Silvania y Granada (Cundinamarca), Santa Rosa de Osos y El Peñol (Antioquia) y Arcabuco y Villa de Leyva (Boyacá).
- Instructores poscosecha de la regional del SENA del departamento de Cundinamarca.
- Empresas exportadoras: Frutiérrez S.A. y Caribbean Exotics.

Las fotografías utilizadas en el presente documento son propiedad del archivo fotográfico de CENICAFÉ y el SENA.

Edición, fotografía y diseño: Sección de Divulgación y Transferencia, CENICAFÉ.

CENICAFÉ, Chinchiná, Caldas. Noviembre de 2002.

# Norma Boliviana NB 746

## *Residuos Sólidos - Determinación de Cenizas*

### 1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma, establece el método de prueba para la determinación de las cenizas de los residuos sólidos municipales.

### 2. REFERENCIAS

NB 744 Residuos sólidos -Preparación de muestras para su análisis en laboratorio.

NB 742 Residuos sólidos -Terminología sobre residuos sólidos y peligrosos.

### 3. DEFINICIONES

Para los efectos de esta norma, las definiciones son las establecidas en la Norma NB 742.

### 4. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se obtiene en cantidad suficiente para efectuar la determinación por duplicación, según Norma NB 744 Residuos sólidos -Preparación de muestras para su análisis en laboratorio.

### 5. APARATOS Y EQUIPO

- Balanza de precisión con sensibilidad de 0,1 g
- Mufla
- Crisol de platino de 50 ml
- Desecador que contenga algún deshidratante adecuado con indicador de saturación

### 6. PROCEDIMIENTO

La muestra se lleva hasta peso constante a 60 °C (333 °K) y se deja enfriar en el desecador. Poner a peso constante el crisol a temperatura de 200 °C (473 °K) durante dos horas, se deja enfriar en el desecador y se pesa.

Transferir al crisol aproximadamente 10 g de la muestra seca (que se indica en el punto anterior) y se pesa con aproximación de 0,1 g

Calcinar en la mufla a 800 °C (1.073 °K) hasta obtener un peso constante (se recomienda comprobar el peso constante transcurrida una hora) se deja enfriar en el - desecador y se pesa.

### 7. CÁLCULOS

El porcentaje de cenizas en base seca se calcula con siguiente Formula:

$$\%C = \frac{C3 - C1}{C2 - C1} 100$$

Donde:



%C = es el porcentaje de cenizas en base seca

C1 = es el peso del crisol vacío, en g

C2 = es el peso del crisol mas la muestra seca, en g

C3 = es el peso del crisol mas la muestra calcinada, en g

### 8. REPRODUCCIÓN DE LA PRUEBA

La diferencia máxima permisible entre determinaciones efectuadas por duplicado no debe ser mayor de 1% en caso contrario se debe repetir la determinación.

### 9. BIBLIOGRAFÍA

-Physical, Chemical and Microbiological Methods of Solid Wastes Testing. U.S. Environmental Protection Agency (EPA 6700-73-01), 1973.

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 083-15 A IDIOMA ESPAÑOL DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN IDIOMA INGLÉS

**GUÍA OIML G 14**

Edición 2011 (E)

# Medición de densidad

Mesure de la masse volumique

ORGANISATION INTERNATIONALE
DE MÉTROLOGIE LÉGALE
ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL
DE METROLOGÍA LEGAL

OIML

**Medición de densidad**
*Guía para inspectores*

## 1 Introducción

Cuando la cantidad de un producto en un preenvase está expresada en términos de volumen pero se verifica mediante pesaje, también es necesario determinar la densidad del producto.

Pareciera que, en la práctica, no se comprenden bien los métodos para medir la densidad, de manera que pueden ocurrir errores sistemáticos significativos.

Este folleto ofrece una visión general (no exhaustiva) de los métodos comúnmente utilizados para medir la densidad y sus aplicaciones.

## 2 Unidades de medida

### 2.1 *Volumen*

La unidad del SI para volumen es el *metro cúbico*, símbolo: $m^3$. En laboratorios químicos y en transacciones al por menor la unidad que se utiliza usualmente es el *litro*, símbolo l o L.

La 12 Conferencia General de Pesos y Medidas en 1964 decidió abolir una definición anterior de litro y definir que 1 litro es exactamente 1 $dm^3$.

Por lo tanto:

$$1\,l = 1\,dm^3$$
$$1000\,l = 1\,m^3$$
$$1\,ml = 1\,cm^3$$

Las unidades *decilitro* (dl) y *centilitro* (cl), por tradición, se admiten como unidades legales en algunos países. Sin embargo, para evitar posibles confusiones con el *decímetro cúbico* y el *centímetro cúbico*, respectivamente, no se recomienda su uso en la industria y la ciencia.

El *mililitro* (símbolo: ml o mL) es, sin embargo, usado comúnmente en laboratorios y para declarar la cantidad de producto en preenvases. También es usado en los cálculos de este folleto.

### 2.2 *Densidad*

La densidad se define como la relación de la masa de un producto (por ejemplo, como si fuera pesado en el vacío) con su volumen. La unidad coherente del SI para la densidad es $kg/m^3$ y se debería utilizar

normalmente para informar los valores de densidad de productos. Dado que las mediciones de masa en este folleto se dan en gramos (g) y las mediciones de volumen en mililitros (ml), las formulas y cálculos excepcionalmente utilizan la unidad g/ml, la cual no debe confundirse con la unidad de concentración.

$$1\ g/ml = 1\ g/cm^3 = 1000\ kg/m^3$$

Con el fin de evitar errores, las unidades se han repetido en cada formula en donde se introducen valores de densidad.

## 3 Posibles fuentes de error

Con el término error nos referimos a la diferencia entre el valor de la densidad medida y el valor "real" de la densidad del producto. Este error no debe confundirse con la incertidumbre de la medición.

En general, los errores ocurren por las siguientes causas:

a) Diferencia en la temperatura si la medición de densidad se realiza a una temperatura diferente de 20 °C y no se aplica una corrección a 20°C.
b) Uso de medios de medición inapropiados.
c) Efecto de flotabilidad en la medición de masa.
d) Muestreo inapropiado.

### *3.1 Temperatura*

Las regulaciones nacionales, por lo general, establecen que el contenido real de los preenvases declarado en unidades de volumen debe mencionarse para una temperatura de 20 °C, excepto por productos congelados o ultracongelados, cuyo contenido debe mencionarse para la temperatura de venta, por ejemplo, generalmente -5 °C y -18 °C, respectivamente. Algunas economías requieren que los productos, principalmente productos lácteos, se almacenen y vendan a temperaturas inferiores a 20. En este caso el contenido declarado será el de a la temperatura al momento de la venta.

La medición puede hacerse a una temperatura diferente a 20 °C, pero esto requiere conocimiento del coeficiente de expansión de volumen del producto en cuestión. En este caso la conversión se puede hacer utilizando la siguiente formula:

$$\rho = \rho_t[1 + \gamma\ (t - 20) \qquad (1)$$

donde:
$\rho$ = densidad del producto a 20 °C,
$\rho_t$= densidad del producto a $t$°C, y
$\gamma$= *coeficiente de expansión de volumen del producto.*

De cualquier modo, la temperatura al momento de medir la densidad no debería ser muy diferente a 20 °C, dado que es posible que no se conozca el coeficiente de expansión de volumen con exactitud suficiente.

Por lo general no se aplica una corrección si la temperatura no se desvía de 20 °C en más de ± 0,5 °C. Una temperatura inferior lleva a un mayor estimado de la densidad del producto que, si se ignoran las correcciones, se dan en perjuicio del productor del preenvase.

### 3.2 *Elección de medios y métodos de medición.*

Es probable que los medios y métodos no sean apropiados en los siguientes casos:

a) Método no apto para el tipo de producto.

*Ejemplo:* El uso de un émbolo en productos con viscosidad muy alta.

b) Medios de medición técnicamente inadecuados (no lo suficientemente rígidos o que tienen otros defectos). *Ejemplo:* Un tapón o tapa de picnómetro mal ajustado que lleva a una mala reproducibilidad.

c) Uso de instrumentos de pesaje que no son lo suficientemente precisos en comparación con otros medios de medición.

*Ejemplo:* Uso de un picnómetro de 50 ml con un instrumento de pesaje que tiene un intervalo de escala de 1 g.

d) calibración no lo suficientemente precisa.

*Ejemplo:* Uso de un valor nominal (marcado) de un picnómetro de 100 ml cuando el valor real es 99,89 ml

### 3.3 *Efecto de flotabilidad en la medición de masa*

Cuando el volumen de un producto es determinado por la medición de la masa y la densidad, es necesario tener en cuenta el efecto de flotabilidad del aire. Este efecto sigue el principio de Arquímedes, el cual dice que un cuerpo sumergido en un fluido (gas o líquido) sufre un empuje hacia arriba igual al peso del fluido desplazado.

Según la ley del equilibrio de fuerzas, la indicación de un instrumento de pesaje depende de este empuje así arriba y la masa, por lo tanto, en la mayoría de los casos es ligeramente mayor que el valor indicado, la cual es una función de los volúmenes o densidades medias de tanto el producto y las pesas utilizadas para pesar, o para el preajuste del instrumento de pesaje.

No es necesario tener en cuenta esta diferencia en transacciones comerciales para las cuales el resultado indicado por el instrumento de pesaje es considerado exacto por convención (ver OIML D 28:2004 *Valor convencional del resultado de pesaje en aire*).

Sin embargo, es importante tener en cuenta la flotabilidad en aire al hacer mediciones de densidad con alta precisión.

En la práctica, los cálculos se hacen utilizando el siguiente valor como la densidad para pesas estándar: $\rho_b$ = 8 g/ml y como densidad media del aire: $\rho_l$ = 0,001 2 g/ml. Utilizando estos dos valores se puede deducir la siguiente formula:

$$masa = masa\ aparente\ x\ 0{,}99985\ \frac{densidad\ del\ producto}{densidad\ del\ producto - 0{,}0012}\ g/ml \qquad (2)$$

Los cálculos en estos métodos de medición descritos en los anexos toman en cuenta el efecto de la flotabilidad.

**Nota respecto al desarrollo de fórmulas de flotabilidad del aire**

Se asume que el instrumento de pesaje, por lo general una balanza electrónica, ha sido ajustada a su lugar de uso con pesas estándar (masa = $M_c$). Si el producto pesado (masa = $m$) tiene una densidad ($\rho$) diferente a la del peso estándar ($\rho_n$), tenemos que:

$$m \cdot g - \frac{m}{\rho} \cdot \rho_l \cdot g = m_n \cdot g^* - \frac{m_n}{\rho_n} \cdot \rho_l^* \cdot g^*$$

donde $g$ y $g^*$ son las aceleraciones debido a la gravedad que actúan sobre el producto y sobre las pesas estándar, respectivamente.

Para una balanza electrónica ajusta al sitio de uso ($g = g^*$), también se asume que la densidad del aire es la misma ($\rho_l = \rho_l^*$).
Con los valores $\rho_l = 0{,}0012$ g/ml y $\rho_n = 8$ g/ml se obtiene que:

$$m = \frac{m_n \cdot 0{,}99985}{V} + 0{,}0012 \text{ g/ml}$$

Esta última expresión es la que se utiliza actualmente para mediciones con picnómetro.

Para calcular el volumen de un producto con gran exactitud desde el resultado de los pesajes en aire y con una densidad conocida, finalmente se utiliza la siguiente formula:

$$V = \frac{M \cdot 0{,}99985}{\rho - 0{,}0012} \text{ ml}$$

donde la masa indicada por la balanza ($M$) se expresa en gramos y $\rho$ en g/ml.

## *3.4 Otras fuentes de error*

### 3.4.1 Inclusión de aire

Hay que distinguir entre dos casos:

a. La inclusión de aire en el producto mismo y por lo tanto en la muestra.

Para un cierto número de productos, se introduce aire por sí mismo durante las diferentes etapas de la producción sin posibilidad de escapar; por lo tanto ya se encuentra en estos productos durante el muestreo.

b. Introducción de aire a la muestra durante el procedimiento de muestreo.

En algunos casos, el aire introducido durante el muestreo puede escapar rápidamente del producto y, en otros casos, puede desaparecer muy lentamente. Por lo tanto, puede tomar horas o días para que el producto esté completamente libre de aire (por ejemplo: shampoos). También hay casos en el que el aire permanece continuamente en el producto después de su introducción, como por ejemplo en masillas.

Líquidos no transparentes, donde la presencia de aire no es perceptible hacen que las medidas sean aún más inciertas.

*Guía:*

- Solo se deben realizar mediciones de densidad una vez se haya eliminado el aire de la muestra. Por lo tanto, el vertido y la mezcla de líquidos debe realizarse de manera fluida y con gran cuidado.
- A algunos productos se les introduce aire durante el proceso de fabricación y se considera como una parte inseparable del producto.
- Si hay evidencia de aire introducido después del procedimiento de llenado y que este fenómeno solo es temporal (el aire no permanecerá en el producto final), puede ser posible tomar muestras del contenedor o de otra parte antes del llenado.

### 3.4.2 Sedimentación o separación de componentes

Puede que los productos que tienen varios componentes con densidades diferentes tengan una tendencia a asentarse de forma no homogénea. Los siguientes casos son ejemplos de causas de error en el muestreo:

a. La muestra se toma de una fase no homogénea.

Por lo tanto, la densidad de la muestra es diferente a la densidad media y es posible que la densidad disminuya durante el llenado continuo de los preenvases. Se debe tener esto en cuenta durante el muestreo y

- ya sea elegir una muestra en otra parte de la línea de producción, o
- tomar un mayor número de muestras.

b. Hay una separación de la muestra misma.

