

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



“EFECTO INHIBITORIO DE LA SAPONINA DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) EN LA FLORA FÚNGICA NATURAL E INDUCIDA DE *Penicillium digitatum* EN NARANJAS (*Citrus sinensis*)”

TESIS

PRESENTADA POR:

GLEDY MABEL ARANIBAR TITO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PROMOCIÓN 2012 - II

PUNO – PERÚ

2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

“EFECTO INHIBITORIO DE LA SAPONINA DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.)
EN LA FLORA FÚNGICA NATURAL E INDUCIDA DE *Penicillium digitatum* EN
NARANJAS (*Citrus sinensis*)”

TESIS

PRESENTADA POR:

GLEDY MABEL ARANIBAR TITO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 27 DE ABRIL DE 2017

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:



PRESIDENTE

:
Ph. D. Juan Marcos ARO ARO

PRIMER MIEMBRO

:
Ing. Mg.Sc. Florentino Víctor CHOQUEHUANCA CÁCERES

SEGUNDO MIEMBRO

:
Ing. Mg.Sc. Marienela CALSÍN CUTIMBO

DIRECTOR DE TESIS

:
Ing. Saïre Roenfi GUERRA LIMA

PUNO – PERÚ

2017

Área : Ingeniería y tecnología.

Tema : Desarrollo de procesos y productos agroindustriales, sostenibles y eficientes.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y mi amor a los seres más maravillosos, mis queridos padres: Federico y Cresencia que con mucho amor y sabiduría supieron inculcarme valores, motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Gledy Mabel

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco a Dios por darme la luz para continuar, por fortalecerme en momentos de debilidad y permitirme seguir adelante con mis metas personales y profesionales.
- A la Universidad Nacional del Altiplano Puno, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por la formación profesional.
- A la plana docente de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial por los conocimientos impartidos a lo largo de mi formación profesional.
- A las autoridades de las Facultades en las que realice algunas pruebas de mi investigación: Facultad de Ingeniería Química - “Laboratorio de Análisis de Agua” a cargo del Ing. Juan Ramón Calsín Turpo y Facultad de Veterinaria y Zootecnia - “Laboratorio de Microbiología” a cargo del Dr. Oscar Oros Butrón.
- Agradezco a mis queridos padres Federico y Cresencia, por su amor, esfuerzo, sacrificio y paciencia.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	16
2.1. QUINUA (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.).....	16
2.1.1. Partes del grano de quinua.....	17
2.1.2. Caracterización del grano de quinua	18
2.2. SAPONINA.....	19
2.2.1. Estructura de las saponinas.....	21
2.2.2. Métodos de desaponificación de la quinua	23
2.2.3. Determinación de saponina	24
2.3. NARANJA (<i>Citrus sinensis</i>)	26
2.4. <i>Penicillium</i>	27
2.4.1. <i>Penicillium digitatum</i>	29
2.4.2. Características morfológicas.....	29
2.4.3. Habitación o medio de crecimiento.....	30
2.5. MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	31
2.5.1. Método de difusión en agar.....	31
2.5.2. Método de dilución en medio de cultivo y en agar	32

2.6. RECUBRIMIENTOS PARA NARANJAS.....	33
2.6.1. Recubrimiento comestible	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	36
3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL	36
3.2.1. Materia prima.....	36
3.2.2. Material general de laboratorio	37
3.2.3. Reactivos y aditivos	37
3.2.4. Medio de cultivo.....	38
3.2.5. Otros materiales	38
3.3. MÉTODO DE ANÁLISIS	39
3.3.1. Determinación del contenido de saponina por espectrofotometría UV-VIS	39
3.3.2. Aislamiento e identificación de las cepas de <i>Penicillium digitatum</i> ..	40
3.3.3. Prueba de difusión en agar de cuatro concentraciones de saponina	41
3.3.4. Evaluación del porcentaje de inhibición.....	42
3.3.5. Elaboración del recubrimiento	42
3.3.6. Evaluación del índice de daño.....	42

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	44
3.4.1. Evaluación del efecto inhibitorio de la saponina	44
3.4.2. Evaluación de la capacidad inhibitoria de los recubrimientos con saponina.....	45
3.4.3. Diseño de investigación.....	47
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1. Determinación del contenido de saponina por espectrofotometría UV-VIS	49
4.2. Evaluación del efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de saponina para inhibir el crecimiento de <i>Penicillium digitatum</i>	51
4.3. Evaluación de la aplicación de los recubrimientos con saponinas.....	54
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Partes del grano de quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.).....	17
Figura 2: Aspecto de los penicilios.....	28
Figura 3: Diagrama esquemático de <i>Penicillium</i>	29
Figura 4: Diagrama de flujo para la obtención del halo de inhibición.	44
Figura 5: Diagrama de flujo para el análisis microbiológico de las naranjas.....	46
<i>Figura 6: Índice de daño en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C frente a <i>Penicillium digitatum</i> de cepa aislada....</i>	<i>55</i>
Figura 7: Índice de daño en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C frente a <i>Penicillium digitatum</i> de cepa codificada.	57
<i>Figura 8: Firmeza en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C frente a <i>Penicillium digitatum</i> de cepa aislada.</i>	<i>58</i>
Figura 9: Firmeza en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C frente a <i>Penicillium digitatum</i> de cepa codificada.	59
Figura 10: Desarrollo de <i>Penicillium digitatum</i> de cepa aislada en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C.....	61
Figura 11: Desarrollo de <i>Penicillium digitatum</i> de cepa codificada en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Saponinas de quinua.....	20
Tabla 2. Temperatura y actividad de agua para el crecimiento de especies de Penicillium.....	31
Tabla 3. Concentraciones de saponina en muestras de quinua, a partir de la curva de calibración de concentración versus absorbancia.....	49

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

%	: Porcentaje.
°C	: Grados Celsius.
ATCC	: American Type Culture Collection.
C ₄ H ₆ O ₃	: Anhídrido acético.
CLSI	: Clinical & Laboratory Standards Institute.
CMB	: Concentración mínima bactericida.
CMC	: Carboximetilcelulosa.
CMI	: Concentración mínima inhibitoria.
DCA	: Diseño Completo al Azar.
g	: Gramo.
h	: Horas.
H ₂ SO ₄	: Ácido Sulfúrico.
HR	: Humedad relativa.
ID	: Índice de daño.
LB	: Reactivo de Lieberman-Burchard.

min	: Minutos.
mJ/Kg	: Milijoule/kilogramo.
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
nm	: Nanómetros.
PDA	: Potato Agar Dextrose.
ppm	: Partes por millon.
QP	: Químicamente puro.
rpm	: Revoluciones por minuto.
s	: Segundos.
T°	: Temperatura.
λ	: Longitud de onda.
λ_{max}	: Longitud de onda de la máxima absorción.
$\mu\text{g/ml}$: Microgramos por mililitro.
μl	: Microlitros.

RESUMEN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) es un cultivo andino que en los últimos 15 años tomo una gran importancia comercial. Uno de los inconvenientes es la presencia de un factor antinutricional conocida como saponina. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto inhibitorio de la saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) aplicado sobre *Penicillium digitatum* de cepa aislada y cepa codificada, y su posterior evaluación de la capacidad inhibitoria de *Penicillium digitatum*, en la formulación de recubrimientos. El efecto inhibitorio se realizó por el método de disco difusión a cuatro concentraciones de polvillo de quinua: 25 %, 50 %, 75 % y 100 % con tres repeticiones por concentración. Para la evaluación de la capacidad inhibitoria se formularon recubrimientos con cuatro concentraciones de polvillo de quinua: 25 %, 50 %, 75 % y 100 %; con tres repeticiones por concentración, los resultados demuestran que la saponina de quinua no inhibe el crecimiento micelial del hongo *Penicillium digitatum* de cepa aislada como de cepa codificada. El diseño estadístico con nivel de significancia del 5 % demostró que existe diferencia significativa entre la saponina de quinua y el control positivo de inhibición (Tiabendazol), por otro lado se demostró que no existe diferencia significativa en cuanto al deterioro de las naranjas con recubrimientos de saponina. Por lo tanto, se concluye que la saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) no es un inhibidor del hongo *Penicillium digitatum*.

Palabras clave: Quinoa, saponina, inhibición, *Penicillium digitatum*, naranja.

INTRODUCCIÓN

La quinua fue considerada como una planta de limitado potencial agronómico y comercial por el bajo rendimiento. No obstante, el área sembrada con quinua ha aumentado a un promedio anual de 34 % desde 1979. Al ser la quinua, una planta típica de la zona andina, presenta una mayor distribución, en cuanto a diversidad de formas de genotipos y progenitores silvestres, en la actualidad tiene una distribución a nivel mundial (Mujica *et al.*, 2001)

La principal aplicación de la quinua es como alimento, principalmente por el alto valor proteico de sus granos (Koziol, 1992). Uno de los inconvenientes es la presencia de un factor antinutricional que es la saponina (Monje & Raffaillac, 2009), una sustancia de sabor amargo localizada principalmente en el epispermo del grano, que deben ser eliminadas antes del consumo humano (Lescano, 1994). Para su eliminación, las empresas procesadoras de quinua, han desarrollado tres procesos para la eliminación total o parcial de este compuesto: el primero es basado en la fricción entre granos por acción mecánica (escarificado) obteniéndose un polvo rico en saponinas denominado “polvillo”. El segundo es un proceso de lavado con agua para eliminar el epispermo restante. Y el tercero es la combinación de los procesos mencionado anteriormente (mixto). El rendimiento del “polvillo” es de alrededor de 4.5 % respecto al grano, por los que cada año generan toneladas de estos residuos (León, 2003; Mujica, 2006).

Las saponinas se constituyen en una familia de compuestos de gran interés para la industria, particularmente la saponina de quinua ha mostrado un efecto

inhibitorio de hongos, como *Botrytis cinérea* (Stuardo & San Martín, 2008). La atención de muchas investigaciones se ha centrado en la diosgenina sin embargo sus precursores, las saponinas, por sí mismos son compuestos que pueden tener un gran interés biotecnológico, ya que están involucrados en la defensa de las plantas contra microorganismos, especialmente hongos (Osbourn, 1996).

En la postcosecha de cítricos las principales enfermedades son causadas por los hongos patógenos *Penicillium digitatum* (podredumbre verde) y *Penicillium italicum* (podredumbre azul) (Brito *et al.*, 2012), los cuales presentan mayor incidencia, llegando a producir cerca de 80 % de las pérdidas postcosecha en cítricos. La infección del fruto tiene lugar a través de heridas o micro heridas producidas en la corteza, antes, durante o después de la cosecha, lo que da como resultado infecciones irreversibles en un espacio de tiempo de 48 h a 20 – 25 °C (Ochoa *et al.*, 2007); por tal razón, el presente trabajo de investigación mantiene su enfoque de estudio; en el empleo de saponina como antifúngico, para que posteriormente sea empleado en investigaciones relacionadas a este estudio. Para materializar la presente investigación, se planteó los siguientes objetivos:

- Evaluar el efecto inhibitorio de cuatro concentraciones de saponina en *Penicillium digitatum* proveniente de flora natural y *Penicillium digitatum* de cepa codificada.
- Evaluar la capacidad inhibitoria de recubrimientos a cuatro concentraciones de saponina de quinua en *Penicillium digitatum*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.)

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) se constituye un cultivo nativo de mucha importancia para la alimentación en la zona andina, es necesario la investigación desde el punto de vista agroindustrial para realizar el uso adecuado de sus enormes potencialidades, a través de una transformación industrial que permita valorar verdaderamente estos productos (Mujica, 2006).

La quinua es un grano alimenticio, su contenido proteico varía desde un 12% hasta un 20% en algunas variedades, con una composición balanceada de aminoácidos similar a la caseína (proteína de la leche animal), vitaminas y minerales esenciales (calcio, magnesio, zinc y hierro), así como polifenoles y fibra dietética (IICA, 2015). Los granos de quinua tienen un nivel promedio de 14.6 % valor mucho mayor a los valores de otros cereales como la avena, arroz, cebada, ricos en aminoácidos esenciales como la histidina y lisina (Koziol, 1992). En general, si se hace una comparación entre la composición de nutrientes de la quinua frente a los del trigo, arroz y maíz; se puede corroborar que los valores promedios que reportan para la quinua, son superiores a los tres cereales en cuanto al contenido de proteína, grasa y ceniza (Rojas *et al.*, 2010).

Por otro lado Ahamed *et al.*, 1998; acotaron que el nivel promedio de lípidos está en 5,6 %, rico en ácidos grasos esenciales como el ácido linoleico. Por otro lado estudios realizados en el Perú al determinar el contenido de ácidos grasos encontraron que el mayor porcentaje de ácidos grasos presentes en este aceite, es

el Omega 6 (ácido linoleico), siendo de 50.24 % para quinua y el contenido de almidón varía de 58.1 a 64.2 % (FAO, 2011). Además de algunos minerales como el calcio, fósforo, hierro, potasio, magnesio, fósforo, zinc, manganeso y pequeñas cantidades de cobre y litio (Llorente, 2008).

2.1.1. Partes del grano de quinua

Los granos de quinua tienen formas diferentes: cónicos, cilíndricos y elipsoidales, tamaños por debajo de 2.6 mm de diámetro, y pueden ser de diferente color: blanco, amarillo, rosado, café, negro. En la Figura 1, se puede identificar el endospermo (cotiledones y radícula), la perisperma (granos de almidón) y el epispermo (capa externa que envuelve la semilla) que forman parte de este grano alimenticio (Miranda, 2010).