*Solución:* Revuelva lentamente o mezcle las partes del producto justo antes de la medición, sin introducir aire.

| | |
|---|---|
| a. Líquidos sin $CO_2$ u otro gas. | - émbolo<br>- picnómetro metálico<br>- hidrómetro<br>- densímetro electrónico |
| b. Productos con o sin $CO_2$ en contenedores transparentes pero no deformables. | - botella con líneas marcadas |
| c. Producto que incluye $CO_2$ en un contenedor no transparente | No es fácil de medir. Si es semitransparente, utilizar una botella con líneas marcadas en la medida de lo posible. Si no es posible dejar que el $CO_2$ escape, seguir el literal a. |

| Producto | Método |
|---|---|
| d. Líquidos viscosos | - picnómetro metálico<br>- densímetro electrónico del tipo laboratorio. |
| e. Masillas | - Método de émbolo para masillas<br>- picnómetro con líquido no disolvente. |
| f. Productos en aerosol. | - densímetro electrónico del tipo laboratorio.<br>- picnómetro especial de alta presión |
| g. Productos en varias fases en contenedores no deformables y no transparentes. | - contenedor utilizado como picnómetro y lleno de agua |
| h. Productos en varias fases en un contenedor deformable. | - transferencia del producto a un frasco de Erlenmeyer utilizado como picnómetro (ver g.) |

## 5 Procedimientos de medición de densidad

### *5.1 Picnómetro*

**Descripción**

Los picnómetros son medidores hechos de vidrio o metal y que tienen un volumen fijo.

El picnómetro se cierra por medio de un tapón o tapa en el que hay un pequeño agujero que permite eliminar el aire y el excedente de producto, de manera que la cantidad contenida en el picnómetro sea constante después de terminar la operación de llenado.

La capacidad de los picnómetros varía, pero generalmente es de 50 o 100 ml. Se prefiere este último valor, o más, para lograr una mayor precisión.

No se recomienda el uso de picnómetros con una capacidad menor a 25 ml.

*Importante:* Respecto a la mayor precisión, puede que el volumen real contenido en el picnómetro sea diferente de la capacidad nominal (marcada).

**Campos de aplicación**

| | |
|---|---|
| Picnómetros de vidrio: | - líquidos claros sin $CO_2$ u otros solutos bajo presión |
| - llenado con líquidos no disolventes: | - productos pastosos: masillas, pegamentos, productos contenidos en tubos deformables. |
| Picnómetros metálicos | - productos viscosos y ligeramente pastosos (productos de limpieza, lacas, etc.) |

*Figura 2: Picnómetros*

**Equipos necesarios**

- Picnómetro calibrado según se describe arriba (se debe conocer el método de calibración).
- Instrumentos de pesaje con intervalos de escala de 10 mg (0,01 g) o menos para un picnómetro de 100 ml y de 1 mg (0,001 g) o menos para un picnómetro de 25 ml.
- Balanzas para la clase de exactitud $M_1$.
- Termómetro graduado a intervalos de 0,1 o 0,2 °C.
- Baño termostático

**Preparación y mediciones**

**A. Método sin el uso de un líquido auxiliar no disolvente**

- Limpiar el picnómetro con agua y alcohol.
- Aplicar una fina película de vaselina al borde superior del picnómetro para asegurar la hermeticidad de la tapa.
- Colocar el picnómetro y su tapa en el instrumento de pesaje y registrar el resultado del pesaje. ($M_0$).
- Llenar el picnómetro con mucho cuidado. Evitar la introducción de burbujas de aire. También se debe evitar, en la medida de lo posible, colocar el producto en las paredes cercanas a la ubicación de la tapa. El nivel de llenado debe ser tal que, después del ajuste definitivo del tapón o tapa (ver abajo) una pequeña cantidad del producto pueda escapar por la abertura.
- Colocar el tapón o la tapa holgadamente en el picnómetro y poner el conjunto en un baño termostático operando a 20 °C ± 0,2 °C.
- Retirar y secar el picnómetro después de 20 a 30 minutos, con bastante rapidez, para así evitar cambios en la temperatura.
- Posteriormente, el tapón o tapa del picnómetro se coloca o ajusta firmemente y se limpia el exceso de producto con un pañuelo de papel apropiado colocado alrededor del tapón o alrededor del hueco de la tapa.
- Posteriormente, el picnómetro es pesado ($M_v$), vaciado, limpiado, secado y pesado de nuevo junto con las pesas estándar que corresponden aproximadamente al valor de $M_v - M_0$, por ejemplo a la masa contenida en el picnómetro.
- Registrar la indicación $J_0$ del instrumento de pesaje. Esta última medición permite determinar la corrección a aplicarse para compensar los errores sistemáticos en el instrumento de pesaje.

*Nota:* Precauciones adicionales pueden ser necesarias para evitar la introducción de burbujas de aire durante la manipulación de productos viscosos no transparentes utilizando picnómetros de metal.

**B. Método utilizando llenado con un líquido auxiliar no disolvente.**

Si el picnómetro se llena con un producto de un tubo o bote, se puede evitar la introducción de aire llenando el picnómetro, en primer lugar, con un líquido no disolvente de densidad conocida que no se mezcle con el producto (el agua suele ser apropiada).

En este caso, se pesa el picnómetro vacío (ver A.) y luego se llena con una pequeña cantidad (por ejemplo 1/3) del líquido no disolvente, seguido de un nuevo pesaje.

Luego se introduce el producto a ser medido para alcanzar el nivel de la tapa del picnómetro y el conjunto se pesa una tercera vez.

Luego se completa el llenado del picnómetro utilizando el líquido no disolvente, seguido de un cuarto pesaje. Ver A. para el resto de la operación.

**Cálculos**

**Método A**

$$\rho = 0{,}99985 \cdot \frac{M_P}{V} + 0{,}0012 \text{ g/ml} \qquad (3)$$

donde:
$\rho$ = densidad del producto a 20 °C
$M_P$ = masa aparente del producto: $M_P = M_v - M_0 + C$
donde
$C = M_0$ + pesas estándar adicionales − $I_0$
$V$ = volumen del picnómetro a la temperatura de medición

**Método B**

$$\rho = 0{,}9985 \cdot \frac{m_2 - m_1}{V - 0.9985 \frac{(m_1 - m_0) - (m_2 - m_1)}{\rho V - 0{,}0012}} + 0{,}0012 \text{ g/ml} \qquad (4)$$

donde:
$m_0$ = resultado del pesaje (masa aparente) del picnómetro vacío
$m_1$ = picnómetro + llenado parcial con líquido auxiliar
$m_2$ = picnómetro + llenado parcial con líquido auxiliar + producto
$m_3$ = picnómetro + llenado completo con líquido auxiliar + producto
$\rho_v$ = densidad del líquido auxiliar a la temperatura de medición.

*Ejemplo de cálculo utilizando el método A:*

| | |
|---|---|
| Picnómetro vacío: | $M_0 = 733{,}95$ g |
| Picnómetro lleno completamente | $M_V = 859{,}94$ g |
| Picnómetro vacío + 130 g de pesas estándar | $I_0 = 863{,}97$ g |
| Corrección instrumento de pesaje: ($M_0$ + 130 g -$I_0$) | C= -0,02 g |
| Capacidad real del picnómetro: | $V = 99{,}75$ ml |

$$V = 0{,}99985 \cdot \frac{(859{,}94 - 733{,}95 - 0{,}02)}{99{,}75} + 0{,}0012 = 1{,}264 \text{ g/ml} \quad (5)$$

*Calibración de un picnómetro:*

El volumen real de un picnómetro es:

$$V = 0{,}99985 \cdot \frac{M_b}{\rho_w - 0{,}0012} \text{ ml} \qquad (6)$$

donde:

$V$ = volumen del picnómetro a la temperatura de medición
$M_b$ = resultado del pesaje (masa aparente del agua contenida en el picnómetro
$\rho_w$ = densidad del agua (por ejemplo, a 20 °C: 0,998 201 g/ml)

Se asume que la densidad el aire durante el pesaje es igual a 0,001 2 g/ml.

## 5.2 *Émbolo (esfera gama)*

*Figura 3: Émbolo esférico*

**Descripción**

El émbolo es una esfera, generalmente hecha de bronce cromado y fijada a una vara cuya longitud se puede ajustar mediante rotación.

Está disponible en dos tamaños: 100 y 10 ml.

El modelo de 100 ml tiene una vara con divisiones de línea para indicar la profundidad de inmersión.

No se recomienda el uso del modelo de 10 ml ya que tiene un error relativo alto debido a la tensión superficial de los líquidos a ser probados.

Sin embargo, el valor aproximado de la tensión superficial de estos líquidos debe conocerse cuando se use el émbolo de 100 ml.

**Campos de aplicación**

Líquidos transparentes y ligeramente viscosos con o sin $CO_2$ u otros solutos. Debido a la facilidad de limpieza del émbolo esférico, se recomienda particularmente su uso para lacas, pinturas y productos similares con viscosidad media.

**Equipos necesarios**

- Émbolo calibrado (y certificado).
- Instrumento de pesaje con intervalos de escala ≥ 10 mg (0,01 g) y con una capacidad de pesaje de 800 g o más para pruebas con un émbolo de 100 ml.
- Conjunto de pesas clase M1.

Un muestreo correcto es una operación difícil que exige gran cuidado. No será pues necesario insistir en la necesidad de obtener una muestra de frutas y verduras suficientemente representativa. Un muestreo exacto y efectuado sin cuidado puede conducir a errores y a desajustes de precios no justificados.

Los procedimientos operatorios indicados en esta norma se han reconocido en la práctica como aptos y se recomienda utilizarlos todas las veces que puedan realizarse. Se admite, sin embargo, que es difícil establecer reglas fijas válidas para todos los casos y qué circunstancias particulares pueden hacer deseable la modificación del método en determinados puntos.

El método establecido se destina, principalmente, a, regular los casos de litigio entre las partes interesadas.

## 2 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

La presente norma establece un método de muestreo en frutas y verduras frescas, que son objeto de comercio nacional e internacional, con la finalidad de determinar la calidad o ciertas características particulares de la mercancía.

## 3 DEFINICIONES

### 3.1 Partida

Cantidad de mercancía expedida o recibida de una sola vez en el marco de un contrato particular o de un documento de transporte. Puede estar compuesto de uno o de varios lotes.

### 3.2 Lote

Cantidad determinada que se supone de las mismas características (idéntica variedad, igual grado de madurez, mismo tipo de envase, etc.) en el seno de la partida y que permite establecer la calidad de la misma.

### 3.3 Toma de muestra elemental

Pequeña cantidad de mercancía tomada en un punto del lote.

Deberá efectuarse en diferentes puntos del lote, una serie de tomas de muestras elementales de importancia equivalente.

### 3.4 Muestra global

Cantidad de mercancía obtenida de la reunión y, si el producto lo permite, de la mezcla de todas las tomas de muestras elementales efectuadas en un lote determinado.

VISTA PREVIA

©IBNORCA - DERECHOS RESERVADOS

Fecha: 2022-08-30

Para uso exclusivo de: Lidiuvinia Steinha



DOCUMENTO PROTEGIDO POR DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL, NO PODRÁ REPRODUCIRSE BAJO NINGUNA FORMA Y POR NINGÚN MEDIO, SIN LA AUTORIZACIÓN ESCRITA DE IBNORCA

### 3.5 Muestra reducida

Cantidad procedente, si es necesario, de la reducción de la muestra global, y representativa del lote.

### 3.6 Muestra para laboratorio

Cantidad de la mercancía extraída de la muestra global o de la reducida, destinada al análisis o a otro procedimiento.

## 4 GENERALIDADES

4.1 El muestreo puede efectuarse con vistas a un control in situ del producto o para comprobar en el laboratorio ciertas características especiales. En estos dos casos, la toma de muestras ha de efectuarse al azar. Sin embargo, en ciertos casos particulares, como por ejemplo, para comprobar la presencia de una variedad diferente o de una enfermedad cualquiera, se debe efectuar un muestreo selectivo. El muestreo, entonces, no puede realizarse al azar. Por consiguiente, antes de comenzar el muestreo habrá que establecer el objetivo, es decir, precisar las características a controlar.

4.2 El muestreo deberá efectuarse de manera que las tomas de muestras elementales sean representativas de todas las características del lote. Después de haber separado las partes deterioradas del lote (cajas, sacos, etc.) la toma de muestra se efectuará separadamente de cada una de las partes sanas y deterioradas.

4.3 El informe del análisis se redactará según la finalidad del muestreo (ver capítulo 6).

## 5 MÉTODO DE MUESTREO

### 5.1 Preparación del lote para el muestreo

El lote deberá estar preparado para el muestreo de manera que la toma de muestra se pueda efectuar sin obstáculos ni retrasos. La toma de muestra deberá realizarse por las partes interesadas o por una autoridad representativa.

Deberá efectuarse un muestreo independientemente sobre cada lote, pero si el lote presenta daños debidos al transporte, las partes dañadas (cajas, sacos, etc.) deberán aislarse y realizar, separadamente, el muestreo de las partes sanas. Si el destinatario considera la partida no homogénea, aunque el expedidor no lo haya indicado, aquélla podrá dividirse en lotes homogéneos y se efectuará un muestreo en cada lote, previo acuerdo entre el comprador y el vendedor, a no ser que estos decidan otra cosa.

### 5.2 Toma de muestras elementales

Las tomas de muestras elementales deberán efectuarse al azar en diversas zonas y a distintos niveles del lote.

#### 5.2.1 Productos envasados

En el caso de productos envasados (envases de madera, envases de cartón, sacos, etc.) las muestras deberán efectuarse al azar, según la Tabla 1.

VISTA PREVIA

© IBNORCA - DERECHOS RESERVADOS

Fecha: 2022-08-30

Para uso exclusivo de: Liduvinia Steinha



DOCUMENTO PROTEGIDO POR DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL, NO PODRÁ REPRODUCIRSE BAJO NINGUNA FORMA Y POR NINGÚN MEDIO, SIN LA AUTORIZACIÓN ESCRITA DE IBNORCA

Tabla 1 - Número de paquetes a tomar

| Número de paquetes semejantes en el lote | Número de paquetes a tomar. Cada uno constituye una toma de muestra elemental |
|---|---|
| Hasta 100 | 5 |
| De 101 a 300 | 7 |
| De 301 a 500 | 9 |
| De 501 a 1000 | 10 |
| De 1000 en adelante | 15 (mínimo) |

5.2.2 Productos a granel

Deberán efectuarse, al menos, cinco tomas de muestras elementales por lote que correspondan a una masa total o a un número de paquetes según la Tabla 2.