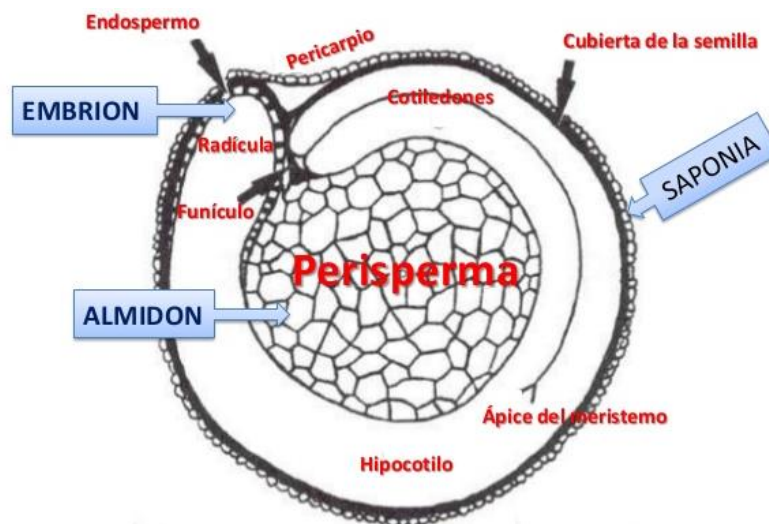


Figura 1: Partes del grano de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.).

Fuente: Flores, 2013

Villacorta & Talavera, (1976); Jiménez *et al.*, (2013); FAO, (2011); afirman que según algunos estudios, el epispermo tiene las siguientes características:

- Una primera capa o capa externa es de superficie rugosa, quebradiza, seca; la cual determina el olor de la semilla. Esta capa puede ser parcialmente removida por métodos abrasivos y lavado con agua fría, mejorándose la remoción considerablemente cuando se utiliza agua caliente o soluciones alcalinas o acidas. Las saponinas se encuentran localizadas solamente en la primera capa del epispermo.
- Una segunda capa lisa, lustrosa, sin poros, con algunas huellas de la rugosidad vista en la primera membrana. Esta capa solo puede ser removida después de un proceso de calentamiento (cocción) prolongado.
- Una tercera capa delgada ligeramente amarillenta y opaca.
- Una cuarta capa delgada, traslucida que cubre el embrión, formada por una sola hilera de células de pared gruesa y sin núcleo.

2.1.2. Caracterización del grano de quinua

La quinua presenta un embrión que es mucho más grande que de otros cereales y de ahí probablemente su mayor contenido de aminoácidos. El endospermo es menor y es así que los almidones de la quinua se encuentran en la perisperma de la semilla; a diferencia de los cereales comunes el contenido de la quinua (64.5 %) es ligeramente inferior al del trigo (70.1 %), pero debe tenerse en cuenta algunas características del grano de la quinua, tales como:

- El grano de quinua almacena almidones en el perisperma a diferencia de otros cereales que lo hacen en endospermo.
- El pericarpio de la quinua es de naturaleza celulósica, impermeable al agua. La presencia del glucósido llamado saponina tiene la función de hidrolizar las células y hacerlas permeables (Lescano, 1994; Quiroga & Escalera, 2010).

2.2. SAPONINA

La saponina es un glucósido triterpenoide o esteroide que exhibe ciertas características propias que sirven para su identificación y caracterización entre ellas la formación de espuma en soluciones acuosas, produce hemolisis de glóbulos rojos, alta toxicidad para peces y anfibios y formación de compuestos moleculares con colesterol y otros hidroesteroides; no todas las saponinas poseen necesariamente todas estas características, sino depende de las especies (Gestetner *et al.*, 1971; Quiroga & Escalera, 2010).

Las saponinas son glucósidos en los cuales varias unidades de monosacáridos que se enlazan mediante un enlace glicosídico a un resto denominado aglicón o sapogenina. El aglicón es de naturaleza triterpénica. Se clasifican de acuerdo al número de cadenas de azúcar en la estructura como mono, di o tridesmosídicos. Las saponinas monodesmosídicas tienen una cadena de azúcar simple, normalmente localizada en el C-3. Las saponinas bidesmosídicas tienen dos cadenas de azúcar, una de ellas enlazada generalmente al C-3 a través de un enlace éter y la otra enlazada al C-18 o al C-26 a través de un enlace éster. Los monosacáridos más comunes son la D-glucosa, D-galactosa, D-ácido

glucorónico, D-ácido galacturónico, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa y D-fructosa. Son cuatro los aglicones que han sido identificados en las saponinas de quinua: ácido oleonólico, ácido fitolacagénico, hederagenina, algunos autores indican el ácido serjánico como el cuarto aglicón y otros el ácido espergulagénico. (Ahamed *et al.*, 1998; Madl *et al.*, 2006).

Las saponinas presentes en el grano de quinua son básicamente del tipo triterpenoide. Se encuentran en la membrana externa del grano, conocida como pericarpio. Por su toxicidad, protegen a la planta contra aves e insectos y son las causantes del sabor amargo del grano (Ma *et al.*, 1989). Se han reportado la existencia diferentes tipos de saponinas presentes en granos de quinua como se muestra en la Tabla 1 (Ridout, 1991).

Tabla 1. Saponinas de quinua

Saponina	Radical 1	Radical 2
Ácido oleonólico-D-Glucopiranososa	CH ₃	CH ₃
Ácido fitolacagénico-D-Glucopiranososa	COOCH ₃	CH ₂ OH
Hederagenina-D-Glucopiranososa	CH ₃	CH ₂ OH

Fuente: (Ridout, 1991; Pastor, 2013).

La fórmula química de las saponinas no están bien definidas, pero la mayoría se ajustan a la fórmula general $C_nH_{2n-8}O_{10}$ puede presentar un esqueleto de tipo triterpénico o de tipo esteroidal, teniendo como propiedad la de una abundante espuma en soluciones acuosas y que son también solubles en alcohol absoluto y otros solventes orgánicos (Arana & Quillay, 2016). Un grupo de glucósidos que están ubicados en las plantas y que al disolverse en agua disminuyen la tensión

superficial de esta, por lo tanto al agitar sus soluciones, se formará una espuma abundante y relativamente estable (Borda & Gamarra, 2002; Karlson, 2012).

2.2.1. Estructura de las saponinas

Las saponinas son compuestos glicosídicos, poseen una estructura que contiene dos partes: glicona y aglicona. La parte glicona está compuesta por azúcares sencillos de uno a cinco unidades; mientras que la parte aglicona, conocida como sapogenina, consta de un esqueleto del tipo esteroideal (27 carbonos) o triterpenoide (30 carbonos) (Dini *et al.*, 2001).

Estos compuestos se clasifican según su estructura en dos tipos:

- Saponinas triterpenoides: ampliamente distribuidas en el reino vegetal, presentes predominantemente en dicotiledóneas, poseen un esqueleto formado por la unión de seis unidades de isopreno, las estructuras pentacíclicas son más abundantes y conocidas que las tetracíclicas (Torres, 2011).
- Saponinas esteroidales: menos distribuidas en la naturaleza, presentes predominantemente en monocotiledóneas, poseen una estructura tetracíclica derivada del ciclopentano fenantreno, son empleadas como materia prima para la síntesis de hormonas sexuales (Dini *et al.*, 2001).

El contenido de la saponina varía entre 0 – 3 % en granos secos, aunque se han reportado variedades con contenidos de saponina de hasta 4 % en granos muy

amargos se clasifican entre 1 y 3 %, granos de contenido medio entre 0.1 y 1 % y variedades dulces de 0 a 0.1 % (Gluglú & Mazza, 2007).

La presencia de este factor anti nutricional ha conducido a la producción genética de variedades dulces, con contenidos de 0 a 0.12 % de saponinas, este último, el nivel más alto aceptable para el consumo humano de la quinua (Zavaleta, 1993; IBNORCA, 2007). Sin embargo, se ha constatado que estas variedades dulces se encuentran carentes de factores de protección contra microorganismos, insectos y aves, es muy difícil mantener su pureza varietal y brindan, en general, rendimientos bajos, de granos pequeños. A causa de esto, la atención al tratamiento agroindustrial de variedades amargas es más importante que la selección de nuevas variedades dulces, desde los años 1980 (Nieto & Valdivia, 2009; Rojas *et al.*, 2009).

Debido a la presencia de un aglicón liposoluble y una cadena de azúcar hidrosoluble en su estructura (naturaleza anfifílica), las saponinas son compuestos con superficie activa con propiedades detergentes, humectantes, emulsificantes y espumantes. Las propiedades fisicoquímica y biológica de las saponinas han sido ampliamente explotadas en un número de aplicaciones comerciales en el sector de alimentos, cosméticos, agrícola y farmacéutico (Ahamed *et al.*, 1998). Si bien a las saponinas aún se las considera factores antinutricionales, hay evidencias científicas de sus beneficios sobre la salud por sus propiedades anticancerígenas y de reducción del colesterol.

2.2.2. Métodos de desaponificación de la quinua

A) Por métodos húmedos

Consiste en humedecer y remojar los granos, luego se procede a frotar con las manos sobre una superficie dura y rugosa (batán), hasta remover las capas externas del grano donde se encuentra la saponina, se continúa lavando el grano con las manos hasta por seis a ocho veces, hasta que ya no salga espuma, cambiando el agua constantemente, finalmente se enjuaga dos a tres veces, hasta que el grano quede completamente sin saponina, luego se extiende al sol para que seque, teniendo la precaución de que el grano no germine, una vez completamente seco es almacenado y está lista para su utilización (León, 2003; Mujica, 2006).

B) Por métodos secos

Para dicho proceso, se emplean máquinas escarificadoras (peladoras en seco), la cual elimina la saponina presente en el grano de quinua de forma superficial, este método es más económico y práctico, porque no requiere mayor tratamiento previo; sin embargo su desventaja es que no logra eliminar completamente toda la saponina del grano; si se pule más el grano, esta operación puede desprender el embrión y hacer que se pierda la proteína que está concentrada en el embrión y la grasa de la capa superior del grano, los cuales se podrían eliminar juntamente con el polvillo que contiene la saponina (León, 2003; Mujica, 2006).

C) Por métodos mixtos

Es el método más recomendable para eliminar las saponinas del grano de quinua, primero para ello se escarifica ligeramente la quinua, eliminando el mayor porcentaje de saponina, por un periodo adecuado (1 kg en 12 s), luego se lava brevemente durante ocho min para eliminar el remanente de saponina y se escurre durante diez min, seguidamente, con un ligero enjuague al grano, sin exponer excesivamente a la humedad se procede al secado (Mujica, 2006).

2.2.3. Determinación de saponina

Tenemos los siguientes métodos:

A) Método de la espuma

Método físico basado en su propiedad tensoactiva, que consiste en disolver en agua y agitar las saponinas hasta obtener una espuma estable, cuya altura está correlacionada con el contenido de saponinas en los granos (Koziol, 1991).

B) Método químico

Consiste en extraer la saponina mediante diferentes procedimientos:

- a) Granos sin lavar, desmenuzados, se tratan con alcohol potable y el extracto se purifica con agua y éter. Extracción de saponinas con cloroformo y evaporación del medio ambiente.
- b) Granos sin lavar, desmenuzados, tratados con alcohol de 70 %, purificados con agua, éter de petróleo y alcohol absoluto (Mamani, 1995).

C) Método cromatográfico

Se extrae con agua, filtrando y centrifugando dos muestras de quinua dulce y dos de quinua amarga. El filtrado se aplica sobre placas de sílica gel como solvente se usó una mezcla de cloroformo, metanol, ácido acético y agua, en proporciones de 50:7:3 ml respectivamente. Para revelar se usa ácido sulfúrico, que da coloraciones diferentes según el tipo de glucósidos (Mamani, 1995).

D) Método espectrofotométrico

La espectrofotometría permite, de forma general la cuantificación de algunos grupos de metabolitos a partir de algunas reacciones que permiten la determinación sin interferencia de algunos grupos. Este es el caso en el cual se determinan las saponinas totales presentes en la quinua (Bonifaz, 2010).

La razón por la cual la técnica espectrofotométrica se ha convertido en un método popular en la cuantificación de saponinas a partir de materiales de la planta podría ser debido a que es simple, rápido y barato de operar. Las saponinas totales también conocidas como ensayo de ácido sulfúrico-vainillina, es el método espectrofotométrico con mayor frecuencia seleccionada en la cuantificación de saponinas vegetales. Sin embargo algunos factores, como la selección de los patrones, la longitud de onda, y otros deben ser considerados antes de utilizar este método. El principio básico de este método es la reacción de saponinas triterpenoide oxidados con vainillina (aldehído vanilínico). El ácido sulfúrico se utiliza como oxidante y el color distintivo de esta reacción es de color y, a veces se utiliza ácido perclórico. Debido a las diferencias en la selección de los reactivos, las condiciones

para permitir el desarrollo completo del color, el patrón, y la longitud de onda de las investigaciones, es difícil comparar los resultados en términos de rendimientos. Sin embargo, proporciona una buena referencia para el diseño experimental futuro (Cheek *et al.*, 2014).

2.3. NARANJA (*Citrus sinensis*)

La naranja Valencia se caracteriza por ser una naranja dulce tardía, se consume en fresco y se utiliza en la agroindustria en los principales países citrícolas en el mundo. Su fruto es de tamaño medio a grande esférico o ligeramente alargado es de color intenso algo pálido de corteza espesa pero fina (Hernández, 2014).

La naranja “valencia” es la más adecuada para almacenamiento; en general, las naranjas se mantienen mejor en el árbol que cosechadas. El enceramamiento y la temperatura alta afectan la composición interna de gases y la conservación (Gonzalo & Salaya, 2004). Tienen un tamaño medio a grande, esférico o ligeramente alargado, de color intenso algo pálido y de corteza espesa pero fina, aunque a veces es algo granulosa. Contiene un elevado contenido de zumo con una acidez relativamente elevada de aroma excelente y sabor ligeramente ácido lo que lo hace apto para la industrialización, posee pocas semillas, el árbol se puede mantener en buenas condiciones durante varios meses, si bien con el aumento de las temperaturas tiende a reverdecer (Agustí, 2003).