Tabla 2 - Importancia de las tomas de muestras elementales

| Masa del lote (en kilogramos) o número total de paquetes del lote | Masa total de las tomas de muestras elementales (en kilogramos) o número total de paquetes a tomar |
|---|---|
| Hasta 200 | 10 |
| De 201 a 500 | 20 |
| De 501 a 1000 | 30 |
| De 1001 a 5000 | 60 |
| De 5000 en adelante | 100 (mínimo) |

En el caso de frutas y verduras voluminosas (más de 2 kg por pieza), Las tomas de muestras elementales deberán estar constituidas por cinco piezas como mínimo.

5.3 Preparación de la muestra global o reducida

La muestra global está constituida, en caso necesario, por la reunión y si es posible, la mezcla, de las tomas de muestras elementales. La muestra reducida, si es necesaria, se obtiene por la reducción de la muestra global.

Tanto si el control in situ se efectúa sobre la muestra global o la reducida el muestreo se deberá hacer lo más rápidamente posible, con el fin de evitar toda modificación de las características a comprobar.

5.4 Importancia de las muestras para laboratorio

La importancia de las muestras para laboratorio depende de los ensayos que deban efectuarse y que deban venir incluidos en el contrato. Las cantidades dadas en la Tabla 3 representan un mínimo.

VISTA PREVIA

© IBNORCA- DERECHOS RESERVADOS

Fecha: 2022-08-30

Para uso exclusivo de: Liduvinia Steinha



DOCUMENTO PROTEGIDO POR DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL, NO PODRÁ REPRODUCIRSE BAJO NINGUNA FORMA Y POR NINGÚN MEDIO, SIN LA AUTORIZACIÓN ESCRITA DE IBNORCA

**Tabla 3 - Importancia de las muestras para laboratorio**

| Productos | Importancia de una muestra para laboratorio |
|---|---|
| Pequeñas frutas; higueros, nueces, avellanas, almendras, castañas y otras distintas de las enumeradas. | 1 kg |
| Cerezas, guindas, ciruelas. | 2 kg |
| Albaricoques, plátanos, membrillos, agrios, melocotones, peras, uvas, aguacates, ajos, manzanas, berenjenas, remolachas, pepinos, coliflores, verduras de raíz, cebollas, pimientos, rábanos, tomates. | 3 kg |
| Calabazas, melones, sandías, piñas. | 5 piezas |
| Coles, coliflor, lombarda, lechugas. | 10 piezas |
| Maíz dulce | 10 mazorcas |
| Verduras en manojos | 10 manojos |

## 6 ENVASADO Y MANIPULACIÓN DE LA MUESTRA PARA LABORATORIO

### 6.1 Envasado

Las muestras para laboratorio que no se revisen *in situ*, deberán envasarse con el fin de asegurar su buena conservación.

Los recipientes que contienen las muestras para laboratorio deberán sellarse.

### 6.2 Marcado

Las muestras expedidas se deberán marcar (etiquetar) con el fin de que no puedan cambiarse. La marca deberá ser legible, estable, y contener las indicaciones siguientes:

a) Denominación del producto, especie, eventualmente variedad, indicación de la categoría cualitativa del producto.
b) Nombre del expedidor de la partida.
c) Lugar de muestreo.
d) Fecha del muestreo y para los productos perecederos, la hora.
e) Marca de identificación del lote y de la muestra (boletín de expedición, número del
f) medio de transporte, lugar de almacenamiento).
g) Número del acta del muestreo.
h) Nombre y firma del que toma la muestra.
i) Eventualmente, enumeración de los ensayos a efectuar en el laboratorio.

### 6.3 Expedición y conservación

Después de su constitución, la muestra para laboratorio deberá enviarse y transportarse, lo más rápidamente posible, a su destino.

La conservación de la muestra para laboratorio y su transporte deberá efectuarse en condiciones tales que se evite cualquier modificación del producto; por consiguiente, es de desear que se efectúe el control de la muestra lo más rápidamente posible.



VISTA PREVIA

©IBNORCA- DERECHOS RESERVADOS

Fecha: 2022-08-30

Para uso exclusivo de: Liduvinia Steinha

DOCUMENTO PROTEGIDO POR DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL, NO PODRÁ REPRODUCIRSE BAJO NINGUNA FORMA Y POR NINGÚN MEDIO, SIN LA AUTORIZACIÓN ESCRITA DE IBNORCA

## 7 ACTA DEL MUESTREO

El acta del muestreo, numerada y acompañada de una muestra para el laboratorio, deberá contener, según el caso considerado, las indicaciones siguientes:

a) Denominación del producto, especie y, si es necesario, variedad y calificación cualitativa.
b) Destinatario del lote.
c) Lugar y fecha de expedición y de recepción.
d) Nombre y dirección del expedidor.
e) Lugar, tiempo y condiciones de almacenamiento del lote, e indicación del medio de transporte (descripción, número de vehículo).
f) Día y hora de la solicitud del control.
g) Día y hora del muestreo.
h) Condiciones atmosféricas durante las tomas de muestras (temperatura, etc.).
i) Tamaño del lote y número de envases.
j) Marca, a fin de poder identificar el lote con la muestra (forma de envase, texto de la etiqueta, etc.).
k) Finalidad del muestreo e indicación del plazo límite entre el muestreo y el control de calidad, en condiciones normales.
l) Descripción del estado del medio de transporte o del almacén (estado de limpieza, olor extraño y, para el medio de transporte, estado de funcionamiento, estanquidad, etc.).
m) Homogeneidad aparente del lote, proporción de partes húmedas que presentan otros daños.
n) Estado de limpieza del lote.
o) Tipo, calidad del envase y presentación del producto en el envase.
p) Temperatura interior de la mercancía (o temperatura del medio de transporte o del almacén).
q) Cantidad de hielo (eventualmente de nieve carbónica) restante en el medio de transporte frigorífico, estado de funcionamiento de los ventiladores.
r) Estado y calidad del envase de invierno.
s) Tara de los envases del lote.
t) Nombres y apellidos de las partes interesadas presentes en la de las muestras.
u) Número de muestras tomadas para laboratorio.
v) Nombre y apellidos del sujeto o sujetos que efectúan el muestreo.

El acta mencionará la técnica aplicada, si esta es diferente de la que se describe en la presente norma.

VISTA PREVIA

© IBIORCA, DERECHOS RESERVADOS

Fecha: 2022-08-30

Para uso exclusivo de: Ludwinnia Steinha



DOCUMENTO PROTEGIDO POR DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL, NO PODRÁ REPRODUCIRSE BAJO NINGUNA FORMA Y POR NINGÚN MEDIO, SIN LA AUTORIZACIÓN ESCRITA DE IBIORCA

**ANEXO B.**

**Clasificación botánica**

Herbario Nacional de Bolivia (LPB)

**HERBARIO NACIONAL DE BOLIVIA**
Casilla 10077 Correo Central, La Paz – Bolivia / Campus Universitario, Calle 27 Cota Cota
Teléfonos (591 -2) 2121751 – 2792582 – 2792416 * Fax (591-2) 2770962
e-mail: direccion.herbariobolivia@gmail.com

PLANTAS COLECTADAS POR: LIDUVINIA S. STRAUSS ALVAREZ

Determinado por: Rossy de Michel (LPB)

Fecha : 20 de enero de 2020

1 Solanaceae Physalis peruviana L.

Herbario Nacional de Bolivia (LPB) La Paz - Bolivia

**ANEXO C.**

**Screening fitoquímico**

De acuerdo al método estandarizado del Instituto de investigaciones químicas (IIQ) se realizaron las siguientes pruebas:

**Detección de alcaloides**.- 50 mg de extracto seco son agitados con algunos ml de ácido clorhídrico diluido y filtrados. El filtrado es cuidadosamente analizado con los siguientes tests:

a) Test de Mayer

A unos pocos ml de filtrado, se añade una o dos gotas de reactivo de Mayer por la pared del tubo de ensayo. Un precipitado blando o crema indica que el test es positivo.

Reactivo de Mayer

Cloruro mercúrico (1.358 g) es disuelto en 60 ml de agua y yoduro de potasio (5.0g) es disuelto en 10 ml de agua. Las dos soluciones se mezclan y se aforan a 100 ml de agua.

b) Test de Dragendorff

A unos pocos ml de filtrado se añaden 1 a 2 ml del reactivo de Dragendorff. Un prominente precipitado amarillo indica que el test es positivo.

Reactivo de Dragendorff

Solución stock: Carbonato de bismuto (5.2 g) y yoduro de sodio (4 g) son hervidos por algunos minutos con ácido acético glacial. Luego de 12 h, el acetato de sodio precipitado es filtrado usando un embudo de vidrio fritado.

Solución de trabajo: 10 ml de la solución stock son mezclados con 20 ml de ácido acético y aforados a 100ml con agua.

**Detección de carbohidratos y glícosidos**.- 50 mg de extracto seco son agitados con algunos ml de etanol y filtrados. El filtrado es cuidadosamente analizado con el siguiente test:

Test de Fehling

1 ml de filtrado es hervido en un baño de agua con 1 ml de cada solución de Fehling (A y B). Un precipitado rojo indica la presencia de azucares.

Solución Fehling A: Sulfato de cobre (34.66 g) es disuelto en agua destilada y aforada a 500 ml.

Solución Fehling B: Tartrato de sodio potasio (173g) e hidróxido de sodio (50g) son disueltos en agua y aforados a 500 ml.

**Detección de saponinas**.-

Test de espuma

El extracto (2.5 mg) se diluye con agua destilada y se afora a 5 ml. La suspensión se agita en una probeta de 10 ml y se deja reposar 15 min. Una columna de 2 cm de espuma indica la presencia de saponinas.

**Detección de proteínas y aminoácidos**.- El extracto (100mg) se disuelve en 10 ml de agua destilada y se filtra con un papel Whatmann No. 1 y el filtrado se somete al siguiente test:

Test de Ninhidrina

2 gotas de solución de ninhidrina (10 mg de ninhidrina en 200 ml de acetona) son añadidos a 2 ml de filtrado acuoso. Un color purpura característico indica la presencia de aminoácidos.

**Detección de fitoesteroles**.-

a) Test de Liebermann-Burchard

El extracto (50mg) es disuelto en 2 ml de anhídrido acético. A esta solución, se le añaden lentamente por las paredes del tubo 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Un conjunto de cambios de color muestra la presencia de fitoesteroles.

Reactivo de Liebermann-Burchard

Se mezclan 1ml de anhídrido acético con 1 ml de cloroformo y se enfría a 0ºC, entonces se añade 1 gota de ácido sulfúrico concentrado.

b) Test de Kedde

A una solución de 10mg de extracto en 1 ml de metanol, añadir una gota de las soluciones I y II a 0.2, 0.4ml de la solución de la muestra y una coloración de azulada a purpura aparece luego de 5 min. La solución no debe contener acetona, la cual da un color azulado profundo.

Reactivo de Kedde

Solución I: Solución al 2 % de ácido 3,5-dinitrobenzoico en MeOH. Solución II: Solución al 5.7 % de hidróxido de potasio.

c) Test de Bajlet

Combinar las soluciones I y II (1:1) antes de usar y añadir de 2 a 3 gotas a 2-3 mg de muestra; la reacción es positiva si se observa un color rojo intenso.

Reactivo Bajlet

Solución I: Disolver 1 g de ácido pírico en 100 de EtOH. Solución II: 10g de hidróxido de sodio en 100 de agua.

**Detección de compuestos fenólicos y taninos**.-

a) Test de Cloruro férrico

El extracto (5 mg) es disuelto en 1ml de etanol. A esta mezcla, se le añaden algunas gotas cloruro férrico 5% (neutro). Un color verde oscuro, azul, azul oscuro indica la presencia de polifenoles. Esta o es una prueba específica para taninos, otros compuestos fenólicos dan resultados positivos.

b) Test de gelatina

El extracto (50 mg) es disuelto en 5 ml de agua destilada y se le añaden 2 ml de una solución al 1% de gelatina conteniendo un 10% de cloruro de sodio. Un precipitado blanco sugiere la presencia de polifenoles. Si se realiza este test de la siguiente manera se puede confirmar la presencia de taninos: Al primer tubo se le añaden una solución al 1% de cloruro de sodio, al segundo 1% cloruro de sodio y solución al 5 % de gelatina y al tercer una solución de cloruro férrico. La formación de precipitado en el primero sugiere a presencia de taninos y la reacción positiva en el tercero soporta esta interferencia.

c) Test de acetato de plomo

El extracto (50mg) es disuelto en agua destilada y a esta solución, se añaden 3 ml de una solución de acetato de plomo al10%. Un precipitado blanco y voluminoso indica la presencia de compuestos fenólicos.

d) Test de shinoda

El extracto (10mg) es disuelto en 4 ml de alcohol y algunos fragmentos de magnesio metálico son añadidos seguidos de ácido clorhídrico concentrado (por goteo). En un segundo tubo preparar la solución de extracto y añadir solo el ácido clorhídrico como blanco. *Flavonas, flavonoles, sus correspondientes 2,3-dihidro derivado y xantonas producen una coloración anaranjada, rosa, roja a púrpura con este test.* Si se reemplaza Zinc en lugar de magnesio, solo los *flavonoles* dan un color rojo intenso o magenta; flavanonas y flavonoles dan una coloración rosa-débil a magenta, o directamente ningún color.

**a)** **b)**

**c)**

Nota. a) El primer tubo representa el blanco y el segundo tubo antes de gotear el HCl para la reacción, b) Prueba de Shinoda en reacción, c) Fotografía final del screening completo.