2.4. *Penicillium*

Los penicilios son mohos comunes que se desarrollan sobre los más diversos substratos: granos, paja, cueros, frutas, etc. (Frisvad, 1981). La importancia de estos mohos en la alimentación humana y animal se debe a que, además de causar deterioro, producen toxinas (Carrillo, 2003).

Es un hongo de crecimiento rápido dando colonias blancas aterciopeladas inicialmente, las cuales se cubren con las esporas y van tomando diferentes colores según la especie; al final quedan completamente cubiertas de esporo con un aspecto pulverulento. El verticilo es fundamental en la clasificación del hongo, así pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: monoverticillata, asimétrica, bivericillata asimétrica y polivericillata (Arias & Piñeros, 2008).

Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. En la Figura 2, se esquematizan los tipos de conidióforos del género *Penicillium*, cuyas ramificaciones se ubican formando verticilos. Si hay sólo un verticilo de fiálides el pincel es monoverticilado. En la Figura 3, se observan las ramificaciones de un pincel polivericilado el cual se divide esquemáticamente en ramas, rámulas, métulas y fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada. Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los

conidios permitiendo la formación de cadenas, y en algunas especies se aprecia claramente con el microscopio óptico (Carrillo 2003).

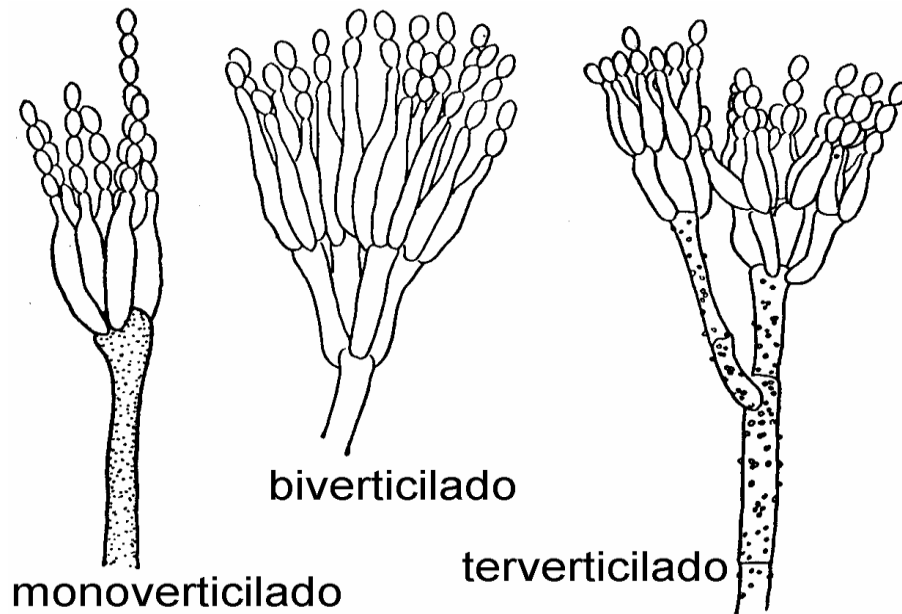


Figura 2: Aspecto de los penicilios.

Fuente: Carrillo, (2003).

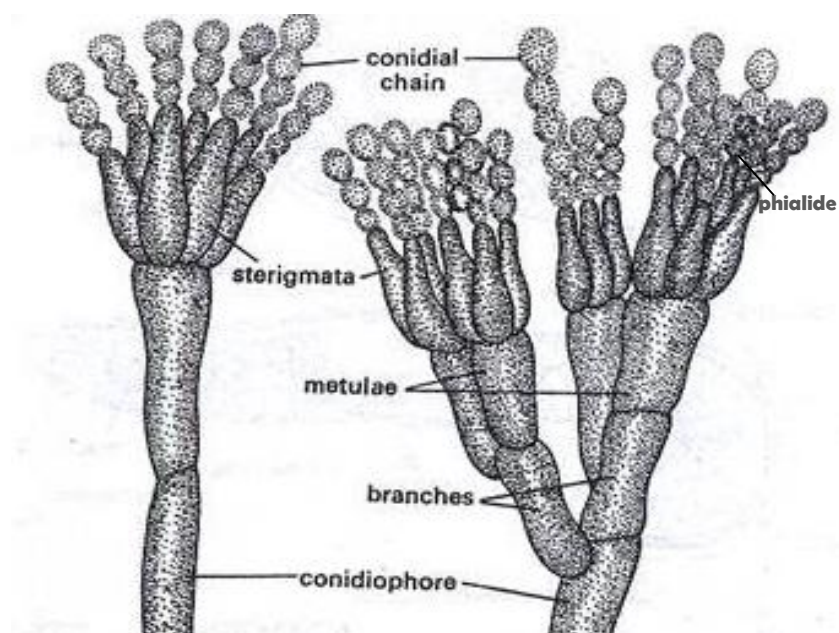


Figura 3: Diagrama esquemático de *Penicillium*

Fuente: Puraji, (2014)

2.4.1. *Penicillium digitatum*

Este género se coloca en la división Deuteromycota si los conidióforos y conidios son los únicos orgánulos reproductores presentes pero se ubican con los ascomicetos cuando se forman cleistotecias con ascosporas, como *Talaromyces* o *Eupenicillium*. De los dos estados teleomórficos (ICMSF, 1998).

2.4.2. Características morfológicas

Forma colonias de aspecto aterciopelado y color oliváceo pálido. Los conidióforos, cortos y lisos con muy pocas fialides, portan conidios lisos, pudiendo ser de subglosas a cilíndricas, la mayor parte de las ocasiones son elípticas; miden

3.4 ~ 12 μm por 3 ~ 8 μm . Se encuentra principalmente en cítricos, plantas hortícolas en almacén (Díaz & Vila, 1990).

En el caso de los frutos cítricos, la infección por hongos fitopatógenos es una de las principales causas de pérdidas durante su pos cosecha, estimándose entre un 3 % y un 6 % del producto manejado en las centrales hortofrutícolas. Los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, formadores de conidios color amarillo a verde y causantes de la podredumbre verde y azul de frutos cítricos, respectivamente, son los que presentan mayor incidencia, pudiendo llegar a producir el 80 % de las infecciones pos cosecha de cítricos (Yousef & Carlstrom, 2006; Tuset, 1987).

2.4.3. Habitad o medio de crecimiento

Ambiente, temperatura y actividad de agua

Los penicilios crecen sobre los alimentos preparados o sus materias primas, ya sean de origen vegetal o animal, si hallan la actividad del agua y los nutrientes necesarios, como se muestra en la Tabla 2 (Carrillo, 2003). La temperatura óptima de crecimiento se encuentra dentro del rango 22 – 30 °C y el pH óptimo es de 5.6, pero también se observa crecimiento en el rango de 2.0 - 9.0 (Huerta, 2014).

Tabla 2. Temperatura y actividad de agua para el crecimiento de especies de *Penicillium*.

ESPECIES	TEMPERATURA (°C)		ACTIVIDAD DE AGUA	
	RANGO	OPTIMO	MINIMA	OPTIMA
<i>P. aurantiogriseum</i>	-2 - 32	23	0.81 – 0.83	0.98
<i>P. brevicompactum</i>	12 – 30	23	0.80 – 0.82	0.99
<i>P. citrinum</i>	<5 – 37	26 – 30	0.80 – 0.84	
<i>P. commune</i>	0 – 37	25	0.5	
<i>P. digitatum</i>	6 – 37	20 – 25	0.90	0.99
<i>P. expansum</i>	-3 - 35	25 – 26	0.82 – 0.83	0.99
<i>P. islandicum</i>	10 – 42	31	0.83 – 0.86	
<i>P. roqueforti</i>	<5 – 35	25	0.83	0.99
<i>P. verrucosum</i>	0 – 31	20	0.80	

Fuente: Carrillo, 2003; Huerta, 2014

2.5. MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los métodos actualmente utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos son:

2.5.1. Método de difusión en agar

El método consiste en aplicar una cantidad determinada del extracto en estudio, en un disco de papel que se coloca sobre la superficie de la placa donde se ha distribuido el inóculo con el microorganismo sobre el que se quiere ver el poder antimicrobiano. Por gradiente de concentración, el extracto se relaciona con el tamaño del halo de inhibición, los microorganismos se clasifican: no sensibles, donde el diámetro es menor a ocho mm ($d < 8$ mm); sensibles, donde el diámetro esta entre el rango de 9 mm – 14 mm ($9 \text{ mm} < d < 14 \text{ mm}$); muy sensibles, donde el

diámetro esta entre el rango de 14 mm – 19 mm ($14 \text{ mm} < d < 19 \text{ mm}$) y extremadamente sensibles cuando el diámetro es mayor a 20 mm ($d > 20 \text{ mm}$) (Burt, 2004). Por otro lado para Sacsquispe & Velásquez, 2002; los valores de las concentraciones y de los diámetros críticos que delimitan las categorías sensible (S), intermedio (I) y resistente (R).

- S: existe evidencia de que la curación clínica o un efecto antimicrobiano significativo es muy probable si se administra el antibiótico a las dosis “recomendados” para la entidad clínica en cuestión.
- I: existe evidencia de que la curación clínica o un efecto antimicrobiano significativo es muy probable si se administran dosis máximas, pero aun tolerables, del antibiótico para la entidad clínica en cuestión o el antibiótico se administra de una forma “especial”.
- R: existe evidencia de que el fracaso terapéutico o la ausencia de efecto antimicrobiano es muy probable, incluso administrando las dosis máximas tolerables del antibiótico (Martínez, 2011).

2.5.2. Método de dilución en medio de cultivo y en agar

El extracto se incorpora al medio con agar cuando aún esta líquido. Para lograr el rango de dilución deseado se preparan una serie de placas con diferentes Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) así como Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMB).

A) Concentración Mínima Inhibitoria CMI:

Se define CMI como la menor concentración de antibiótico, que en un período de 18 - 24 h de incubación, es capaz de inhibir o reducir hasta en un 90 % el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes), lo cual es equivalente a la inhibición de crecimiento de 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo. La determinación de la CIM puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o E-test (marca comercial) (Burt, 2004; Taroco *et al.*, 2007; Paredes & Roca, 2004).

B) Concentración Mínima Bactericida CMB:

Se define CMB como la mínima concentración de extracto que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de reducir una población bacteriana in vitro previamente estandarizada, hasta en un 99.9 % (Taroco *et al.*, 2007). Si se usan medios líquidos, el procedimiento es el mismo, solo que se usan medios líquidos y tubos de ensayo para las diferentes diluciones. Ambos métodos permiten obtener datos cuantitativos (Burt, 2004).

Por otro lado Paredes y Roca (2004), afirman que la CMB es la menor concentración capaz de destruir o matar 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18 – 24 h de incubación.

2.6. RECUBRIMIENTOS PARA NARANJAS

Se define como el revestimiento de un producto vegetal con una o varias capas finas de material polimérico natural y comestible (Ancos *et al.*, 2015). Según

la FDA de EEUU, los recubrimientos comestibles son aquellos formados a partir de formulaciones que contengan aditivos permitidos para su uso alimentario (Pastor, 2010). Así mismo Falguera (2011), define como una matriz continua, delgada, que se estructura alrededor del alimento generalmente mediante la inmersión del mismo en una solución formadora del recubrimiento, dichas soluciones pueden estar formadas por un polisacárido, un compuesto de naturaleza proteica o por una mezcla de los mismos.

Actualmente existen dos tipos fundamentales de recubrimientos de frutas, los llamados ceras y recubrimientos comestibles.

2.6.1. Recubrimiento comestible

Un recubrimiento comestible (RC) se puede definir como una matriz transparente continua, comestible y delgada, que se estructura alrededor de un alimento generalmente mediante la inmersión del mismo en una solución formadora del recubrimiento con el fin de preservar su calidad y servir de empaque (Del Valle *et al.*, 2005). Formulados a base de polisacáridos, proteínas y otras combinaciones, en ocasiones también con ceras de abejas. La aplicación de recubrimientos comestibles a las frutas crea una barrera semipermeable a gases y al vapor de agua, lo que permite en control respiratorio y deshidratación de los productos recubiertos, retrasan el envejecimiento, mejoran la calidad y valor comercial de los mismos revelando así, un papel significativo en la vida de anaquel de las frutas (Vargas *et al.*, 2007). Además, estos permiten la incorporación de aditivos alimentarios (agentes antimicrobianos, antioxidantes, sales minerales, etc.) que

permiten retardar el pardeamiento enzimático, la aparición de desórdenes fisiológicos como el escaldado superficial, el crecimiento microbiano, la pérdida de textura, etc.

Las formulaciones a base de recubrimientos comestibles, a diferencia de las ceras, no necesitan generalmente el uso de reactores de presión, pudiéndose fabricar incluso a escala de laboratorio (Gómez, 2011).

- Almidón.- el almidón está principalmente constituido por moléculas de amilopectina y amilosa. Los almidones con un alto porcentaje en amilosa como el de la papa y maíz, forman películas más estables, mientras que el proveniente de yuca (tapioca) produce películas más flexibles y con baja permeabilidad al agua (Ancos *et al.*, 2015).
- Lípidos.- están formados por compuestos hidrofóbicos no poliméricos con buenas propiedades de barrera para la humedad, pero con poca capacidad para formar películas. Reducen la transportación, la deshidratación, la abrasión en la manipulación posterior y puede mejorar el brillo y el sabor. Generalmente son ceras (carnauba, abeja), ácidos grasos y monoglicéridos (glicerol).
- Celulosa.- La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza. Está constituido por cadenas lineales de glucosa unidas con enlaces β -1,4. Para reducir su solubilidad en agua, la celulosa es tratada químicamente dando lugar a distintos derivados que son los que realmente se utilizan para la formación de recubrimientos como la metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropil metilcelulosa (Ancos *et al.*, 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Control de Calidad de Aguas de la Facultad de Ingeniería Química. Los análisis microbiológicos se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia y los análisis de postcosecha se realizaron en el laboratorio de Postcosecha de la Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, todos estos laboratorios pertenecientes a la Universidad Nacional del Altiplano, Puno.

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1. Materia prima

A) polvillo de Quinoa.- Las muestras de polvillo o residuos de escarificado utilizado para los tratamientos, fue adquirido de la planta procesadora de Quinoa Andean Walley- Bolivia. El cual es resultado del escarificado de la Quinoa Blanca.

B) Cepas microbiológicas.- La cepa codificada activa en agar (PDA) de *Penicillium digitatum* ATCC 36038 fue obtenida del Instituto Oswaldo Fiocruz – Rio de Janeiro – Brasil.

C) Naranjas.- Las naranjas empleadas en la investigación fueron de variedad Valencia procedente de la Provincia de Sandia – Puno.

3.2.2. Material general de laboratorio

- El material de vidrio utilizado en todos los análisis fue de calidad PYREX o similar.
- Refrigeradora – DAEWO.
- Balanzas de precisión de marca METTLER TOLEDO modelo AB 204, FR-330 Japón, Capacidad de 0.0001 a 310 g. y HIGHLAND HCB 602H, capacidad 0.001 g a 600 g.
- Estufas de las marcas MEMMERT Universal, 30 – 120 °C, modelo TV-40. Y LMN tipo LP5 – 402.
- Autoclave modelo LS-BSOL-II, volumen 50 L.
- Espectrofotómetro UV marca BIOTECH, rango longitud de onda 190 - 1100 nm.
- Mechero bunsen.
- Microscópio marca MICROS AUSTRIA, modelo MCX51.
- Micropipeta marca BOECO, volumen variable de 0,5 - 10 µL.
- Para filtrar se empleó papel Whatman 125 mm.
- Centrífuga marca BOSCO modelo XC-2000.
- Vórtex marca THERMO SCIENTIFIC modelo M37610-33.
- Tamizador marca W.S. TYLER.
- Penetrómetro marca BROOKFIELD.

3.2.3. Reactivos y aditivos

- Ácido Sulfúrico al 38 % - Químicamente puro.

- Anhídrido acético (MERCK).
- Metanol (SIGMA ALDRICH).
- Diosgenina (SIGMA ALDRICH).
- Solución salina.
- Azul de metileno.
- Tween 20 - SIGMA ALDRICH.
- Antifúngico comercial Tiabendazol.
- El agua destilada empleada en la preparación de las soluciones fue agua para inyección – MEDIFARMA.
- Almidón de Maíz - ROYAL INGREDIENTS / HOLANDA.
- Glicerina - JEBSEN & JESSEN / ALEMANIA.
- Carboximetilcelulosa (MERCK).

3.2.4. Medio de cultivo

- Potato Agar Dextrosa (PDA) - MERCK.
- Mueller Hilton - SIGMA ALDRICH.

3.2.5. Otros materiales

- Papel aluminio.
- Papel kraft.
- Bolsas de polietileno.
- Caja isotérmica (tecnopor).
- Cinta aislante.
- Jeringas (1 ml, 3 ml, 5 ml y 10 ml).

3.3. MÉTODO DE ANÁLISIS

3.3.1. Determinación del contenido de saponina por espectrofotometría UV-VIS

A) Curva de calibración

Para determinar de contenido de saponina se siguió la metodología establecida por Monje & Raffaillac, 2009; en el cual se hizo uso del reactivo de Lieberman-Burchard (LB) para formar productos coloridos al reaccionar con saponinas. El reactivo LB consiste en una mezcla al 16.7 % de anhídrido acético en ácido sulfúrico químicamente puro (QP).

Se elaboró la curva de calibración, Absorbancia vs. Concentración, utilizando como muestra patrón Diosgenina. Se preparó 11 soluciones empleando Metanol (MeOH) a diferentes concentraciones. Se agito en una centrifuga a 3500 rpm por 15 min (Anexo 8, fotografías 1 - 3).

Para esta curva se empleó soluciones con las siguientes concentraciones: 0.05; 0.075; 0.1; 0.125; 0.15; 0.175; 0.2; 0.225; 0.25; 0.275; 0.3 mg/ml; la relación solución y reactivo LB es de 1:3.5 respectivamente, se agitó por 20 s en un vórtex y se dejó en reposo 30 min, debido a que en este tiempo el color es estable y permanente. Finalmente se determinó la longitud de onda de la máxima absorción (λ_{\max}) que fue a 407 nm.

A partir del método propuesto para la cuantificación, se procedió a elaborar la curva de calibración, obteniéndose como resultado un coeficiente de correlación de $R^2= 0,9961$ y la siguiente ecuación:

$$\text{Saponina} = (\text{Absorbancia} + 0.0025) / 0.5256 \dots \dots \dots (1)$$

B) Análisis de muestras

El trabajo se inició con la recolección de “mojuelo” de quinua Blanca Real, estas muestras se tamizaron para eliminar posibles impurezas como granos partidos piedras, etc. y así obtener partículas más finas (polvillo).

Se pesó 1 g de polvillo de quinua y se mezcló con 9 ml de metanol. Se supo la solución en la centrifuga a 3500 rpm por 15 min y se dejó en reposo (maceración) durante 72 h.

Se realiza una mezcla de 1 ml del macerado con 3,5 ml del reactivo LB y se deja en reposo durante 30 min antes de la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 407 nm. Se debe tener cuidado al momento de mezclar el reactivo color con la muestra, ya que esta reacción es exotérmica.

3.3.2. Aislamiento e identificación de las cepas de *Penicillium digitatum*

a) Preparación de la cepa de *Penicillium digitatum* codificada

Cepa codificada ATCC 36038: *Penicillium digitatum* fue obtenido del banco de cepas del Instituto Oswaldo Fiocruz – Brasil. La cepa activa fue reactivada en agar Mueller Hilton y conservada en refrigeración, para la parte experimental se reactivó en agar Potato Dextrosa (PDA). La concentración de esporas fue ajustada a 1×10^5 usando la escala de Mc Farland y se incubaron a 25 °C durante siete días (Anexo 8, fotografías 5, 6).

b) Aislamiento de la cepa natural de *Penicillium digitatum*

Para obtener las cepas de *Penicillium digitatum*, se empleó la metodología de aislamiento de microorganismos a partir del tejido infectado planteada por Mondino, (2012).

Con un asa kolly se obtuvo esporas de la superficie de naranjas con presencia de hongos, y se sembró en placas de PDA (Potato Dextrosa Agar). Se incubaron a 25 °C durante siete días. A partir de las placas sembradas con previo crecimiento después de siete días se realizó la identificación del microorganismo *Penicillium digitatum*. Se tomó los cuerpos fructíferos del hongo, se colocó en un portaobjetos y se dio coloración con azul de metileno (ICMSF, 2006). A continuación se pasó a la observación en el microscopio (Anexo 8, fotografías 7 - 12).

Una vez confirmado las cepas se hicieron réplicas para purificar el hongo.

b) Conformación de banco de cepas

Las cepas se conservaron en placas de PDA almacenadas a 4 °C, durante el estudio se mantuvieron su viabilidad y pureza.

3.3.3. Prueba de difusión en agar de cuatro concentraciones de saponina

La evaluación de la inhibición de crecimiento de *Penicillium digitatum* se realizó mediante el método de difusión en agar con la metodología propuesta por Viuda *et al.*, (2008) en el cual se inocula discos con saponina a diferentes concentración en el medio de cultivo PDA.

Se preparó soluciones a diferentes concentraciones de polvillo de quinua con 0.935 mg/ml de pureza de saponina, según la metodología del CLSI, (2008). Se tomaron cuatro concentraciones en relación al porcentaje de polvillo: 12,8 mg/ml (100 %); 9,6 mg/ml (75 %); 6,4 mg/ml (50 %) y 3,2 mg/ml (25 %). Posteriormente estas fueron inoculadas en discos.

3.3.4. Evaluación del porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la ecuación 2, teniendo como referencia la medición del diámetro de la zona de inhibición del control positivo y la medición del halo de los extractos testeados (Corzo, 2012).

$$\% \text{ Inhibicion} = \frac{\varnothing \text{ Halo extracto} - \varnothing \text{ Halo blanco}}{\varnothing \text{ Halo control positivo} - \varnothing \text{ blanco}} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

3.3.5. Elaboración del recubrimiento

Para la elaboración de los recubrimientos se utilizó la metodología de Tongdeesoontorn *et al.*, (2011). Donde se mezcla almidón (3.5 g), CMC (1.5 g), glicerina (1.5 g) y agua destilada (100 ml). La mezcla fue llevada a una temperatura de 80 °C y en constante agitación hasta formar una consistencia viscosa.

3.3.6. Evaluación del índice de daño

Posteriormente se evaluó el índice de daño utilizando una escala hedónica para cada daño teniendo en cuenta el rango de 0 a 4 para la valoración (donde 0 = índice de daño nulo y 4 = índice de daño severo) (López, 2012). Se utilizaron las siguientes ecuaciones:

El síntoma de daño (SD) se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Indice de cada SD} = \frac{\text{Nivel de daño} \times \text{Número de frutas en el nivel dañado}}{\text{\#Total de frutas evaluadas}} \dots\dots\dots (3)$$

Se calculó el índice de daño (ID) mediante la siguiente ecuación:

$$ID = \frac{\sum \text{Indice de cada sintoma de daño}}{2} \dots\dots\dots (4)$$

Los daños considerados son dos: firmeza y presencia de hongos.

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.4.1. Evaluación del efecto inhibitorio de la saponina

Se probaron los extractos de polvillo de quinua con 0.935 mg/ml de pureza de saponina en *Penicillium digitatum* de cepa aislada y de cepa codificada, empleándose el método de disco difusión como se muestra en la Figura 4.

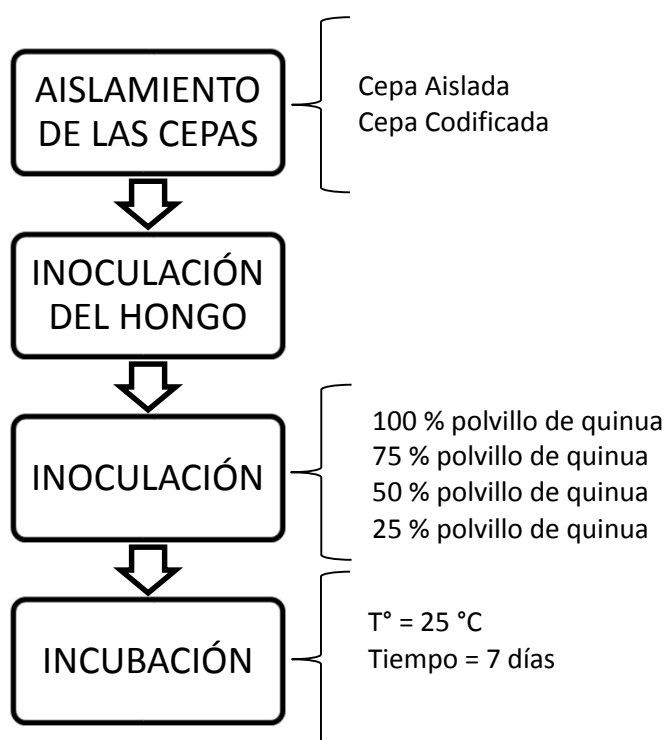


Figura 4: Diagrama de flujo para la obtención del halo de inhibición.

Descripción del proceso

- Aislamiento de las cepas: las cepas fueron aisladas de naranjas.
- Inoculación del hongo: en placas Petri se inocularon 200 μ L de *Penicillium digitatum*, tanto de la cepa codificada y la cepa aislada, la concentración de

esporas se ajustó a 1×10^5 usando la escala Mc Farland tomado de hongos de siete días de crecimiento.

- Inoculación de los discos difusión: fueron inoculados con 30 μ L de solución de saponina a cuatro concentraciones: 2.80 mg/ml (100 %); 2.10 mg/ml (75 %); 1.40 mg/ml (50 %) y 0.7 mg/ml (25 %); se tuvieron el antifúngico Tiabendazol y diosgenina como control.
- Incubación: se incubaron a 25 °C por siete días. Cada tratamiento o concentración se realizó por triplicado. (Anexo 8, fotografías 14 - 17).

3.4.2. Evaluación de la capacidad inhibitoria de los recubrimientos con saponina

Para evaluar la capacidad inhibitoria de los recubrimientos, las naranjas fueron recubiertas con las diferentes concentraciones del recubrimiento y posteriormente se aplicó el hongo *Penicillium digitatum* en la superficie de la naranja. Tal como se especifica en la Figura 5.

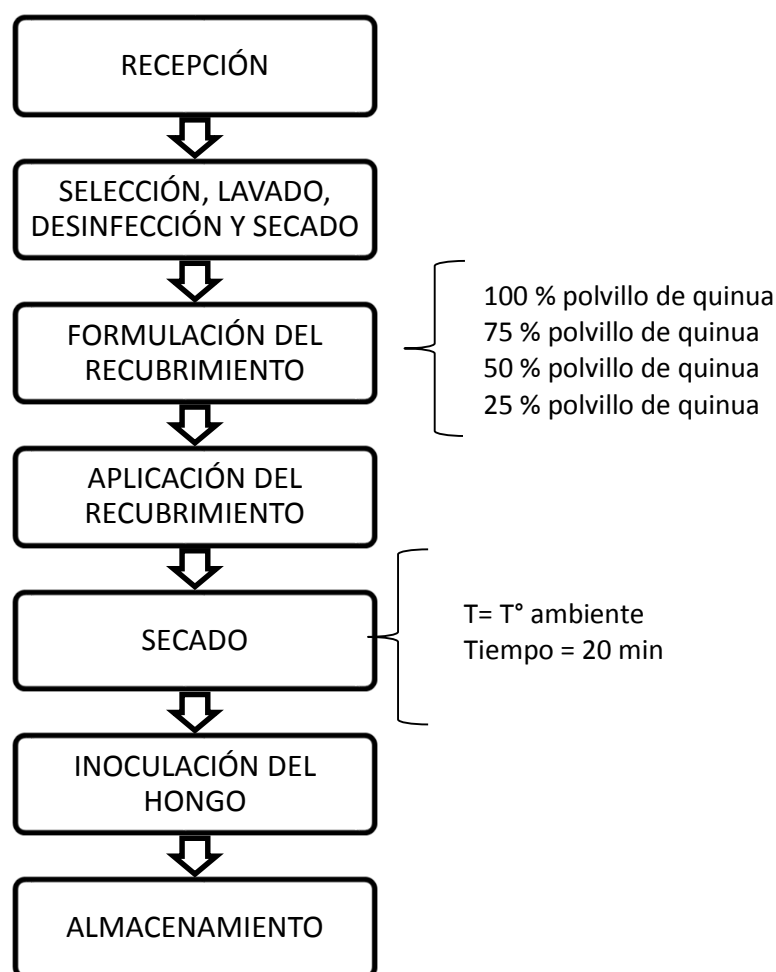


Figura 5: Diagrama de flujo para el análisis microbiológico de las naranjas.