**Figura 75.** Imágenes de Screening fotoquímico
**Fuente.** Elaboración propia

**ANEXO D.**

## Especificaciones de pruebas preliminares

### Especificaciones para pruebas de tamaño de partícula

**Tabla 25.** Condiciones para las pruebas del tamaño de partícula

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Factores** | Constantes | Masa | 1g |
| | | Tiempo de extracción | 3 horas |
| | | Relación soluto/solvente | 1:20 |
| | Variables | Tamaño de partícula | 500 µm |
| | | | 425 µm |
| | | | 355 µm |
| | | | 300 µm |
| | | | 250 µm |

### Especificaciones para pruebas de agitación

**Tabla 26**. Condiciones para las pruebas de efecto de agitación

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Factores** | Constantes | Masa | 1 g |
| | | Tiempo de extracción | 3 horas |
| | | Relación soluto/solvente | 1:20 |
| | | Tamaño de partícula | 250 µm |
| | Variables | Agitación | 20 RPM |
| | | | 50 RPM |
| | | | 100 RPM |
| | | | 150 RPM |
| | | | 200 RPM |

### Especificaciones para pruebas de la relación soluto/solvente

**Tabla 27.** Condiciones para las pruebas de efecto de la relación soluto/solvente

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Factores** | Constantes | Masa | 1g |
| | | Tiempo de extracción | 3 horas |
| | | Tamaño de partícula | 250 µm |
| | Variables | Relación soluto/solvente | 1:05 |
| | | | 1:10 |
| | | | 1:20 |
| | | | 1:30 |
| | | | 1:40 |

**Especificaciones para pruebas del efecto del tiempo de extracción**

**Tabla 28.** Condiciones para las pruebas de efecto de tiempo de extracción

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Factores** | Constantes | Masa | 1 g |
| | | Relación soluto/solvente | 1:20 |
| | | Tamaño de partícula | 250 µm |
| | Variables | Tiempo de extracción | 1 hora |
| | | | 3 horas |
| | | | 24 horas |
| | | | 48 horas |
| | | | 72 horas |

**Especificaciones para pruebas de Selección de solvente**

a) **Análisis de principios de solvente.-** De acuerdo a los principios de mejor selección de solvente se tiene:

- **Selectividad.-** Los flavonoides al poseer un gran número de grupos hidroxilos instituidos o azúcares son considerados compuestos polares tomando en cuenta la naturaleza de solvente los solventes polares a considerar son Metanol, Etanol y Agua. Descartando así los demás solventes orgánicos.
- **Reactividad.-** Los solventes escogidos (Metanol, Etanol y Agua) no tienen ninguna reacción con el compuesto objetivo
- **Recuperabilidad.-** El Metanol y el Etanol pueden ser recuperados por destilación, sin embargo el Metanol es más volátil lo que llega a tener una recuperación media de acuerdo a su rápida manipulación y conservación. En cuanto al etanol es menos volátil llegando a tener una estimación alta de recuperación.
- **Disponibilidad y Costo.-** Considerando el costo de 1 litro de Metanol tiene un valor de 174Bs, 1 litro de etanol 4,50 Bs y 1 litro de agua 10 Bs. Por comparación de costos se observa que el adecuado hablando de económica es el Etanol. En Bolivia tenemos mayor disponibilidad y acceso a los solventes de Etanol y Agua. Sin embargo el metanol es importado por lo que su disponibilidad es variada por tanto Etanol y Agua son Recomendables por su disponibilidad y acceso.
- **Impacto Ambiental.-** El metanol al ser liberado a la atmosfera actúa como contaminante perjudicial para la salud humana por su proceso de degradación produciendo contaminantes secundarios, en cambio el etanol y el agua son solventes más amigables con el medio ambiente.

- **Objetivo o Finalidad.-** El proyecto tiene como un objetivo el uso de los flavonoides extraídos de cáliz de chilto para la producción de productos farmacéuticos para la lucha contra el cáncer, tomando este criterio es recomendable el uso de etanol y agua como solventes enfocados a esta área.

**Conclusión**

Tomando en cuenta el análisis de principios para la selección del mejor solvente obtenemos como resultado que los solventes que se usaran en el proyecto son Etanol y Agua.

b) **Análisis de elección de solvente.-**

De acuerdo a la metodología establecida por el Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), se debe ejecutar cuatro extracciones a diferentes disoluciones como se encuentran establecidas en la siguiente tabla.

**Tabla 29.** Detalle de disoluciones.

| Solvente | Etanol (%) | Agua (%) |
|---|---|---|
| Disolución 1 | 100 | - |
| Disolución 2 | 80 | 20 |
| Disolución 3 | 60 | 40 |
| Disolución 4 | 50 | 50 |

**Fuente.** Elaboración propia.

Los parámetros para la extracción están establecidos en la tabla 30.

**Tabla 30.** Parámetros para la extracción

| Parámetros constantes | Valores constantes |
|---|---|
| Temperatura | 20ºC |
| Relación soluto/solvente | 1:20 |
| Agitación | 100 RPM |
| Tiempo de maceración | 48 h |
| Tamaño de partícula | 0,250 mm |

**Fuente.** Elaboración propia.

Los resultados del rendimiento para cada disolución están establecidos en la tabla siguiente.

**Tabla 31.** Rendimiento de cáliz de chilto a distintas soluciones.

| **%V/V** | **Rendimiento (%)** | **Observaciones** |
|---|---|---|
| 100% Etanol | 9,2 | En el revelado de placa con cloruro férrico se puede observar la poca presencia de flavonoides. |
| (80:20) Etanol-Agua | 17,9 | Se puede observar que tiene una intensidad color azul en la placa característico de flavonoides. |
| (60:40) Etanol-Agua | 17,2 | Se observa presencia de espuma confirmando la presencia de saponinas. |
| (50:50) Etanol-Agua | 14,3 | Se observa presencia de espuma confirmando la presencia de saponinas. |

**Fuente.** Elaboración propia

**ANEXO E.**

## Control por Placas TLC

### Cromatografía en capa fina TLC

Utilizando la cromatografía en capa fina se realizaron los controles del proceso de separación y mediante la observación de sus similitudes realizando la agrupación de sus fracciones.

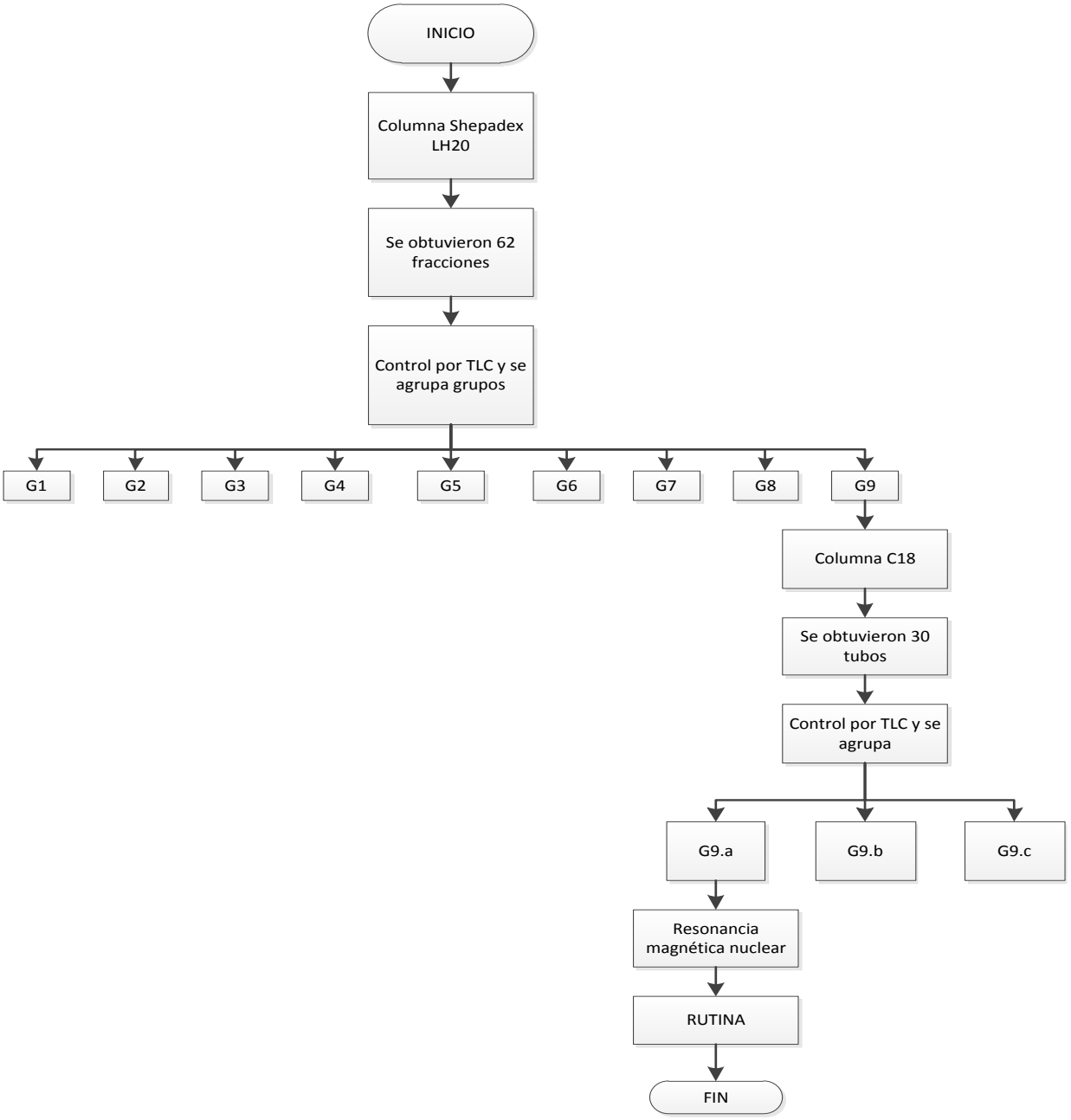
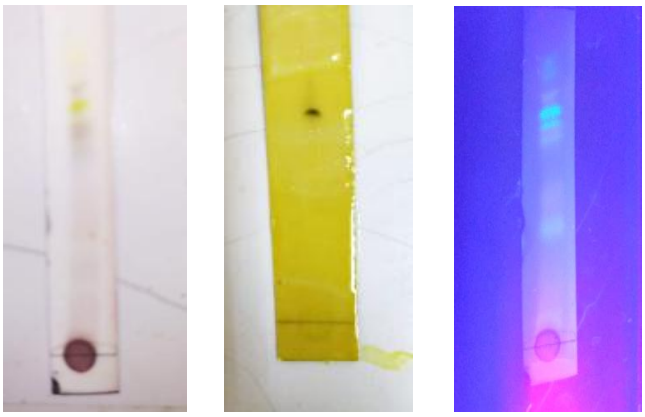



**Figura 76.** Proceso del método cromatográfico
**Fuente.** Elaboración propia

**a) Cromatografía de capa fina en el sustrato.**

Se realizó la siembra de una disolución del extracto en una placa de fase reversa y como fase móvil: 60% H2O (al 10 % ácido fórmico) y 40% Acetonitrilo.



**a)** **b)** **c)**

Nota. a) Placa revelada en $H_2SO_4$ al 5%, b) Placa revelada en $FeCL_3$ al 5%, c) UV 365 nm.

**Figura 77.** Desarrollo de placa TLC para el sustrato
**Fuente.** Elaboración propia.

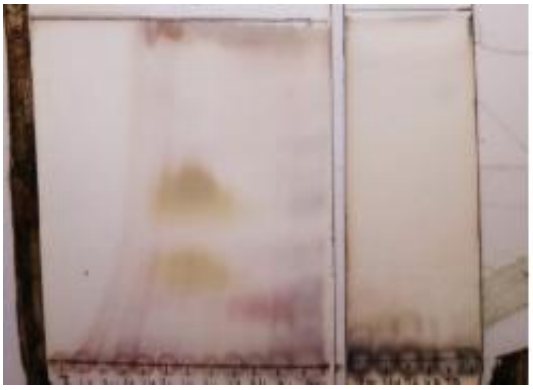
**Interpretación.-** Se puede presenciar en (a) la presencia de coloración amarilla que es un color característico de los compuestos fenólicos y flavonoides al ser revelado en $H_2SO_4$ al 5%. A lo así en (b) llegamos a tener otra confirmación ya que los compuestos fenólicos y flavonoides al ser revelados en $FeCl_3$ al 5% se puede presenciar una coloración azul oscura en la parte superior confirmando su presencia. En (c) la placa al ser expuesta bajo la luz UV a 365 nm se puede presenciar la coloración verde profundo que es muy característico de compuestos fenólicos y flavonoides. Así confirmamos mediante placa TLC la presencia de un compuesto fenólico o la presencia de un flavonoide el cual nos otorga un visto bueno para la continuación del siguiente proceso para la separación de este compuesto.

**b) Columna Sephadex LH 20**

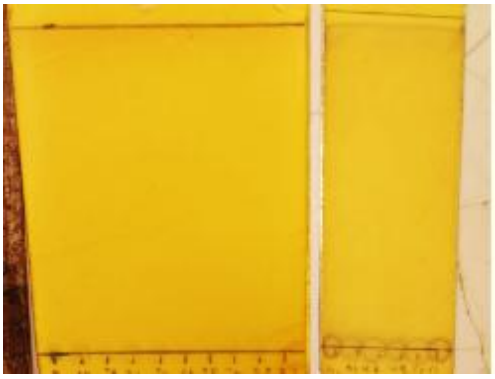
La cromatografía por exclusión molecular tiene como finalidad la separación de compuesto de acuerdo al tamaño de partícula. Se utilizó una columna Sephadex LH 20 como fase estacionario y como fase móvil se utilizó etanol al 100%.

Para el control de placas TLC se realizaron la siembra de las fracciones en una placa de fase normal y como fase móvil: 60% de Acetato de Etilo y 40% de Éter de petróleo.

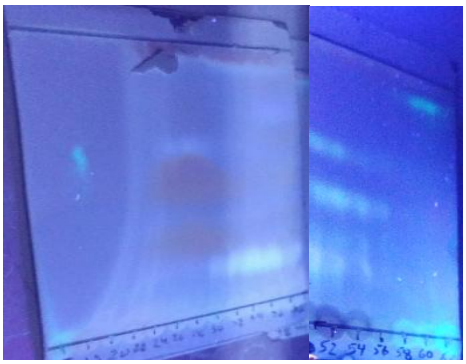
a)



b)



c)



Nota. Placas de primera corrida de columna Sephadex a) Placa revelada en $H_2SO_4$ al 5%, b) Placa revelada en $FeCL_3$ al 5%, c) UV 365 nm.