Descripción del proceso de obtención del recubrimiento comestible elaborado

- Recepción: Se utilizó naranjas de la variedad valencia procedentes de la provincia de Sandía – Puno.
- Selección, lavado, desinfección y secado: Las naranjas fueron seleccionadas por tamaño, lavadas y desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio a 200 ppm durante 30 s.

- Formulación del recubrimiento: Se formuló el recubrimiento base de cuatro concentraciones de polvillo de 1.5 g (100 %); 1.13 g (75 %); 0.75 g (50 %) y 0.37 g (25 %) con 0.935 mg/ml de pureza de saponina; 1.5 g (CMC).
- Para la aplicación del recubrimiento, las naranjas fueron sumergidas durante tres minutos en cada formulación.
- El proceso de secado de las naranjas con recubrimiento fue a temperatura ambiente durante 20 min.
- Inoculación del hongo: se realizaron tres incisiones en la zona ecuatorial de la naranjas, y se sembraron 10 μ L de la suspensión en cada incisión lo cual equivale a 10^5 esporas /mL según la escala Mc Farland.
- Finalmente fueron almacenados a una temperatura de 25 °C por 2 semanas. Y posteriormente se evaluó el índice de daño, presencia de hongos y la firmeza.

3.4.3. Diseño de investigación

En todos los análisis se empleó un diseño completamente al azar (DCA) de 5x5x3. Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza (ANVA) y las medias comparadas con la prueba de Tukey con una significancia de 0.05 usando el software STATGRAPHICS CENTURION versión XVI.

a) Factores de estudio:

- Concentraciones del polvillo de quinua.
- Tiempo.

b) Variables de respuesta:

- Tamaño del halo de inhibición (mm).
- Índice de daño (ID).
- Presencia de hongos (escala hedónica de 0 - 4).
- Firmeza (mJ/g).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SAPONINA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

Para determinar el porcentaje de saponina en el polvillo de quinua, se usó la diosgenina como patrón debido a que es la sapogenina esterooidal más importante para la síntesis parcial de esteroides. Representando aproximadamente el 5 % del peso total de la molécula de saponina, como lo establece Baccou *et al.*, (1997).

Se trabajó con metanol debido a la notable coloración que se produce durante la reacción entre las sapogeninas y el reactivo Lieberman - Burchard. Así mismo Pérez y Quitián, (2009) aseveran que los mejores rendimientos de extracción de las saponinas se consiguen realizando la operación con mezclas de metanol y un tiempo de dos horas.

La concentración de saponina se expresó como diosgenina, ya que este fue el patrón empleado para la cuantificación. Para determinar el contenido de diosgenina en el polvillo de quinua se tomó una muestra polvillo tamizado de Quinua Real y se hizo tres repeticiones (Anexo 8, fotografía 4), la absorbancia obtenida fue de 0.489 a una longitud de onda de 407 nm, como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de saponina en muestras de quinua, a partir de la curva de calibración de concentración versus absorbancia.

MUESTRA	λ_{\max} (nm)	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN (mg/ml)
n*	407	0,489±0,008	0,935±0,015

*n=3

Los valores de absorbancia obtenidos fueron reemplazados en la ecuación (1), a partir de la cual se determinó la concentración de saponina de cada muestra. Se determinó que de las tres repeticiones el promedio del contenido de saponina es 0.935 mg/ml, con una desviación estándar de ± 0.015 .

Chong, (1988) cuantificó la diosgenina por el método de hidrolisis por cromatografía y espectrofotometría, demostrando que el porcentaje total es de 1.073 %. Según Baccou *et al.*, (1997) la cantidad de diosgenina fue 5 μ g/ml. Por otro lado Monje & Raffailac, (2009) determinó que el porcentaje de saponina en diferentes variedades de quinua varían desde 0.18 % hasta 5.01 %.

Según Wahli, (1990) y Koziol, (1992) el rango estimado del contenido de saponina es de 0.00 hasta 1.2 %. Tellería *et al.*, (1978) demostraron que las variedades de quinua Sajama (1.7 %) y blanca (1.9 %) presentan menor concentración de saponinas que las variedades amarilla (2.3 %) y colorada (2.8 %).

Monje & Raffailac, (2009) menciona que la longitud de máxima absorción se determina mediante un barrido espectral entre 400 y 600 nm a una velocidad de 1 nm/seg. La máxima absorción obtenida en su investigación fue a una longitud de onda de 528 nm. Este resultado no coincide con nuestra investigación, ya que el pico máximo se formó a 407 nm, pero esta se encuentra dentro del rango espectral mencionado anteriormente.

4.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SAPONINA PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE *Penicillium digitatum*

La metodología de disco difusión demostró que el hongo *Penicillium digitatum* tanto de cepa codificada como cepa aislada es resistente a la saponina (Anexo 8, fotografía 18). En la presente investigación se observa que el polvillo de quinua no generó halo de inhibición, a diferencia del antifúngico Tiabendazol que se empleó como control positivo de inhibición; el cual generó halos de inhibición de 16.7 mm como promedio con una concentración de 12.8 mg/ml. Por otro lado los discos con diosgenina, tampoco generaron halo de inhibición siendo este componente mayoritario (5 %) de la molécula de saponina, lo cual indica que ambas sustancias (polvillo de quinua y diosgenina) no son agentes controladores de *Penicillium digitatum*.

El porcentaje de inhibición se calculó con la ecuación (2), demostrando así que la saponina de quinua no logró inhibir las cepas del hongo *Penicillium digitatum*. Lo anterior sugiere que la especie no tiene potencial antifúngico. Corzo, (2012) afirma que debido a la presencia de algunos metabolitos secundarios como los alcaloides, esteroides, y triterpenos pueden ser los responsables del efecto no inhibitorio. Por otro lado, estudios realizados por Bader *et al.*, (2000) demostró que la actividad antifúngica de las saponinas frente a diferentes cepas de *Candida albicans* puede ser influenciada por la variación de las unidades de carbohidratos enlazados en la aglicona. Demostrando que los compuestos de saponina presentan poca o ninguna actividad antifúngica.

Stuardo & San Martin, (2008) en su investigación “Propiedades antifúngicas de la saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) tratados con álcalis contra *Botrytis cinérea*” concluye que los extractos de quinua sin tratar con álcali mostraron actividad mínima contra el crecimiento del micelio de *B. cinérea*. Además, no se observaron efectos contra la germinación de conidias, incluso a 7 mg saponinas/ml. Sin embargo, cuando los extractos de saponina fueron tratados con álcali, el crecimiento del micelio y la germinación de los conidios fueron inhibidas de manera significativa. A dosis de 5 mg/ml, se observó 100 % de inhibición de la germinación de conidias, incluso después de 96 h de incubación. La mayor actividad antifúngica de saponinas alcalinas tratada es probablemente debido a la formación de derivados de saponina más hidrófobos que pueden tener una mayor afinidad con los esteroides presentes en las membranas celulares. Por lo cual confrontando esta investigación con la de Stuardo & San Martin, (2008) se dedujo que la saponina con sus propios compuestos no tiene efecto inhibitorio sobre algunas familias de hongos como es el caso del *Penicillium digitatum*.

Los resultados mostrados en este trabajo, efecto inhibitorio de la saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en la flora fúngica natural e inducida de *Penicillium digitatum* en naranjas (*Citrus sinensis*), no coinciden con los resultados reportados previamente en la literatura. Tenorio *et al.*, (2010) donde mencionan que se evaluaron concentraciones de saponina aislada de *Chenopodium quinoa* Willd para disminuir la velocidad de crecimiento de hongos fitopatógenos por el método de dilución en placa. Se demostró que la saponina puede inhibir el crecimiento hasta un 42 % de *Aspergillus flavus*, 35 % de *Ulocladium spp*, y 47 % de *Fusarium* a los

cuatro días iniciales del experimento. Tenorio *et al.*, (2010) concluye que las saponinas pueden considerarse como agentes controladores de hongos fitopatógenos.

Por otro lado Gómez *et al.*, (2009) estudió la actividad antifúngica de saponinas esteroidales de *Discorea* contra hongos fitopatógenos. La actividad antifúngica se evaluó por microdilución en medio líquido, con cuatro cepas de hongos, tres fitopatógenos y un saprofito: *Mucor sp.*, *Fusarium sp.*, *Fusarium moniliforme* y *Trichoderma sp.* respectivamente. Se tuvo una actividad antifúngica de 50 a 200 µg/ml de las dos clases de saponina, siendo la cepa del hongo *F. moniliforme* la más sensible que los otros hongos. Según el mismo autor la diferencia en la resistencia puede estar relacionada a la presencia de saponinas específicas que le permiten al hongo hidrolizar las saponinas e infectar a una especie vegetal determinada.

Cabe resaltar que mencionados autores no trabajaron con el hongo *Penicillium digitatum*, el cual también es considerado como fitopatógeno. Tal como menciona Ochoa *et al.*, (2007) en su investigación en la cual se aisló e identificó hongos fitopatógenos de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) que afectaron la calidad de los frutos durante su almacenamiento, teniendo a los hongos *A. flavus*, *F. oxysporum*, *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. variable* como los principales agentes causales de pudriciones y enfermedades en frutos.

Los resultados obtenidos en este trabajo, están de acuerdo con los hallazgos de Woldemichael y Wink (2001), en el que la fracción de saponina total de

Chenopodium quinoa Willd mostró poca actividad antifúngica contra *Cándida albicans*. Sin embargo, cuando las saponinas de quinua fueron tratados con álcali, su actividad antifúngica contra *B. cinérea* aumentó significativamente. Esto es probablemente debido a la formación de saponinas más hidrófobos que tienen una mayor afinidad con los esteroides presentes en las membranas celulares de los hongos.

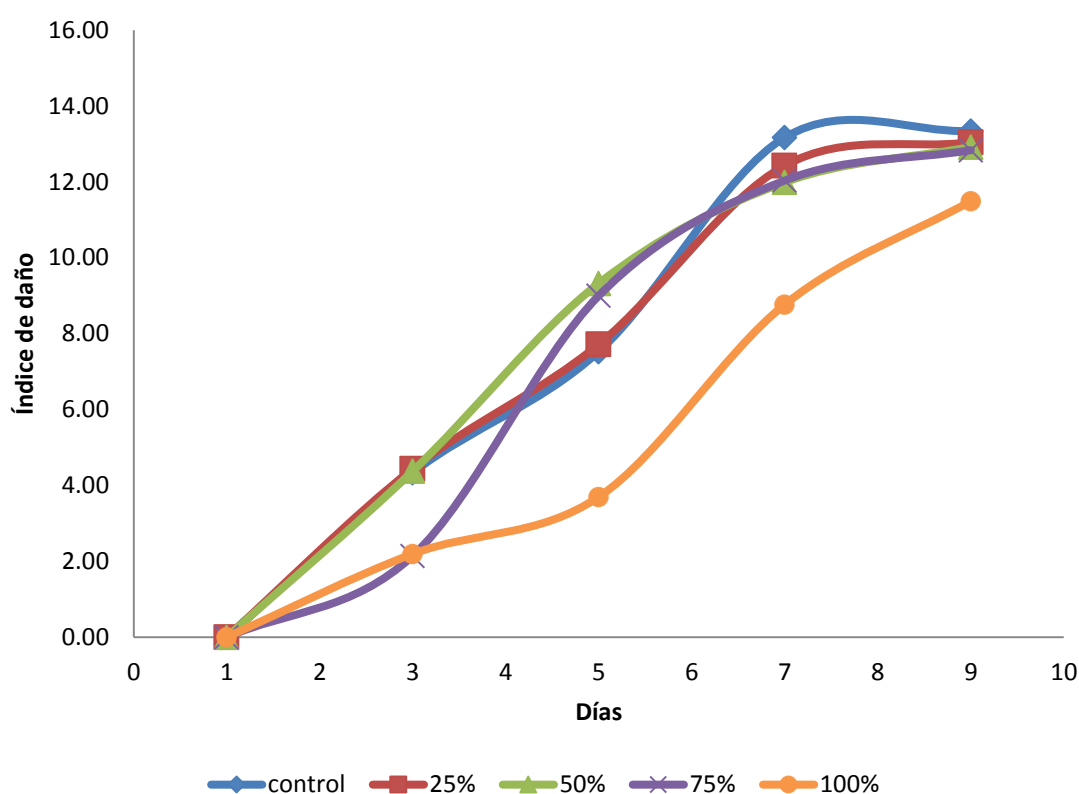
4.3. EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS CON SAPONINAS

En general, la mayoría de las naranjas inoculadas desarrollaron infección tras la primera semana de almacenamiento bajo condiciones óptimas (acondicionamiento en la estufa), se determinaron los valores deseados de las variables de respuesta: índice de daño, firmeza al tacto y presencia de hongos (Anexo 8, fotografía 23); cabe resaltar que esta investigación requiere de quince unidades experimentales (replicas). Los resultados se presentan a continuación:

- **ÍNDICE DE DAÑOS (ID)**

En la Figura 6, se observa la variación del ID de las naranjas control y naranjas tratadas con el recubrimiento durante el tiempo de almacenamiento en donde se trabaja con respecto al *Penicillium digitatum* cepa aislada. Los síntomas de daño en las naranjas, tanto las del control como las evaluadas se observan a partir del tercer día, en el cual las naranjas presentan síntomas de pérdida de firmeza y presencia de hongos.

En el tercer día, el ID en la muestra control fue de 4.34; mientras que las naranjas recubiertas con el tratamiento al 100 % de saponina presentó un índice de daño de 2.20. Al noveno día, la muestra control presentó un ID de 13.34, lo cual indica la pérdida de calidad comercial y afectó la vida útil de la naranja.



*Figura 6: Índice de daño en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C frente a *Penicillium digitatum* de cepa aislada.*

Por otro lado, las naranjas tratadas con recubrimientos de saponina presentaron una tendencia similar a las naranjas control con respecto al deterioro, con la diferencia que los daño aparecieron en menor proporción,

dando más énfasis a las naranjas con tratamiento del 100 % que obtuvo un índice de daño de 11.49 en el noveno día. No obstante todas estas muestras presentan características no comerciales al noveno día de almacenamiento.

Los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo con un nivel de significancia del 5 % afecta significativamente el factor concentración, siendo más predominante entre el tratamiento al 100 % de saponina frente a la muestra control. (Anexo 6, cuadros 1 y 2).

Por otro lado, en la Figura. 7 se observa el índice de daño de naranjas control y tratadas frente al *Penicillium digitatum* cepa codificada. La naranja control que fue inoculada con *Penicillium digitatum* de cepa codificada presentan un ID de 15.48 en el noveno día de almacenamiento, mientras que la naranja con tratamiento al 100 % obtuvo un ID de 10.02. Los resultados correspondientes al análisis cuantitativo con un nivel de significancia del 5 %, indican que existe un grado de significancia entre los tratamientos al 25 % y 100 % de concentración de saponina. (Anexo 6, Cuadros 3 y 4).

Con estos resultados se evidencia que las naranjas control presentaron un temprano y mayor desarrollo de la pérdida de la calidad comercial frente a las naranjas tratadas con recubrimiento de saponina.

Resultados similares se presentaron en naranjas almacenadas en condiciones óptimas de crecimiento para el *Penicillium* (25 °C), como es lógico de una manera rápida y progresiva hacia su deterioro y senescencia. Por otro lado, los resultados reflejan que los recubrimientos a base de

quitosano y especialmente la incorporación de aceite esencial de limón a esta matriz mejoran diferentes aspectos de la calidad postcosecha del fruto siempre y cuando estén a bajas temperaturas de conservación las cuales potencian el efecto del recubrimiento, en especial para un periodo de tiempo determinado (en torno a las ocho semanas). Los recubrimientos a base de quitosano y aceite esencial de limón ofrecen las mejores propiedades para la conservación frigorífica de los frutos. Estos recubrimientos suponen mejoras en diferentes aspectos de calidad como menores pérdidas de peso, % de zumo, firmeza, vitamina C e índice de madurez (Brito *et al*, 2012).

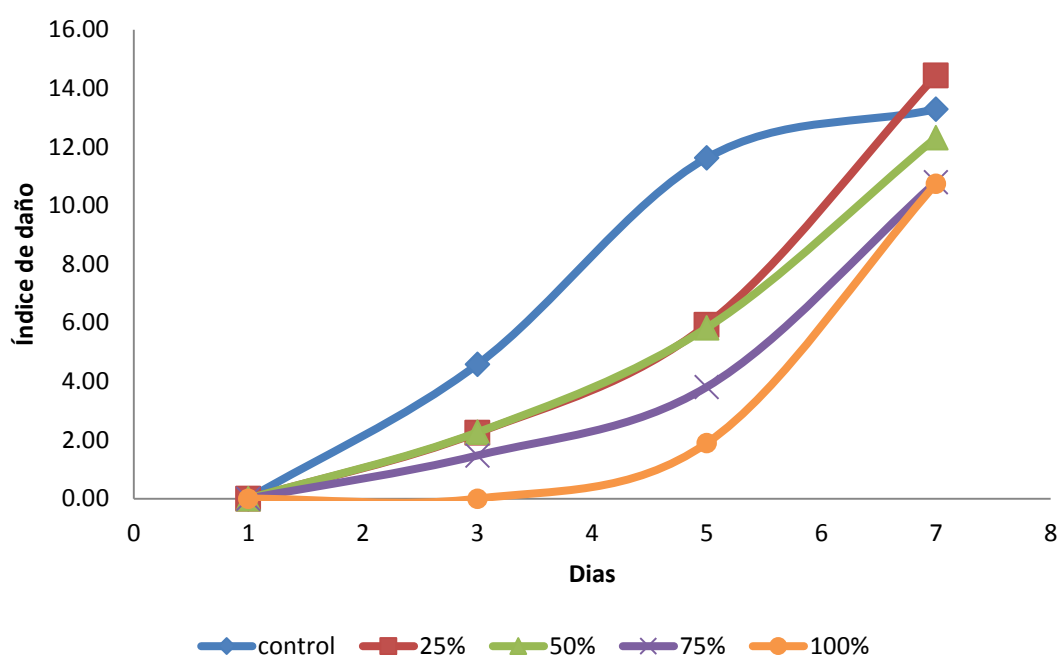


Figura 7: Índice de daño en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C frente a *Penicillium digitatum* de cepa codificada.

- FIRMEZA

Para determinar la firmeza se utilizó un analizador de textura: penetrómetro con una sonda esférica de media pulgada de diámetro, una deformación de 5 mJ y una carga de 10 g a una velocidad de prueba de 10 mm/s.

Los resultados de la Figura 8 y 9, corresponden al análisis cuantitativo con un nivel de significancia del 5 %, donde la aplicación de los recubrimientos de saponina no mantuvo la firmeza de las naranjas en ninguna de sus concentraciones. (Anexo 2, cuadro 1 y 2).

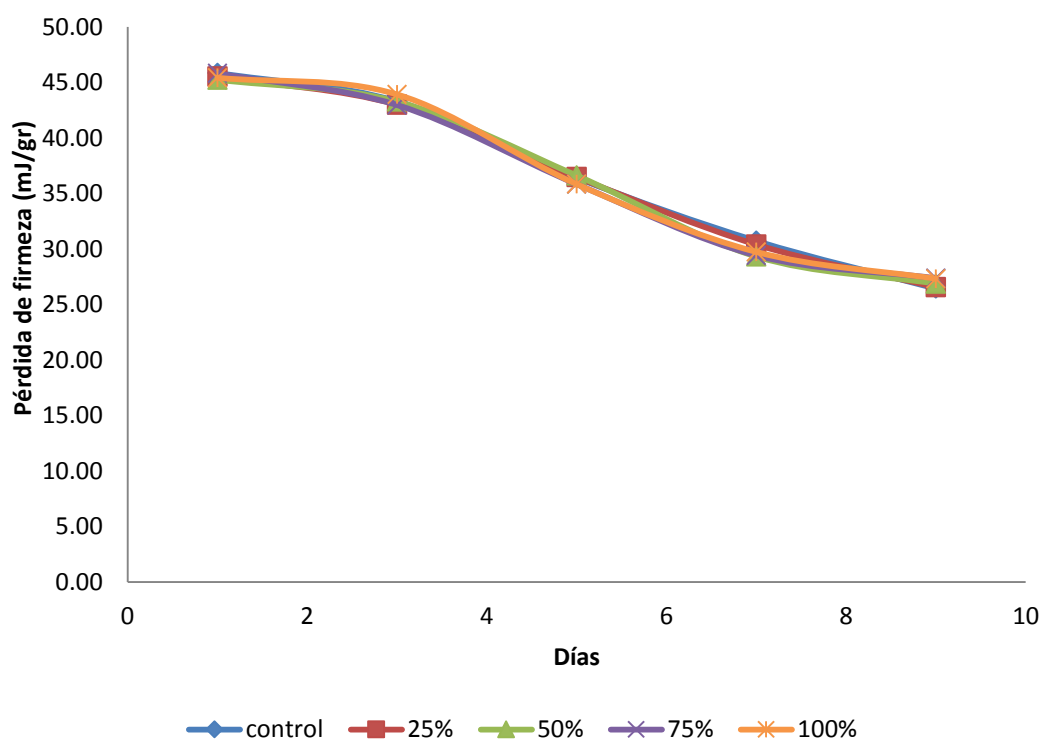


Figura 8: Firmeza en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C frente a *Penicillium digitatum* de cepa aislada.

Las naranjas control y con tratamiento, mostraron una reducción de firmeza durante el almacenamiento. Para las naranjas control en el día cero el valor registrado como promedio fue de 45.31 mJ/g y de 25.98 mJ/g en el día nueve alcanzando un porcentaje de pérdida de firmeza de 5.96 % al final del almacenamiento. Las naranjas tratadas con saponina registraron valores similares a las de la muestra control con valores de textura desde 45.39 mJ/g hasta 45.93 mJ/g en promedio el día cero y de 25.88 mJ/g hasta 26.40 mJ/g en el noveno día.

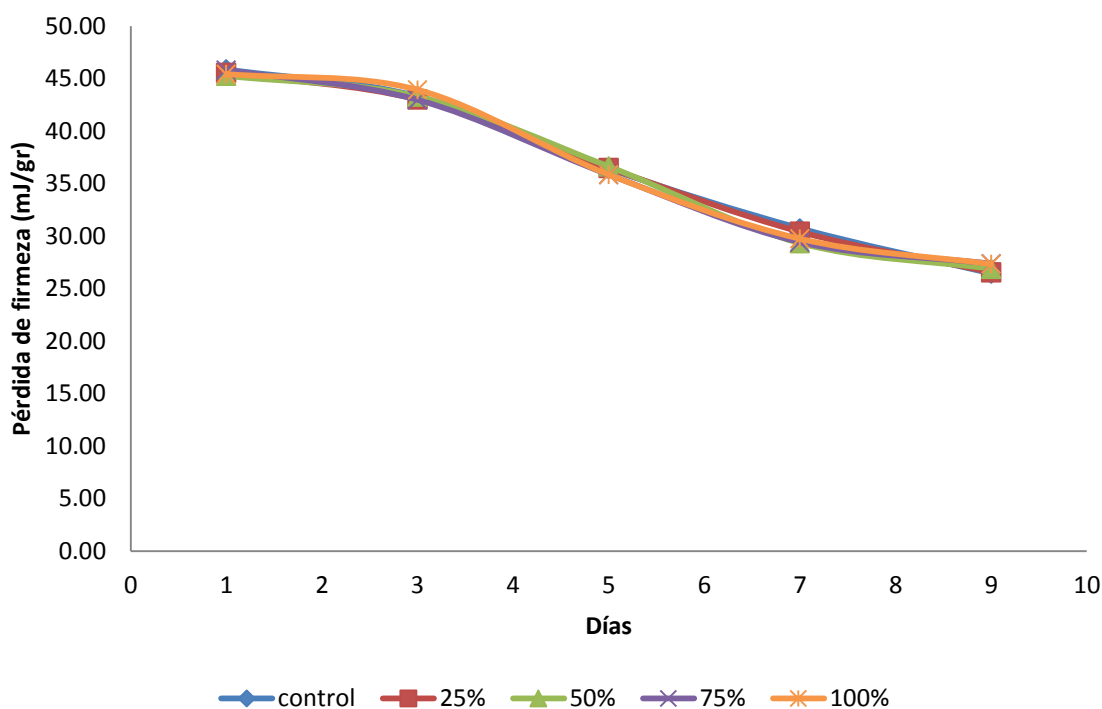


Figura 9: Firmeza en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C frente a *Penicillium digitatum* de cepa codificada.

La diferencia de ambas Figuras 8 y 9 muestran los valores obtenidos de los recubrimientos aplicados tanto en las cepas aislada (Figura 8) como en la cepa codificada (Figura 9) donde ambas permanecen relativamente cercanas durante el periodo de almacenamiento, lo cual indica un porcentaje de 6,6 % de pérdida de firmeza.

Resultados similares se observaron en mandarinas y naranjas a las cuales se les aplicó recubrimientos a base quitosano y goma laca, los cuales redujeron la pérdida de firmeza en un 5 % después de dos semanas de almacenamiento (Monterde *et al*, 2003; Cuquerella & Jávega, 2002).

- PRESENCIA DE HONGOS

Para la evaluación del desarrollo de *Penicillium digitatum* en naranjas, se utilizó cinco recubrimientos: control (0 %), 25 %, 50 %, 75 % y 100 % de concentración de saponina, las muestras tratadas se almacenaron a 25°C. La escala hedónica (Anexo 7).

En general, la mayoría de las naranjas inoculadas con el hongo desarrollaron la infección tras la primera semana de almacenamiento en las condiciones ambientales, debido a que la temperatura y humedad fueron beneficiosas para el crecimiento del hongo, además las naranjas empleadas como materia prima tenían un grado de madurez comercial lo que potencia el desarrollo de la infección del fruto.

Finalmente se determinó que los recubrimientos empleados para reducir el desarrollo de *Penicillium digitatum* de cepa aislada y codificada en naranjas, no presentan diferencia significativa (Nivel de confianza de 95%)

entre ninguno de los tratamientos y la muestra control. (Anexo 4, cuadro 1 y 2).

En la Figura 10, se observa el incremento del crecimiento de las cepas de *Penicillium digitatum* de cepa aislada con respecto del tiempo.