**Figura 78.** Desarrollo de placas TLC para fracciones de Columna Shepadex
**Fuente.** Elaboración propia.

**Interpretación.-** Para evitar la saturación en la columna se procedió a realizar 4 repeticiones de columna, todas se llevaron a control por placas TLC para agrupar posteriormente las fracciones similares en cada columna. Se puede presenciar en (b) que las ultimas fracciones en el revelado con $FeCl_3$ al 5% presentan el cambio de color característicos de compuestos fenólicos y flavonoides y en (c) es muy evidente

que bajo la luz UV la presencia de verde profundo nos confirma que en las últimas fracciones tenemos la presencia de compuestos fenólicos o flavonoides. Por lo tanto bajo estos criterios se procedió a la agrupación de las últimas fracciones de cada columna otorgándonos un visto bueno para la continuación del siguiente proceso para la separación del compuesto fenólico o flavonoide presente.

**c) Columna fase reversa C18**

En una etapa anterior se detectó que el compuesto a analizar en fase normal tiene un comportamiento muy polar por lo que se procedió al uso de una columna de fase reversa C18.

Se utilizó una columna de fase reversa C18 como fase estacionario y se utiliza como fase móvil una mezcla de 40% de Acetonitrilo y 60% agua (al 10% en acido fórmico).

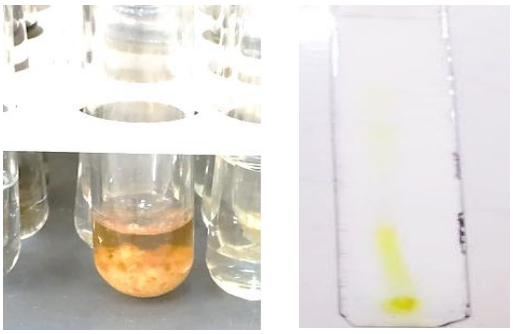
Para el control de placas TLC se realizaron la siembra de las fracciones en una placa de fase reversa y como fase móvil: 60% $H_2O$ (al 10 % ácido fórmico) y 40% Acetonitrilo.

**a)** **b)** **c)**

Nota. Placas de primera corrida de columna fase reversa C18. a) Placa revelada en $H_2SO_4$ al 5%, b) Placa revelada en $FeCL_3$ al 5%, c) UV 365 nm.

**Figura 79.** Desarrollo de placa TLC para columna fase reversa C18
**Fuente.** Elaboración propia.

**<u>Interpretación</u>.-** Para evitar la saturación en la columna se procedió a realizar 4 repeticiones de columna, todas se llevaron a control por placas TLC para agrupar posteriormente las fracciones similares en cada columna. Se puede presenciar en (b) que las primeras fracciones en el revelado con $FeCl_3$ al 5% presentan el cambio de color característicos de compuestos fenólicos y flavonoides.



***a)*** ***b)***

Nota. a) Precipitado de agrupación de primeras fracciones de columna C18, b) placa fase reversa de siembra de precipitado revelado en $H_2SO_4$ al 5%.

**Figura 80.** Desarrollo de placa TLC para precipitado
**Fuente.** Elaboración propia.

**Interpretación.-** Se agruparon las primeras fracciones de cada corrida de columna de C18 y con el transcurso del tiempo se presentó un precipitado blanco como se observa en (a). En (b) el precipitado fue sembrado en una placa de fase reversa y como fase móvil: 60% $H_2O$ (al 10 % ácido fórmico) y 40% Acetonitrilo.

**ANEXO F.**

## Agrupación de columnas

Mediante la cromatografía en capa fina se realizaron los controles del proceso de separación y mediante la observación de sus similitudes se realizaron las siguientes agrupaciones de fracciones.

a) **Columna Sephadex LH 20**

Se realizaron 4 repeticiones para evitar la saturación de la columna teniendo los siguientes resultados.

**Tabla 32.** Detalle de repeticiones en columna Sephadex

| ***Nº de corrida*** | ***Masa sembrada de extracto (mg)*** | ***vol. Solvente para sembrado (ml)*** | ***Nº fracciones obtenidos*** | ***Tipo de columna*** |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 180 | 2 | 53 | delgada |
| 2 | 150 | 2 | 32 | delgada |
| 3 | 180 | 2 | 35 | delgada |
| 4 | 2050 | 5 | 62 | gruesa |
| **Masa total** | **2560 mg** | | | |

Nota. Detalle de las repeticiones y características de cada corrida en columna Sephadex LH 20.
**Fuente.** Elaboración propia

**Tabla 33.** Agrupación de fracciones en columna Sephadex

| **Grupo** | **Nº de corrida de columna Sephadex** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Primera corrida** | **Segunda corrida** | **Tercera corrida** | **Cuarta corrida** |
| G1 | 1;2;3;4;5;6;7;8;9;10;11;12;13;14 | 1;2;3;4;5;6;7;8;9;10 | 1;2;3;4;5;6;7;8;9;10 | 1;2;3;4;5;6;7;8;9;10;11;12;13;14;15;16 |
| G2 | 15;16;17;18 | 11;12 | 11;12 | 17;18;19 |
| G3 | 19;20 | 13 | 13;14;15 | 20;21;22;23 |
| G4 | 21 | 14 | 16;17 | 24;25;26;27 |
| G5 | 22;23;24 | 15;16;17 | 18;19;20 | 28;29;30;31 |
| G6 | 25;26;27 | 18,19,20 | 21 | 32;33;34;35;36;37;38 |
| G7 | 28 | 24 | 22 | 39;40;41;42;43 |
| G8 | 29;30;31;32;33;34;35;36;37 | 25;26 | 23;24;25;26;27;28;29;30;31 | 44;45;46;47;48;49;50;51;52 |
| G9 | 38;39;40;41;42;43;44;45;46;47;48;49;50;51;52;53 | 27;28;29;30;31;32 | 32;33;34;35 | 53;54;55;56;57;58;59;60;61;62 |

Nota. Grupo= es el grupo de agrupación de fracciones de cada corrida de columna Sephadex.
**Fuente.** Elaboración propia.

**Interpretación.-** De acuerdo al control por placas TLC detallado en el anexo E. Se puede observar que el grupo G9 es el que contiene el compuesto de nuestro interés.

b) **Columna fase reversa C18**

Se realizaron 4 repeticiones para evitar la saturación de la columna teniendo los siguientes resultados.

**Tabla 34.** Agrupación de fracciones en columna C18

| Nº de corrida | Masa sembrada (mg) | Nº fracciones obtenidos |
|---|---|---|
| 1 | 30 | 30 |
| 2 | 22,7 | 15 |
| 3 | 33 | 15 |
| 4 | 127,7 | 20 |
| **Masa total** | **213,4 mg** | |

Nota. Detalle de las repeticiones y características de cada corrida en columna C18.
**Fuente.** Elaboración propia.

**Tabla 35.** Agrupación de fracciones en columna C18

| Grupo 9 | Nº de corrida de columna C18 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Primera corrida** | **Segunda corrida** | **Tercera corrida** | **Cuarta corrida** |
| G9.a | 1;2;3 | 1;2 | 1;2;3 | 1;2;3;4 |
| G9.b | 4;5;6;7;8;9; 10;11;12;13; 14;15;16;17; 18;19;20;21; 22;23 | 3;4;5;6;7;8;9 | 4;5;6;7;8;9;10 | 5;6;7;8;9;10;11; 12;13 |
| G9.c | 24;25;26;27; 28;29;30 | 10;11;12;13;14 ;15 | 11;12;13;14;15 | 14;15;16;17;18; 19;20 |

Nota. Grupo 9= Son el grupo de agrupación de fracciones de cada corrida de columna C18.
**Fuente.** Elaboración propia.

**Interpretación.-** De acuerdo al control por placas TLC detallado en el anexo D. Se puede observar que el grupo G9.a es el que contiene el compuesto de nuestro interés. El grupo G9.a es el que llegó a precipitar y contiene el compuesto Rutina que posteriormente fue detectado al RMN.

**ANEXO G.**

**Cuantificación por cromatografía de alta resolución (HPLC)**

La solución de muestras de extracto antes de ser inyectados en el HPLC, se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm. Los análisis se realizaron en un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC Agilent 1100. "La fase móvil se preparó utilizando agua altamente pura acidificada con ácido fosfórico (H3PO4) al 0,1% (solución A) y Acetonitrilo grado HPLC (solución B) en la proporción 80A: 20B. El caudal fue de 1,0 ml min-1 con un tiempo de ejecución de 15 minutos y un volumen inyectado de 20µl" (Nogueira Oliveira, Ribeiro da Silva, Silva de Lima , de Almeida, Pontes Silva Ricardo, & Teixeira de Figueiredo, 2020). Las inyecciones se realizaron por triplicado.

a) **Condiciones de separación.-**

Columna en fase reversa

Temperatura= 30ºC

Flujo = 1.0 ml/min

**Tabla 36.** Condiciones de operación

| **Condición** | Isotrópico | |
|---|---|---|
| **Eluyentes** | Acetonitrilo | 20% |
| | $H_3PO_4$ (0,1%) | 80% |

**Fuente.** Elaboración propia.

b) **Curva de calibración**

En una placa de fase reversa se sembró tres muestras obtenidas de rutina para comprobar cual se encuentra en mayor grado de pureza.

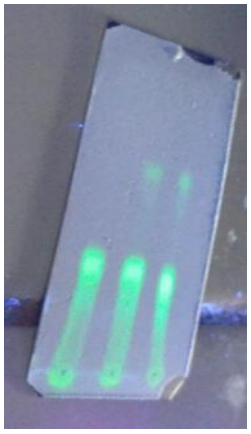


**Figura 81.** Placa de muestras de Rutina
**Fuente.** Elaboración propia

De acuerdo a la placa se pudo observar que la muestra 1 se encuentra en mayor grado de pureza.

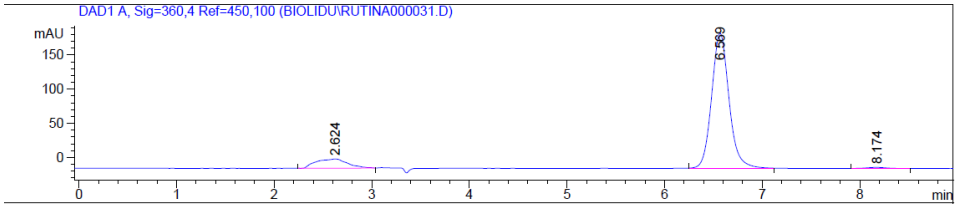
Se llevó la muestra 1 a una concentración de 1000 ppm usando 2 ml de Metanol.

$$ppm = \frac{masa\ soluto(g)}{volumén\ de\ solución\ (l)}$$

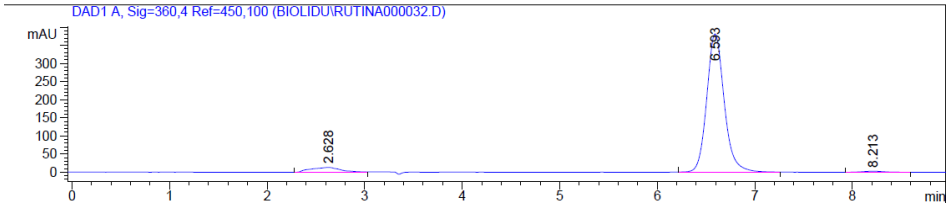
$$mg\ = \frac{1000\ ppm * 2ml}{1000} = 2\ mg\ rutina$$

De la solución madre de 1000 ppm, procedimos a la disolución a diferentes concentraciones de 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm y realizando por triplicado para cada concentración. La curva de calibración se construyó inyectando por triplicado las soluciones de rutina de las 5 concentraciones preparadas.

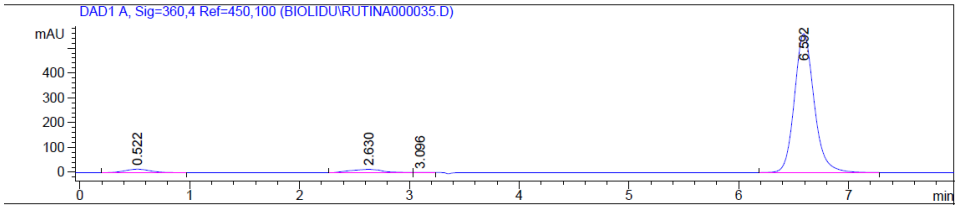
100ppm




200ppm




300ppm




400ppm

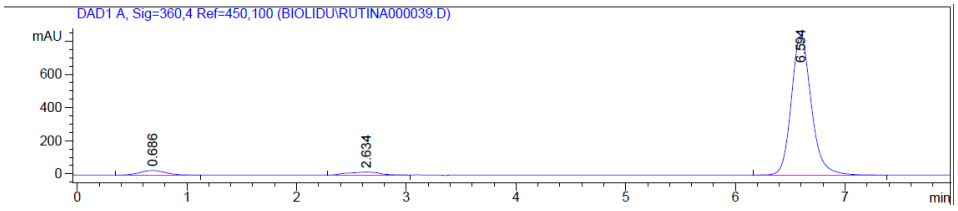



**Figura 82.** Cromatogramas para diferentes concentraciones de Rutina
**Fuente.** Colaboración Msc. San Martín Ortiz Ángela Jhamilka (IIQ).