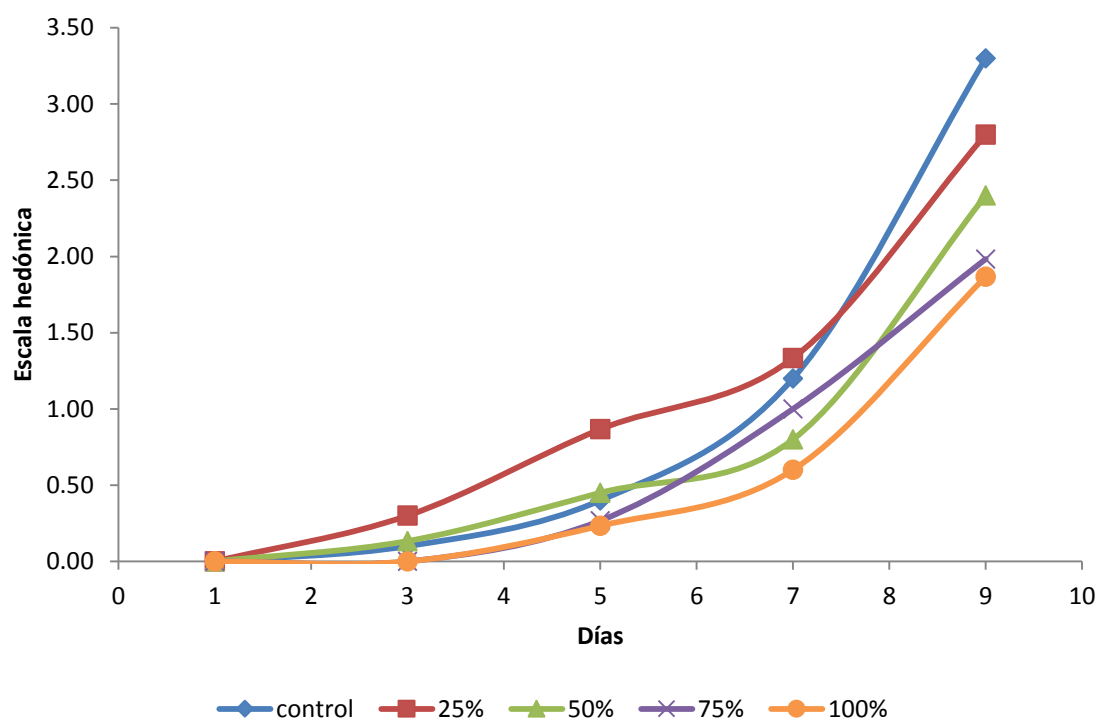


Figura 10: Desarrollo de *Penicillium digitatum* de cepa aislada en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C.

Así mismo se observa en la Figura 11 el incremento de la podredumbre de *Penicillium digitatum* de cepa codificada con respecto del tiempo.

Según el análisis efectuado en naranjas tratadas a diferentes concentraciones de saponina, se encontró que la aplicación de los diferentes recubrimientos no generó un retraso en la aparición de la infección respecto a las muestras control, todas empezaron a mostrar signos de deterioro

fúngico a los cuatro días de almacenamiento. Ninguna de estas reduce significativamente el desarrollo de *Penicillium digitatum* tanto de cepa aislada como codificada, como se observa en las Figuras 10 y 11 con respecto a las naranjas control. Este resultado concuerda con los obtenidos por Valencia *et al.* (2008) donde tampoco se observaron diferencias significativas en el crecimiento del hongo.

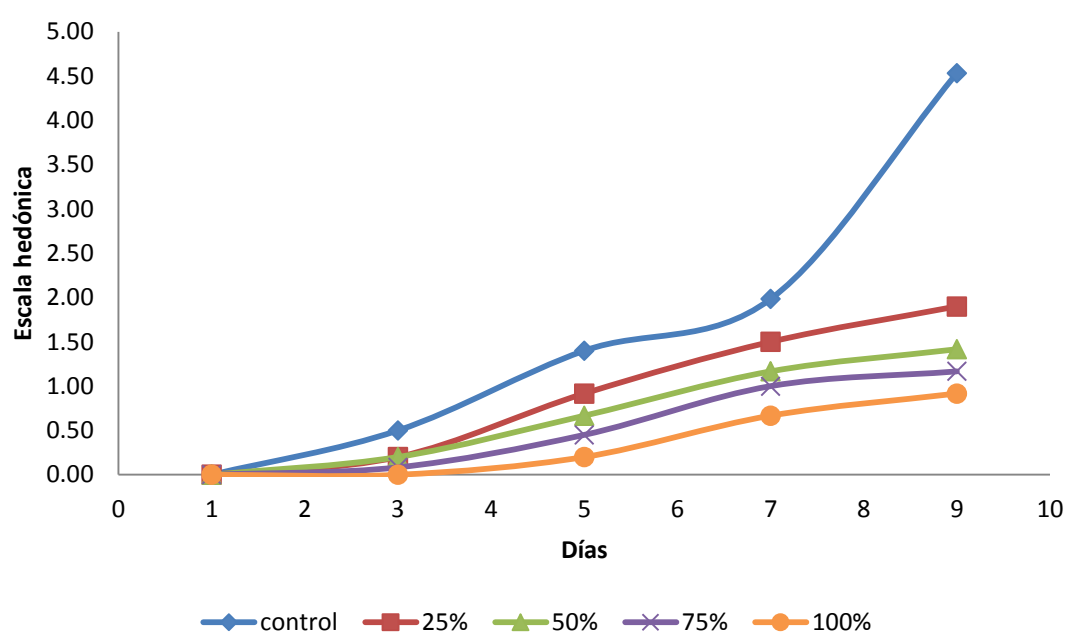


Figura 11: Desarrollo de *Penicillium digitatum* de cepa codificada en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C.

Brito *et al.*, 2012 afirma que la aplicación de recubrimientos a base de quitosano y aceite esencial de limón en el control de *Penicillium italicum* de naranjas el cual muestra poca efectividad en el control de la podredumbre causada por este microorganismo.

CONCLUSIONES

- Las concentraciones de saponina no mostraron inhibición frente al crecimiento del hongo *Penicillium digitatum* tanto de cepa aislada como cepa codificada, como se observan en los resultados obtenidos en la presente investigación, las placas inoculadas a la mayor concentración de polvillo de quinua (12.8 mg/ml) no generaron halo de inhibición; a diferencia del antifúngico Tiabendazol el cual generó un halo de inhibición de 16.7 mm como promedio.
- Los recubrimientos elaborados a base de saponina no mostraron capacidad inhibitoria. Las muestras control de naranja y las muestras con recubrimientos mostraron valores de deterioro significativamente similares en condiciones ambientales de almacenamiento. Al noveno día de almacenamiento, la pérdida de firmeza fue de 6.6 % en las muestras con recubrimiento y las muestras control presentaron 5.96 % de pérdida de firmeza. Finalmente, con estos resultados podemos deducir que, no hay diferencia en el grado de infección proveniente de una cepa aislada o codificada del hongo en estudio ya que el índice de daño fue de 11.49 y 10.02 respectivamente, por lo tanto se concluye que la saponina de quinua no es un inhibidor del hongo *Penicillium digitatum* de cepa aislada como de cepa codificada.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda aislar, purificar y/o concentrar saponina para mejor evaluación de sus componentes.
- Realizar trabajos de investigación con saponina purificada a distintas concentraciones como inhibidor de otros hongos que afectan la calidad de los alimentos.
- Emplear el polvillo de quinua para la inhibición de otros hongos filamentosos.
- Emplear la saponina de quinua como detergente para aprovechar sus propiedades tensoactivas.
- Evaluar la curva de crecimiento de *Penicillium digitatum* para aclarar si la saponina prolonga la fase de latencia del hongo.
- Se recomienda elaborar recubrimientos con saponina, para posteriormente evaluar sus propiedades mecánicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, M. (2003). Citricultura. Universidad Politécnica de Valencia. España. Editorial Mundi-Prensa. 2, 43 - 47
- Ahamed, N.T., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R., & Pal, M. (1998). A lesser-known grain, *Chenopodium quinoa*: Review of the chemical composition of its edible parts. *Food and Nutrition Bulletin*. 19(1), 61 – 70.
- Ancos, B., Gonzales, P.D., Colina, C.C., & Sánchez, M.C. (2015). Uso de películas/recubrimientos comestibles en los productos de IV y V gama. *Revista Iberoamericana de tecnología Postcosecha*. 16(1), 8-17.
- Arana, Y.A. & Quillay, M.A. (2016). Contenido de saponinas y actividad cicatrizante de *Cecropia peltata*, *Parthenium hysterophorus* y *Phylla strigulosa*. Tesis de grado para optar el título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica de Machala.
- Arias, E.L. & Piñeros, P.A. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Tesis de grado para optar el título de Microbiólogas Industriales. Pontificia Universidad Javeriana.
- Baccou, J.C., Lambert, F., & Sauvaire, Y. (1977). Spectrophotometric method for the determination of total steroidal sapogenin. *Analyst*, 102, 458-465.
- Bader, G., Seibold, M., Tintelnot, K., & Hiller, K. (2000). Cytotoxicity of triterpenoid saponins – part 2: relationships between the structures of glycosides of

- polygalacic acid and their activities against pathogenic *Candida* species. *Die Pharmazie*. 55, 72 - 74
- Bonifaz, L. (2010). Determinación de la actividad insecticida de la saponina de quinua (*Chenopodium quinoa*) hidrolizada y no hidrolizada sobre *Drosophila melanogaster*. Tesis de grado para optar el título de Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Borda, W., & Gamarra, W. (2002). Diseño y Construcción de un equipo mejorado para el desaponificado de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd). Tesis de grado para optar el Título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional del Altiplano. Perú.
- Brito, A., Sanchez, L., Gonzalez, Ch., Vargas, M., & Chafer, M. (2012). Aplicación de recubrimientos a base de quitosano y aceite esencial de limón en el control de la poscosecha de la podredumbre azul de naranjas. Tesis de grado para optar el grado de master en ciencia e ingeniería de los alimentos. Universidad politécnica de Valencia.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Jujuy. Universidad Nacional de Salta, 4, 1 – 24, 61 – 69.
- Cheok, C.Y., Salman, K.H.A., & Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16-40.

- Chong, M. (1988). Contribución al estudio químico de la *Dioscorea balsapuertensis*.
Revista de química, 2(2), 197 - 198.
- CLSI, (2008). Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for
broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved
standard. M38 – A2. 28(16), 1 - 2, 34 – 35.
- Corzo, D.C. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico.
Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 43(3), 81 - 86.
- Cuquerella, J. & Jávega, J. (2002). Efectos fisiológicos de diferentes recubrimientos
sobre frutas cítricas durante su almacenamiento. *Citriculture*. 2, 735-737.
- Del Valle, V., Hernandez, P. M., Guarda, A., & Galotto, M.J. (2005). Development of
a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to
extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chemistry*, 91(4), 751
- 756.
- Díaz, A., & Vila, R. (1990). Biological control of *Penicillium digitatum* by *Trichoderma*
viride on postharvest citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*.
11, 179 – 184.
- Dini, I., Schettino, O., Simioli, T., & Dini, A. (2001). Studies on the constituents of
Chenopodium quinoa seeds: Isolation and characterization of new
triterpene saponins. *Agriculture and Food Chemistry*, 49, 741-746

- Falguera, V., Quintero, J.P., Jiménez, A., Muñoz, J.A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & technology*. 22, 292 – 303.
- FAO. (2011). Food and Agriculture organization. La quinua: cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. 1, 37.
- Flores, D.J. (2013). Procesamiento de granos andinos: quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurimac. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/IvanHinojosa1/05-proc-quinua>.
- Frisvad, J.C. (1981). Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric *Penicillia*. *Applied and Environmental Microbiology*. 41(3), 568 - 579.
- Gestetner, B., Assa, Y., Henis, Y., Birk, Y., & Bondi, A. (1971). Lucerne saponins: IV. Relationship between their chemical constitution, and hemolytic and antifungal activities. *Science of Food and Agriculture*, 22, 168 - 172.
- Gluglú, U.O., & Mazza, G. (2007). Saponins: properties: Applications and processing. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 231 – 258.
- Gómez, E. (2011). Recubrimientos para frutas y hortalizas. V curso internacional en Tecnología de postcosecha y Procesado mínimo. Universidad Politécnica de Cartagena. 1, 1 – 32.
- Gómez, J.A., Alba, J., Cerda, C.M., & Ramos, A.C. (2009). Actividad antifúngica de saponinas esteroidales de *Dioscorea* contra hongos fitopatógenos. Centro de

investigación y estudios avanzados. Universidad Nacional Autónoma de México.

Gonzalo, F., & Salaya, G. (2004). Madurez de la fruta y manejo postcosecha. Pontificia Universidad Católica de Chile. Editorial Universidad católica de Chile, 2, 60-61.

Ma, W.W., Heinstejn, P.F. & McLaughlin, J.L. (1989). Additional toxic, bitter saponins from the seeds of *Chenopodium quinoa*. *Natural Products*. 52(5) 1132 – 1135.

Hernández, J.D. (2014). Crecimiento y producción de naranja cv. Valencia *Citrus sinensis* (L), como respuesta a la aplicación de correctivos y fertilizante. Tesis de grado para obtener el grado de magister en ciencias agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. Colombia.

Huerta, F.E. (2014). *Penicillium*. Facultad de Ciencias Químicas y Microbiología. Universidad Veracruzana. Recuperado de: <http://es.slideshare.net/ferchohuertadector/penicillium-34153581>.

IBNORCA. (2007). Instituto Boliviano de Normalización y Calidad – Norma Boliviana de Granos Andinos – Pseudocereales – Quinoa en grano – clasificados y requisitos, NBNA 0038. Compendio Normas Técnicas y Guías de Implementación de Normas del Sector Quinoa, 1 -7.

ICMSF. (1998). Microorganismos de los Alimentos – Ecología microbiana de los productos alimentarios. Editorial Acribia. Zaragoza – España.