## ANEXO H.

### Balance de materia

### Proceso de secado

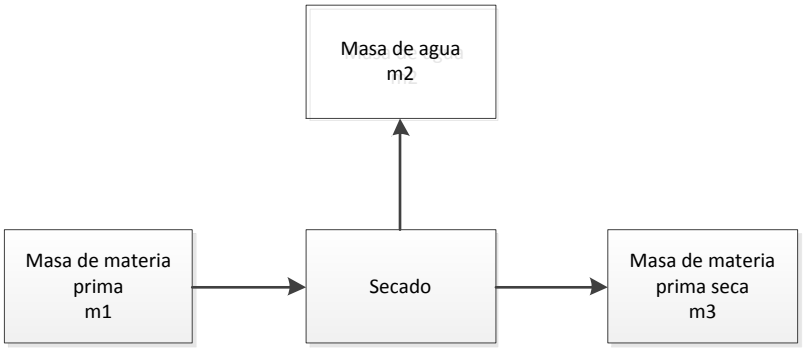



**Figura 83.** Balance de materia en el proceso de Secado
**Fuente:** Elaboración propia.

Se realiza el secado de la materia prima a temperatura ambiente. El balance es:

$$m_3 = m_1 - m_2 \tag{H.1}$$

La masa inicial de materia prima es: $m_1 = 500\ g$

La masa final de materia prima seca es: $m_3 = 388{,}055\ g$

Entonces, la masa de agua es:

$$m_2 = m_1 - m_3 \tag{H.2}$$

$$m_2 = 500g - 388{,}055g = 111{,}945\ g \tag{H.3}$$

Expresando la humedad en base seca:

$$X_{BS} = \frac{m_2}{m_3} \tag{H.4}$$

$$X_{BS} = \frac{111{,}945g}{388{,}055g} = 0{,}288 \tag{H.5}$$

**Proceso de tamizado**

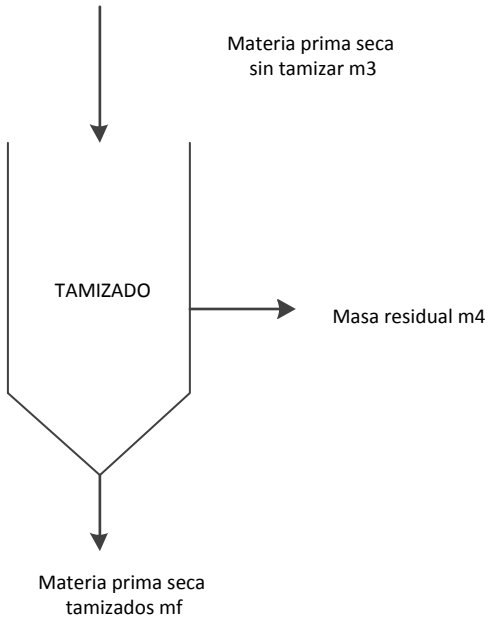



**Figura 84.** Balance de materia en el proceso de Tamizado.
**Fuente:** Elaboración propia.

El tamizado se realiza entre tamices de malla (30 a 60), el balance es:

$$m_3 = m_f + m_4 \tag{H.6}$$

$$m_f = m_3 - m_4 \tag{H.7}$$

La masa de materia vegetal seca que entra al proceso es: $m_3 = 388{,}055\ g$

La masa residual que queda en los tamices: $m_4 = 67\ g$

Entonces, la masa de materia prima seca tamizados es:

$$m_f = 388{,}055g - 67g = 321{,}055\ g \tag{H.8}$$

**Proceso de extracción**

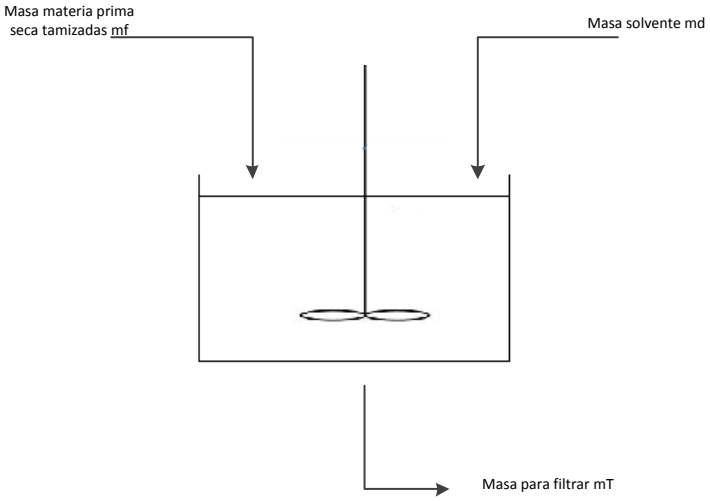



**Figura 85.** Balance de materia de la Extracción
**Fuente:** Elaboración propia

El proceso de extracción se realiza con 100,050 g de material vegetal seco ya tamizado y con solvente en proporción 80% etanol y 20 % agua, para realizar el balance se toma en cuenta la densidad del solvente para así mediante el volumen utilizado encontrar la masa.

$$m_T = m_f + m_d \tag{H.9}$$

La relación soluto solvente es de 1:20

La masa de material vegetal usada $m_f$ =100,05 g

Por lo tanto, se utiliza un volumen de 2000 ml

$$2000\ ml * \frac{0{,}862\ g}{1\ ml} = 1724\ g \tag{H.10}$$

Por lo tanto la masa de la torta es:

$$m_T = 100{,}050 + 1724 = 1824{,}050\ g \tag{H.11}$$

**Proceso de filtrado**

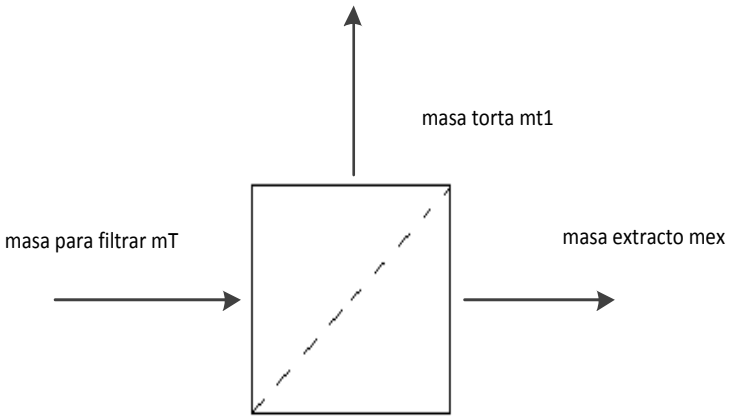



**Figura 86.** Balance de materia en el Filtrado
**Fuente.** Elaboración propia

El balance general:

$$m_T = m_{t1} + m_{ex} \tag{H.12}$$

Se realiza el filtrado donde se obtienen 750 ml retenidos en los cálices

$$750\ ml * \frac{0{,}862\ g}{1\ ml} = 646{,}500\ g\ de\ solvente \tag{H.13}$$

Por lo tanto la masa del extracto es:

$$m_{ex} = 1824{,}050 - 646{,}500 = 1177{,}550\ g \tag{H.14}$$

**Proceso de concentración por evaporación**

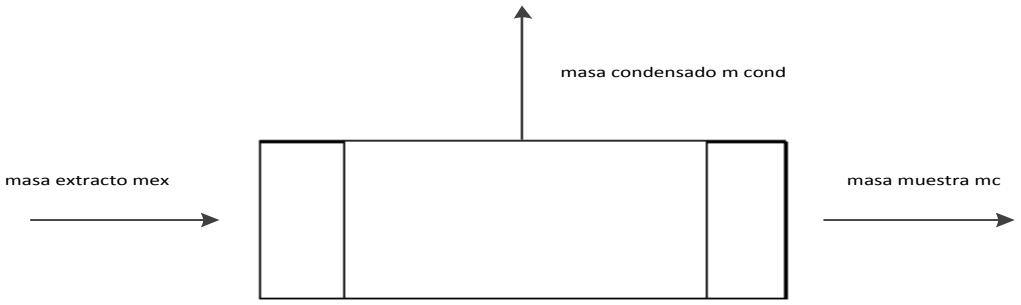



**Figura 87.** Balance de Materia en la Evaporación
**Fuente:** Elaboración propia

El balance global:

$$m_{ex} = m_{cond} + m_c \tag{H.15}$$

La masa de extracto que ingresa es: $m_{ex} = 1177{,}550\ g$

La masa de la muestra obtenida después de la concentración es: $m_c = 12{,}900\ g$

Entonces la masa de condensado de solvente recuperado es:

$$m_{cond} = 1177{,}550 - 12{,}900 = \ 1164{,}650\ g \tag{H.16}$$

Debido a que la concentración se realiza en un rotaevaporador, se necesita determinar la cantidad de agua necesaria para mantener el baño maría a una temperatura de 40ºC. De las especificaciones del equipo, la potencia del mismo es de 1350W y el baño maría tiene una capacidad de 2 litros de agua.

El calor será:

$$q = mC_p\Delta T \tag{H.17}$$

$$C_{pH_2O} = 4{,}186\ \left[\frac{J}{g°C}\right]; m = 2\ kgH_2O = 2000\ gH_2O \text{ de} \tag{H.18}$$

Debido a que los extractos se concentran a 40ºC para evitar la disipación de los metabolitos:

$$\Delta T = 40°C - 20°C = 20°C \tag{H.19}$$

Reemplazando

$$q = 2000g * 4{,}186\left[\frac{J}{g°C}\right] * 20°C = 167440\ J = 167{,}440\ KJ \tag{H.20}$$

**Proceso de separación de compuestos por cromatografía**

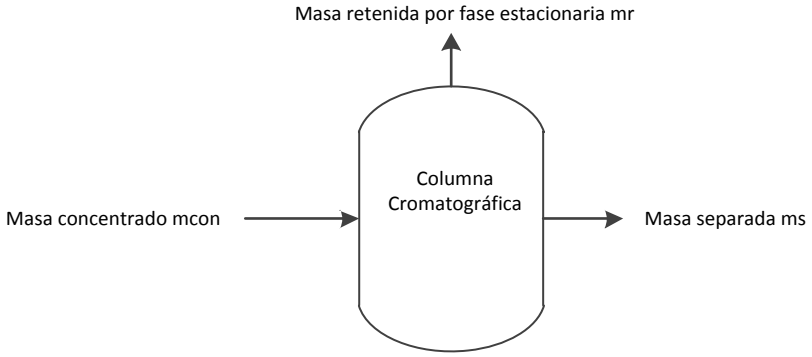



**Figura 88.** Balance de materia para el proceso de separación en columna
**Fuente:** Elaboración propia

Para la separación de compuestos primero se realiza un pre-tratamiento de lavado del concentrado con butanol para eliminar la presencia de taninos (la muestra dio resultado positivo para taninos en las pruebas fitoquímicas) evitando así la formación de una pigmentación en la columna Sephadex.

**Columna Sephadex LH 20**

Se utiliza etanol como eluyente, para evitar la saturación en la columna se procedió a realizar 4 repeticiones de columna utilizando una masa total de 2,560 g de concentrado de extracto seco. El proceso detallado se encuentra en el anexo E.

**Columna fase reversa C18**

Se utiliza como fase móvil una mezcla de 40% de Acetonitrilo y 60% agua (al 10% en acido fórmico), para evitar la saturación en la columna se realizaron 4 repeticiones utilizando una masa total de 2,560 g de muestra.

**ANEXO I.**

## Actividad biológica de Rutina

El cultivo celular es una herramienta base, que permite realizar diferentes estudios sobre actividad biologica, en este caso hablamos de líneas celulares de cáncer, la ventaja de esta herramienta es que permite controlar las condiciones en las cuales las células crecen, creando así un microambiente el cual llegue a imitar las condiciones en las que las células se encontrarían naturalmente; permitiendo así resolver dudas acerca del comportamiento de diferentes líneas celulares de cáncer en interacción con alguna sustancia de interés (Giard et al., 1973; Takahashi, 1985)

**Línea celular de cáncer de colon Caco-2.**

Caco-2 es una línea celular heterogénea de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano (ATCC, 2019b), son células derivadas del colon, en cultivo in vitro crecen en monocapa, se asemejan a los enterocitos del intestino delgado (Hidalgo, Raub and Borchardt, 2011).

Se cultivó esta línea celular en frascos T75, con medio Dulbecco Eagle Modificado (DMEM) con L-glutamina, piruvato de sodio y 45000 mg de glucosa, suplementado con suero bovino fetal al 10% y 100 U / ml de penicilina / 100 µg / ml de estreptomicina.

**Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y moléculas por el ensayo de proliferación celular mtt**

Se utilizó el ensayo de proliferación celular MTT estandarizado en el laboratorio para el análisis de la actividad citotóxica de extractos y moléculas, el cual se basa en la conversión de sales de tetrazolio a formazán, que solo se realiza en células vivas, mediante su actividad metabólica, actuando sobre el MTT a través de deshidrogenasas, en especial la succinato deshidrogenasa, y reductasas citosólicas, por lo que la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células vivas. Las células muertas no pueden realizar esta reducción, debido a que sus membranas celulares han sufrido daños. Es un ensayo colorimétrico cuantitativo, rápido y preciso (Mosmann, 1983).

Se sembraron 10000 células de la línea Caco-2 por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos, se las incubó por 24 horas a 37ºC y 5% de $CO_2$. Se añadió los extractos a concentraciones de 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 µg/ml y moléculas en concentraciones finales de 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 µM. En el caso de las moléculas, se utilizó como solvente DMSO al 100%. Como control negativo se utilizó agua millipore y como control positivo se utilizó Cisplatino (150.5 µM), un agente antiproliferativo (antitumoral) conocido.

Posterior a esto se realizó el cálculo de la concentración inhibitoria máxima media (IC50), la cual indica la cantidad de una sustancia necesaria para inhibir la proliferación celular en 50%. Se realizó un mínimo de 3 ensayos independientes. Los cálculos para los valores de IC50, se obtuvieron mediante el software GraphPad Prism 7.

**Referencias bibliográficas**

Giard, D. J. et al. (1973) 'In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors', J Natl Cancer Inst, 51(5), pp. 1417–1423. doi: 10.1093/jnci/51.5.1417

Hidalgo, I. J., Raub, T. J. and Borchardt, R. T. (2011) 'Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability', The AAPS Journal, 13(3), pp. 323–7. doi: 10.1208/s12248-011-9283-8.

Mosmann, T. (1983) 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays', Journal of Immunological Methods, 65(1–2), pp. 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Takahashi, M. (1985) Citologia del Cancer. 2°. Buenos Aires: Panamericana

**ANEXO J.**

## Modelo de Negocio

### Análisis FODA

Considerando la implementación de una planta de extracción de sustrato de cáliz de Chilto en la comunidad de Comarapa se realiza un análisis FODA para encontrar los inconvenientes que pueda presentarse en un futuro.

| FORTALEZAS | OPORTUNIDADES |
|---|---|
| - Por sus propiedades anti proliferativas aporta a la lucha contra el cáncer.<br>- Recuperación de áreas productivas.<br>- Cubrir el mercado ausente. | - Aprovechamiento del cáliz de chilto considerado como residuo orgánico.<br>- Incremento de producción.<br>- Desarrollo en la comunidad productora. |
| **AMENAZAS** | **DEBILIDADES** |
| - La falta de comunicación con los comunaríos.<br>- No cubrir toda la demanda que se genera al poner la planta. | - Cambios climáticos extremos (sequias o inundaciones).<br>- Falta de conocimiento en mano de obra del manejo del extractor. |

**Figura 89.** Análisis FODA
**Fuente:** Elaboración propia

### Análisis del producto

En la comunidad de Comarapa se realiza el abastecimiento al mercado nacional solamente del fruto, lo que se quiere realizar es el aprovechamiento de toda la producción así mismo abriendo un nuevo mercado para el cáliz del chilto para la extracción de flavonoides.

### Uso del producto

El uso que se estima para este producto al contar con la obtención del flavonoide mayoritario Rutina es la reducción de la proliferación de células cancerígenas llevándolo al mercado de las farmacéuticas para medicamentos enfocados a tratamientos contra el cáncer

y a las empresas cosmetológicas para implementarla en sus productos de belleza para el rejuvenecimiento de la piel

**Determinación geográfica**

"Comarapa se encuentra ubicada entre los departamentos de Cochabamba y Santa Cruz sobre la carretera antigua que une a estas ciudades. El municipio se extiende a lo largo de 3.363,51 $Km^2$ y tiene una población de alrededor de 20.000habitantes de los cuales la gran mayoría aún se dedica a la agricultura y/o pecuaria. Este municipio se caracteriza por su topografía variada que comprende tres zonas: la alta serranía húmeda de la Siberia, los valles rodeados de montañas y las llanuras amazónicas." (Fernandez, 2022)

- **Macro localización**

  Se hace referencia a lo más general que es nuestro país de Bolivia y en el departamento de Santa Cruz en el cual nos enfocaremos para delimitar y ser más específico que necesita el proyecto.

- **Micro localización**

  Para tener una mayor exactitud de la investigación se determina el lugar donde se produce el Chilto para tener un criterio de implementación de una planta de obtención de sustrato de cáliz de Chilto detallando al lugar donde se ejecutará el proyecto el cual es en la comunidad de Comarapa.

## Modelo CANVAS

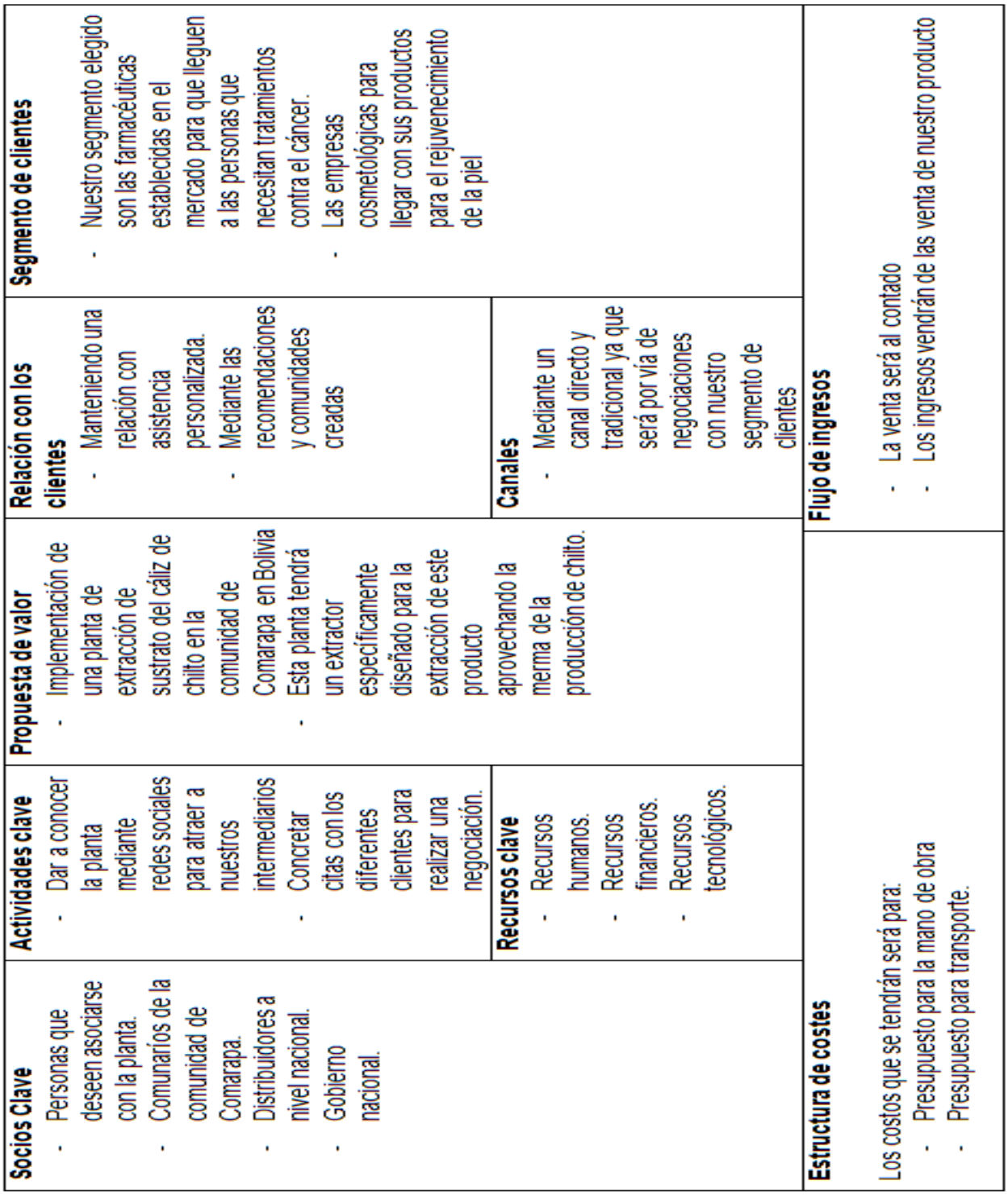


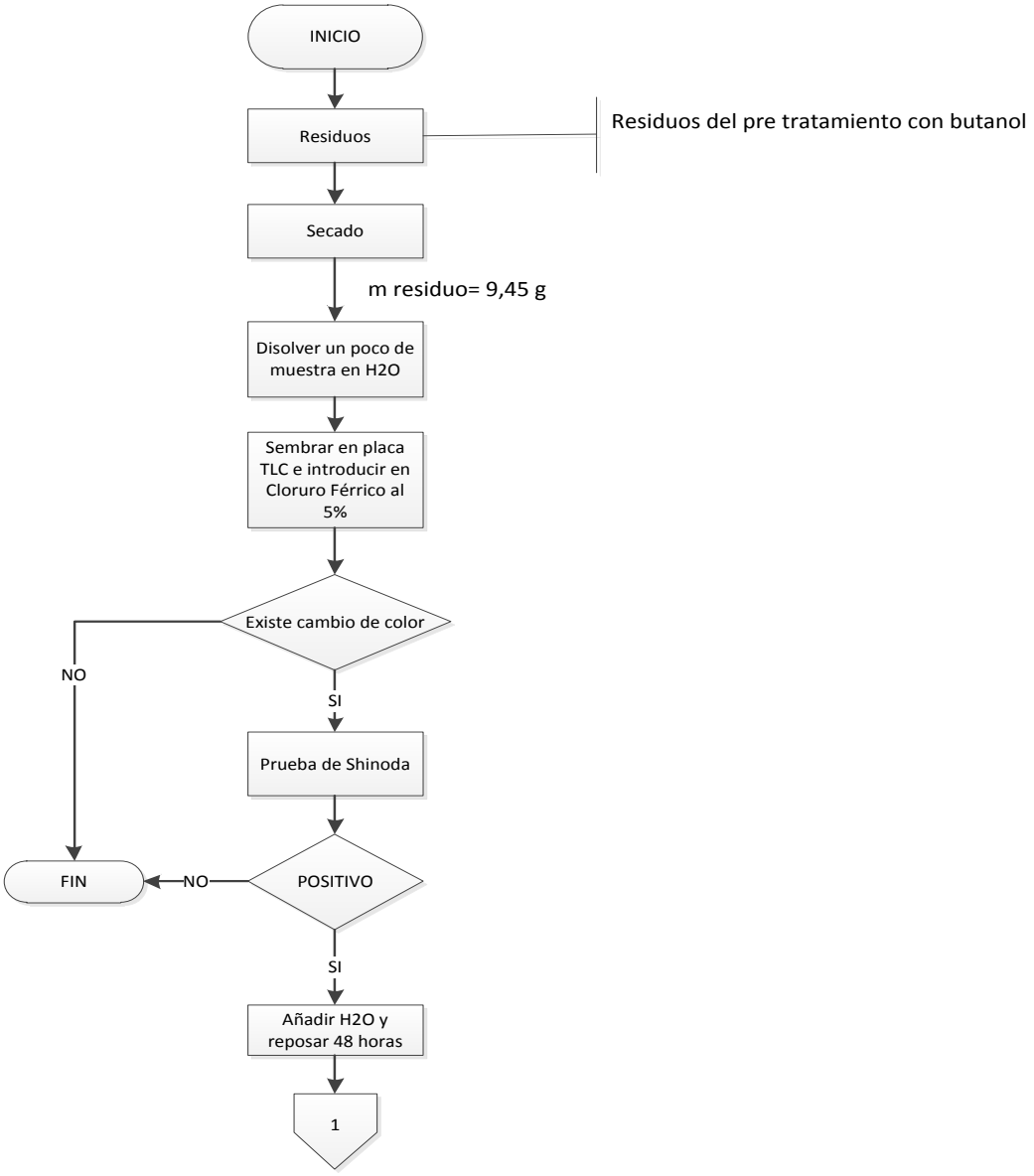

**Figura 90.** Modelo de negocio CANVAS
**Fuente:** Elaboración propia

**ANEXO K.**

## Tratamiento de Residuos

Despues de realizado el pretratamiento con butanol se obtuvieron residuos que no son solubles en butanol. Realizando el siguiente tratamiento.

**a) Procedimiento**



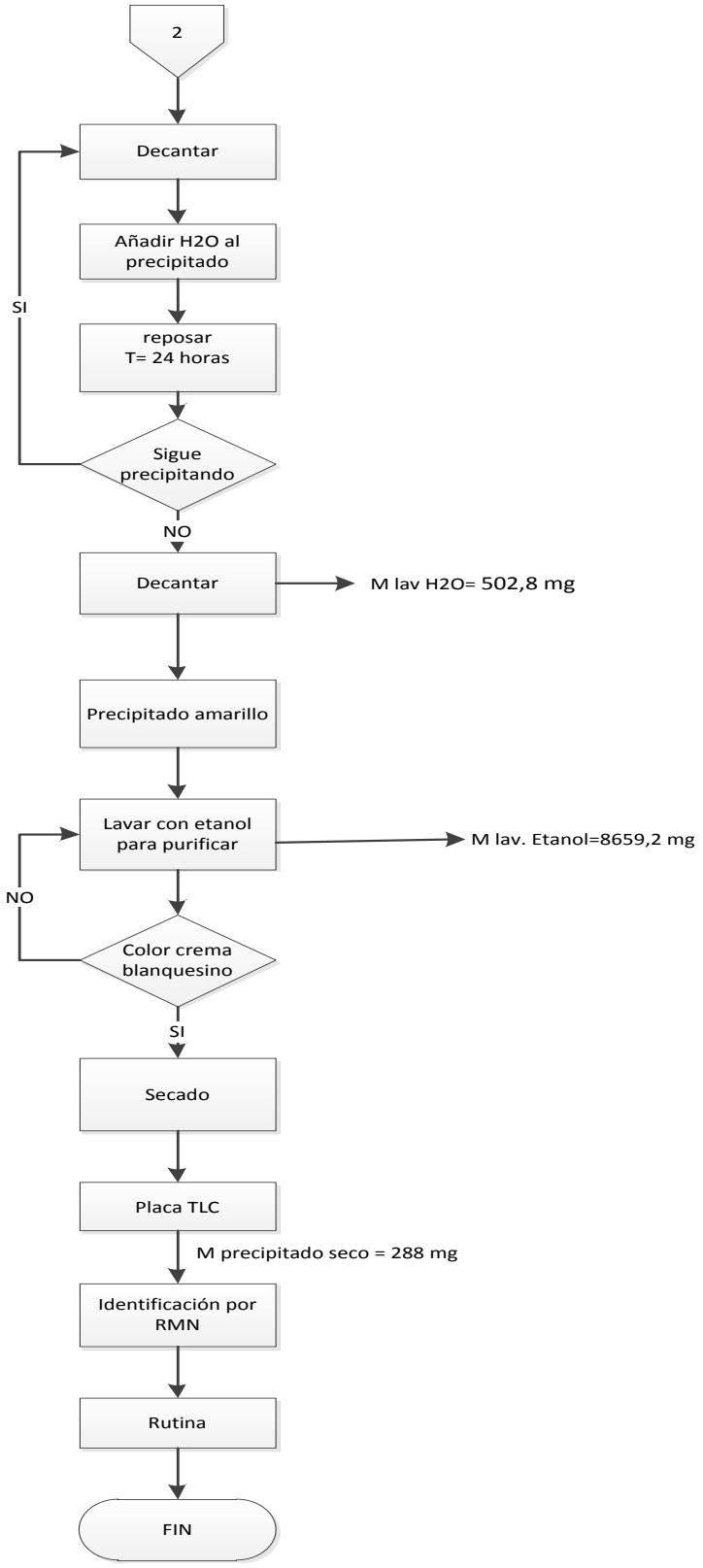
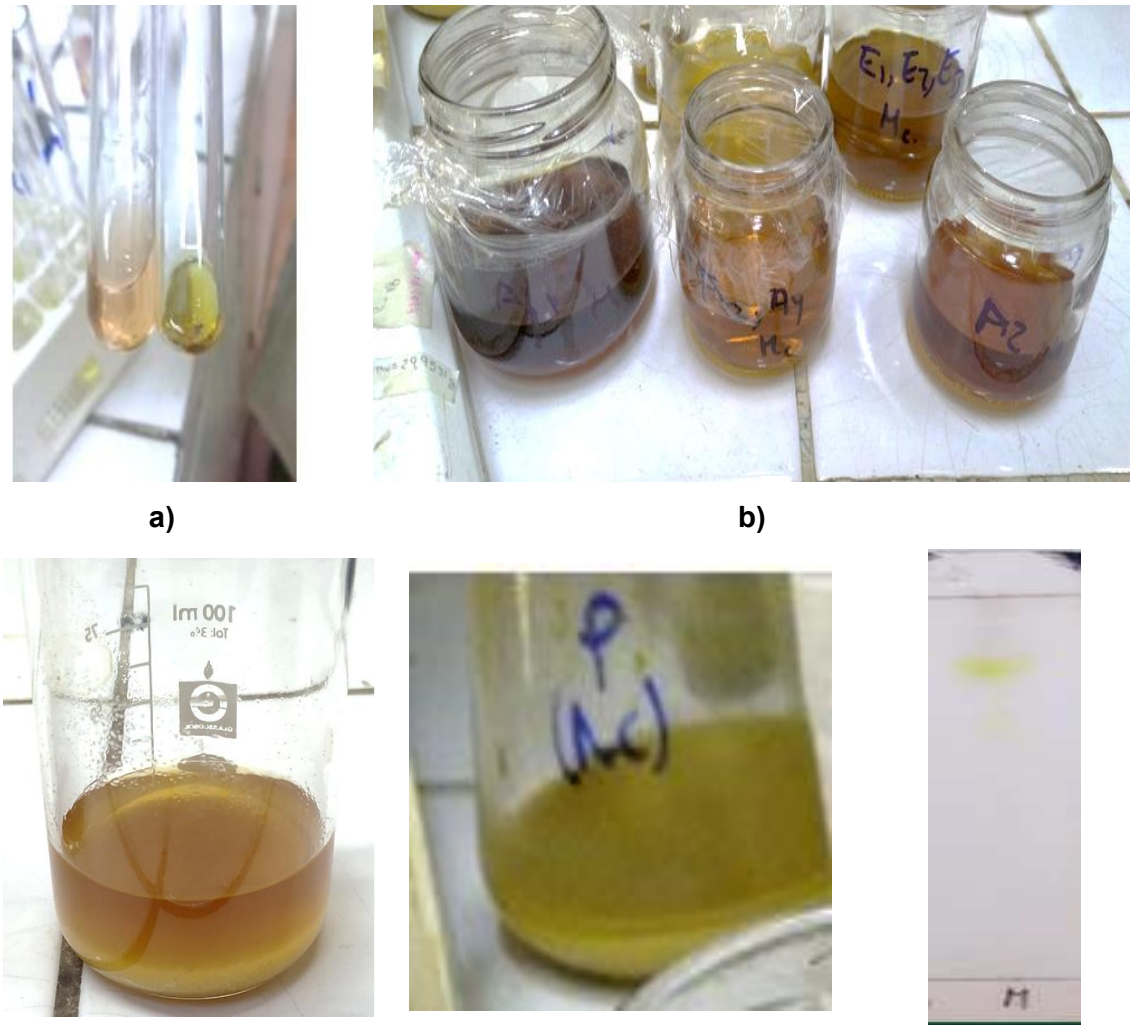



**Figura 91.** Flujograma de tratamiento de residuos
**Fuente:** Elaboración propia

**b) Resultados**

Se realizaron 4 lavados con agua y 3 lavados con etanol.



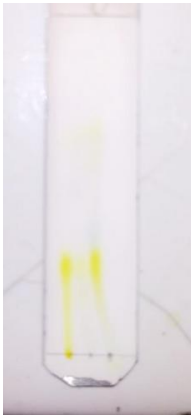

Nota. a)Prueba de shinoda positiva de los residuos; b) Fracos con los lavados de agua (A1 A2 A3 A4) y frascos con los lavados de etanol (E1E2E3); c) último lavado con Etanol al precipitado; d) precipitado (P); e) placa del precipitado (fase móvil: 30%$H_2O$, 50% n-butanol, 20% ácido acético).

**Figura 92.** Fotografías del procedimiento

**Fuente.** Elaboración propia.

Se realizo una placa TLC para comprobar su similitud de los lavados con agua dando como resultado la mismo tiempo de retención para los 4 lavados con agua los cuales se procedieron a su agrupación y una placa TLC para comprobar su similitud de los lavados con etanol dando como resultado la mismo tiempo de retención de los 3 lavados con etanol los cuales se procedieron a su agrupación.

Se realizo una placa TLC fase reversa al precipitado dando como resultado el mismo comportamiento de la Rutina.



**a)**

Nota. Placa fase reversa. Fase movíl: 40% acetonitrilo, 60% agua (al 10% acido formico). El primer sembrado corresponde a la muestra de Rutina en mayor pureza, el segundo punto es el sembrado del precipitado obtenido (P). Se puede observar que ambas presentan la similitud de comportamiento en su tiempo de retención.

**Figura 93.** Placa de fase reversa de sembrado de Rutina y Precipitado (P)
**Fuente.** Elaboración propia.

El precipitado se llevo a su concentración y posteriormente a un secado.

Una muestra del precipitado seco se llevo al RMN dando como resultado la molecula de Rutina.

**Tabla 37.** Resultados del proceso de residuos

| | **Masa (mg)** |
|---|---|
| Lavados con agua | 502,8 |
| Lavados con etanol | 8659,2 |
| Precipitado (Rutina) | 288 |

**Fuente**. Elaboración propia.

**c) Observaciones y conclusiones**

La Rutina obtenida por este procedimiento contenía mas impurezas que el realizado por el proceso de columna. Por lo cual se recomienda que el precipitado pase por una columna fase reversa C18 para su purificación.

La cantidad obtenida por este procedimiento tiene un alto rendiemto al realizado por la obtención de proceso de columnas  dando como resultado 288 mg de Rutina.

senapi
SERVICIO NACIONAL DE PROPIEDAD INTELECTUAL

ESTADO PLURINACIONAL DE BOLIVIA
MINISTERIO DE DESARROLLO PRODUCTIVO Y ECONOMÍA PLURAL

2023-TTES-575-D-1

**DIRECCIÓN DE DERECHO DE AUTOR**
**Y DERECHOS CONEXOS**
**RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA NRO. 1-1661/2023**
**La Paz, 3 de Julio del 2023**

**VISTOS:**

La solicitud de Inscripción de Derecho de Autor presentada en fecha **26 de Junio del 2023**, por **LIDUVINIA STEINHA STRAUSS ALVAREZ** con **C.I. Nº 6823074 LP**, con número de trámite **DA 853/2023**, señala la pretensión de inscripción del Proyecto de Grado titulado: **"ESTUDIO BASICO PARA LA EXTRACCION DE FLAVONOIDES DEL CALIZ DE CHILTO (PHYSALIS PERUVIANA)"**, cuyos datos y antecedentes se encuentran adjuntos y expresados en el Formulario de Declaración Jurada.

**CONSIDERANDO**

Que, en observación al Artículo 4º del Decreto Supremo Nº 27938 modificado parcialmente por el Decreto Supremo Nº 28152 el *"Servicio Nacional de Propiedad Intelectual SENAPI, administra en forma desconcentrada e integral el régimen de la Propiedad Intelectual en todos sus componentes, mediante una estricta observancia de los regímenes legales de la Propiedad Intelectual, de la vigilancia de su cumplimiento y de una efectiva protección de los derechos de exclusiva referidos a la propiedad industrial, al derecho de autor y derechos conexos; constituyéndose en la oficina nacional competente respecto de los tratados internacionales y acuerdos regionales suscritos y adheridos por el país, así como de las normas y regímenes comunes que en materia de Propiedad Intelectual se han adoptado en el marco del proceso andino de integración"*.

Que, el Artículo 16º del Decreto Supremo Nº 27938 establece *"Como núcleo técnico y operativo del SENAPI funcionan las Direcciones Técnicas que son las encargadas de la evaluación y procesamiento de las solicitudes de derechos de propiedad intelectual, de conformidad a los distintos regímenes legales aplicables a cada área de gestión"*. En ese marco, la Dirección de Derecho de Autor y Derechos Conexos otorga registros con carácter declarativo sobre las obras del ingenio cualquiera que sea el género o forma de expresión, sin importar el mérito literario o artístico a través de la inscripción y la difusión, en cumplimiento a la Decisión 351 Régimen Común sobre Derecho de Autor y Derechos Conexos de la Comunidad Andina, Ley de Derecho de Autor Nº 1322, Decreto Reglamentario Nº 23907 y demás normativa vigente sobre la materia.

Que, la solicitud presentada cumple con: el Artículo 6º de la Ley Nº 1322 de Derecho de Autor, el Artículo 26º inciso a) del Decreto Supremo Nº 23907 Reglamento de la Ley de Derecho de Autor, y con el Artículo 4º de la Decisión 351 Régimen Común sobre Derecho de Autor y Derechos Conexos de la Comunidad Andina.

Que, de conformidad al Artículo 18º de la Ley Nº 1322 de Derecho de Autor en concordancia con el Artículo 18º de la Decisión 351 Régimen Común sobre Derecho de Autor y Derechos Conexos de la Comunidad Andina, referentes a la duración de los Derechos Patrimoniales, los mismos establecen que: *"la duración de la protección concedida por la presente ley será para toda la vida del autor y por 50 años después de su muerte, a favor de sus herederos, legatarios y cesionarios"*.

VºBº Abg. Carlos Alberto Senja Arraya

VºBº Mario Mery Quispe Arraya

senapi
SERVICIO NACIONAL DE PROPIEDAD INTELECTUAL

ESTADO PLURINACIONAL DE BOLIVIA
MINISTERIO DE DESARROLLO PRODUCTIVO Y ECONOMÍA PLURAL

Que, se deja establecido en conformidad al Artículo 4º de la Ley Nº 1322 de Derecho de Autor, y Artículo 7º de la Decisión 351 Régimen Común sobre Derecho de Autor y Derechos Conexos de la Comunidad Andina que: "*...No son objeto de protección las ideas contenidas en las obras literarias, artísticas, o el contenido ideológico o técnico de las obras científicas ni su aprovechamiento industrial o comercial*".

Que, el articulo 4, inciso e) de la ley 2341 de Procedimiento Administrativo, instituye que: "*... en la relación de los particulares con la Administración Pública, se presume el principio de buena fe. La confianza, la cooperación y la lealtad en la actuación de los servidores públicos y de los ciudadanos ...*", por lo que se presume la buena fe de los administrados respecto a las solicitudes de registro y la declaración jurada respecto a la originalidad de la obra.

**POR TANTO**

El Director de Derecho de Autor y Derechos Conexos sin ingresar en mayores consideraciones de orden legal, en ejercicio de las atribuciones conferidas

**RESUELVE:**

**INSCRIBIR** en el Registro de Tesis, Proyectos de Grado, Monografías y Otras Similares de la Dirección de Derecho de Autor y Derechos Conexos, el Proyecto de Grado titulado: **"ESTUDIO BASICO PARA LA EXTRACCION DE FLAVONOIDES DEL CALIZ DE CHILTO (PHYSALIS PERUVIANA)"**, a favor de la autora y titular: **LIDUVINIA STEINHA STRAUSS ALVAREZ** con **C.I. Nº 6823074 LP**, quedando amparado su derecho conforme a Ley, salvando el mejor derecho que terceras personas pudieren demostrar.

Registrese, Comuníquese y Archívese.

Abg. Carlos Alberto Soruco Arroyo
**DIRECTOR DE DERECHO DE AUTOR**
**Y DERECHOS CONEXOS**
**SERVICIO NACIONAL DE PROPIEDAD INTELECTUAL**

CASA/mnct
c.c.Arch.

V°B°
Mario Cuery Ossa Tarqui
SENAPI

"2023 AÑO DE LA JUVENTUD HACIA EL BICENTENARIO"

Oficina Central - La Paz
Av. Montes, N° 515, entre Esq. Uruguay y C. Batallón Illimani.
Telfs.: 2195700 - 2195276 2195253 Fax: 2195700

Oficina - Santa Cruz
Av. Uruguay, Calle prolongación Quijarro, N° 29, Edif. Bicentenario.
Telfs.: 3127152 - 72062936

Oficina - Cochabamba
Calle Bolívar, N° 737, entre 16 de Julio y Antezana.
Telfs.: 4244603 - 72062957

Oficina - El Alto
Av. Juan Pablo II, N° 2560
Edif. Multicentro El Ceibo
1Eda. Piso 2, Of. 58,
zona 16 de Julio.
Telfs.: 2842001 - 72062629

Oficina - Chuquisaca
Calle Kilómetro 7, N° 366
casi esq. Urriolagoitia,
zona Parque Bolívar.
Telf.: 72005873

Oficina - Tarija
Av. La Paz, entre
Calles Ciro Trigo y Avaroa
Edif. Santa Clara, N° 243.
Telf.: 72015286

Oficina - Oruro
Calle 6 de Octubre,
N° 5833, entre Ayacucho
y Junín, Galería Central,
Of. 14 (Ex Banco Fie).
Telf.: 67201288

Oficina - Potosí
Av. Villazón entre calles
Wenceslao Alba y San Alberto,
Edif. AM. Salinas N° 242,
Primer Piso, Of. 17.

www.senapi.gob.bo

LIDUVINIA STEINHA STRAUSS ALVAREZ
steinha.lidu@gmail.com
69756327