- ICMSF. (2006). Microorganisms in foods – microbial Ecology of Food Commodities. Blackie Academic & Professional. Editorial Acribia. Zaragoza – España.
- IICA. (2015). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura - Estudio el mercado y la producción de quinua en el Perú. MGS Comercial Gráfica S.R.L – INIA. Lima – Perú.
- Jiménez, P.L., Armada, M., & Gómez, S.E. (2013). Propiedades físico-químicas, estructurales y de calidad en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa*) variedad CICA, con evaluación de la eficiencia de un proceso artesanal de escarificación en seco. *Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales*. 3(5), 71 – 78.
- Karlson, P. (2012). Saponins. Remington´s pharmaceutical science. *Pharmacy and Pharmacology*, 18, 7- 23.
- Koziol, M.J. (1991). Afrosimetric estimation of threshold saponin concentration for bitterness in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Science of Food and Agriculture*. 54, 211-219.
- Koziol, M.J. (1992). Chemical Composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd). *Food composition and analysis*, 5, 35-68.
- León, J. (2003). Hibridación y comparación de la F1 con sus progenitores en tres cultivares de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en Puno, Perú. Tesis de grado para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad nacional del Altiplano. Perú.

- Lescano, J. M. (1994). Genética y mejoramiento de cultivo alto andinos quinua, kañihua, tarwi, kiwicha, papa amarga, olluco, mashua y oca. INADE - PELT -COTESU. Puno – Perú.
- Llorente, J.R. (2008). Quinoa: Un auténtico superalimento. *Discovery DSalud*. Recuperado de: <http://www.dsalud.com/index.php?pagina=articulo&c=218>.
- López, J. (2012). Aplicación de recubrimientos comestibles en carambola (*Averrhoa carambola* L.). Tesis de Grado para optar el Título profesional de Ingeniero de Alimentos. Universidad Tecnológica Equinoccial. Ecuador.
- Madl, T., Sterk, H., & Mittelbach, M. (2006). Tandem mass spectrometric analysis of complex triterpene saponins mixture of *Chenopodium quinoa*. *American Society for Mass Spectrometry*, 17, 795 – 806.
- Mamani, Y. (1995). Determinación de saponina en la Quinoa. Universidad Nacional del Altiplano. (s.n). Perú.
- Martínez, J.A. (2011). Interpretación del antibiograma. Hospital clínico de Barcelona. Servicio de Infecciones. Ed. Comité Organizador XXI Reunión Sampac y Fabis. Fundación Andaluza Beturia para la Investigación en Salud. Huelva.
- Miranda, R. (2010). Caracterización Agromorfológica de 685 Acciones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) pertenecientes al banco de germoplasma de granos altoandinos del CIBREF – UTO en el CEAC. Tesis de Grado para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad técnica de Oruro. Bolivia.

- Mondino, P. (2012). Métodos de aislamiento: Aislamiento de hongos y bacterias. *Fitopatología*. 8, 15 – 22.
- Monje, C. Y., & Raffaillac J. P. (2009). Determinación de saponina total en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) método Espectrofotométrico. Memoria IV Congreso Nacional de la Asociación Boliviana de Protección Vegetal. - Dpto. Fitotecnia-FCAPV UTO. ABPV. 217-218.
- Monterde, A., Salvador, A., Ben-Abda, J., & Jávega, J. (2003). Efecto de la aplicación de recubrimientos de origen natural en la calidad de mandarinas y naranjas en maduración y post-recolección de frutos y hortalizas. *Levante Agrícola*. 365, 203-208.
- Mujica, A. (2006). Agroindustria de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en los países andino. Proyecto quinua cultivo multipropósito para los países andinos.
- Mujica, A., Jacobsen, S.E., Izquierdo, J., & Marathee, J.P. (2001). Quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) Ancestral cultivo andino, alimento del presente y futuro. Cultivos Andinos – FAO.
- Nieto, C., & Valdivia, R. (2009). La quinua, documento por la FAO. Recuperado de: <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/c/drom/contenido/libro03/cap1.htm>.
- Ochoa, J.L., Hernández, L.G, Latisnere, H., León, J.L., & Larralde, C.P. (2007). Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja (*Citrus sinensis*

- L. Osbeck) cultivada en baja California sur, México. *Revista de Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(5), 352-359.
- Osbourn, A. (1996). Saponins and plant defense: a soap story. *Trends in Plant Science*. 1(1), 4-9.
- Paredes, F. & Roca, J.J. (2004). Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Farmacología*. 23(3), 116 – 124.
- Pastor, C. (2010). Recubrimientos comestibles a base de hidroxipropil metilcelulosa: caracterización y aplicación. Tesis de grado para obtener el grado de doctor en tecnología de alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Pastor, A. (2013). Saponinas y aislados proteicos a partir de quinoa amargas: usos en cosmética y como ingredientes alimentarios. Recuperado de: http://portal.concytec.gob.pe/images/stories/images2013/agosto/quinua/presentacion_a_na_pastor_revoredo_de_abram.pdf.
- Pérez, J.L. & Quitián, L.A. (2009). Evaluación de métodos de extracción de saponinas de los residuos del beneficio del fique. Tesis de grado para obtener el título profesional de ingeniero químico. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.
- Puraji, S. (2014). Genus *Penicillium*: It's Occurrence, Structure of Mycelium, Reproduction and Systematic Position. Retrieved from: <http://www.yourarticlelibrary.com/biology/genus-penicillium-its-occurrence-structure-of-mycelium-reproduction-and-systematic-position/7198/>.

- Quiroga, C. & Escalera, R. (2010). Evaluación de la calidad nutricional y morfología del grano de variedades amargas de quinua beneficiadas en seco, mediante el novedoso empleo de un reactor de lecho fluidizado de tipo surtidor. *Investigación & Desarrollo*, 10, 23 – 36.
- Ridout, C.L. (1991). Quinoa saponins - Analysis and preliminary investigations into the effects of reduction by processing. *Science Food and Agriculture*. 54,165-176.
- Rojas, W., Valdivia, R., Padulosi, S., Pinto, M., Soto, J.L., Alcócer, E., Guzman, L., Estrada, R., Apaza, V., & Bravo, R. (2009). From neglect to limelight: issues, methods and approaches in enhancing sustainable conservation and use of Andean grains in Bolivia and Perú. *JARTS Supplement* 92, 87 – 117.
- Rojas, W., Soto, J.L Pinto, M., Jager, M., & Padulosi, S. (2010). Granos andinos: Avances, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia. *Biodiversity International*. 151 – 164.
- Sacsquispe, R.E., & Velásquez, J. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de normas técnicas. Ministerio de Salud del Perú. Instituto Nacional de Salud. Lima – Perú.
- Stuardo, M., & San Martin, R. (2008). Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinérea*. *Industrial Crops and Products*, 27, 296-302.

- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2007). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. 663- 673. Recuperado de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>.
- Tellería, M.L., Sgarbieri V.C., & Amaya, J. (1978). Evaluación química y biológica de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), Influencia de la extracción de las saponinas por tratamiento térmico". *Archivo Latinoamericano de Nutrición*. 28, 253.
- Tenorio. R., Terrazas. E., Álvarez, M.T., Vila, J.L., & Mollinedo, P. (2010). Concentrados de saponina de *Chenopodium quinoa* y de *Caiphora andina*: alternativas como biocontroladores de hongos fitopatógenos. *Revista Boliviana de Química*, 27, 33-40.
- Tongdeesoontorn, W., Mauer, L.J., Wongruong, S., Sriburi, P., & Rachtanapun, P. (2011). Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. *Chemistry Central*. 5(1), 6.
- Torres, P.A. (2011). Identificación de la principales sapogeninas de una fracción apolar obtenida de la hidrólisis de un extracto acuoso de *Quillaja saponaria* Mol. y su actividad frente a la enzima glicógeno Fosforilasa A. Tesis de grado para obtener el grado de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Tuset, J.J. (1987). Podredumbres de los frutos cítricos. Instituto valenciano de investigaciones Agrarias (IVIA). Manual de laboratorio. Consejería de agricultura y pesca de la Generalitat Valenciana.

- Valencia, C.S., Pérez, M.B., & Palou. L. (2008). Efecto del recubrimiento con quitosano en el control de las podredumbres verde y azul de los cítricos. IX Simposio Nacional y VI Ibérico sobre Maduración y Postcosecha 2008.
- Vargas, M., Gonzales, M.C., Chiralt, A., & Chafer, M. (2007). Estudio preliminar del uso de recubrimientos de quitosano y de microorganismos eficaces en el control postcosecha de la podredumbre azul de naranjas. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones 2007. 1415 - 1423, Valencia, España.
- Villacorta, S., & Talavera, V. (1976). Anatomía del grano de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd). *Análisis científicos Universidad Nacional del Altiplano*. 14, 39 – 45.
- Viuda, M., Ruiz, Y., Fernandez, J., & Perez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food control*. 19, 1130–1138.
- Wahli C. (1990). Quinua. Hacia un cultivo comercial. Editorial Mariscal. 206.
- Yousef, A.E., & Carlstrom, C. (2006). Microbiología de alimentos. Editorial Acribia. España. 26,46 – 47, 49, 62.
- Zavaleta, R. (1993). Evaluación de procesos industriales para la desaponificación de la quinua. Editor Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Centro Nacional de Control de Calidad. Serie de Documentos. Lima, 6, 125.

ANEXOS

ANEXO 1

Cuadro 1. Resultados de la evaluación de firmeza en naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa aislada.

Día	1			3			5			7			9		
	Rep.	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
Control	45	45,1	45,84	43	44,05	41,56	35	36,56	38,38	30	31,54	32,74	26	25,56	26,37
25 %	45,5	45	45,72	42,9	43,12	42,69	36	36,12	37,12	28,5	29,24	30,47	25,87	26,02	25,74
50 %	44,98	44,96	46,23	42,5	43	43,79	36,5	35,93	36,78	28,87	28,59	29,46	25,76	25,26	27,11
75 %	45,87	46	45,91	43	43,24	42,48	35,9	35,23	35,27	28,1	28,79	29,63	26,9	26,07	25,99
100 %	45,6	45,87	45,38	43,2	43,78	44,73	36,54	35,69	35,18	28,34	27,95	28,4	27	26,19	26

Cuadro 2. Resultados de la evaluación de firmeza en naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa codificada.

Día	1			3			5			7			9		
	Rep.	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
Control	46	45,75	45,84	43,56	43,99	42,36	36	36,23	37	29	31,54	31,65	26,98	25,87	26,45
25 %	45,9	44,97	45,72	42,65	43,23	43,11	35,87	36,56	36,98	29,43	29,9	31,87	27	26,9	25,76
50 %	44,52	45	46,23	42,99	42,98	43,87	36,12	36,87	36,87	27,45	29,87	30,65	27,45	25,73	27,46
75 %	45,56	46	45,91	43	43,24	42,67	36	35,87	35,65	38,13	29,56	30,57	28,54	25,92	27,65
100 %	45,6	45,67	45	44,2	43,56	44,01	35,67	36	35,87	29,56	30	29,65	28	26,97	27

ANEXO 2

Cuadro 1. Cuadro ANVA de la evaluación de firmeza en naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa aislada.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Significancia
Concentraciones	0,9616	4	0,2404	0,5349	0,7121	ns
Días	1416,0753	4	354,0188	787,6967	0,0000	*
Error	7,1910	16	0,4494			
Total	1424,2279	24				

Cuadro 2. Cuadro ANVA de la evaluación de firmeza en naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa codificada.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	significancia
Concentraciones	0,2699	4	0,0675	0,3175	0,8621	ns
Días	1318,9229	4	329,7307	1551,6748	0,0000	*
Error	3,4000	16	0,2125			
Total	1322,5927	24				

ANEXO 3

Cuadro 1. Resultados de la evaluación de presencia de hongos en naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa aislada.

Día	1			3			5			7			9			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
control	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	4
25 %	0	0	0	1,5	1,5	1,5	2	2	2,5	2,5	2,5	3	3	3	3,5	4
50 %	0	0	0	1,5	1,5	1	1,5	1,5	2	2	2	2	3	3	3	3
75 %	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2,5	2,5	2,5	3	3	2,5	3
100 %	0	0	0	0	0	1	1	1	1,5	2	2	2	3	3	2,5	2,5

Cuadro 2. Resultados de la evaluación de presencia de hongos en naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa codificada.

Día	1			3			5			7			9		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
control	0	0	0	1	1	1	2	2,5	1,5	3	2,5	4	3,5	4	3
25 %	0	0	0	1	1,5	1	1,5	1,5	2,5	2,5	3	3	3	3	3
50 %	0	0	0	0,5	1	1	1,5	2	2	2	2,5	2	3	3	2,5
75 %	0	0	0	0,5	1	1	1	1	1,5	1,5	1,5	2	2	2	2
100 %	0	0	0	0	1	1	1	1,5	1	1,5	2	2	1,5	2	2

ANEXO 4

Cuadro 1. Cuadro ANVA de la evaluación de presencia de hongos en naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa aislada.

ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	significancia
Concentración	0,9978	4	0,2495	3,7189	0,0252	4,7726	ns
Días	20,3583	4	5,0896	75,8741	0,0000	4,7726	*
Error	1,0733	16	0,0671				
Total	22,4294	24					

Cuadro 2. Cuadro ANVA de la evaluación de presencia de hongos en naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa codificada.

ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	significancia
Concentración	5,3060	4	1,3265	3,9828	0,0198	4,7726	ns
Días	13,1312	4	3,2828	9,8565	0,0003	4,7726	*
Error	5,3289	16	0,3331				
Total	23,7661	24					

ANEXO 5

Cuadro 1. Resultados del índice de daño (ID) de naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa aislada.

Día	3			5			7			9					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Control	0,00	0,00	0,00	4,35	4,46	4,21	7,20	7,51	7,88	12,60	13,22	13,70	13,05	13,30	13,67
25 %	0,00	0,00	0,00	4,44	4,46	4,42	7,60	7,62	7,92	12,03	12,32	12,94	12,84	13,11	13,18
50 %	0,00	0,00	0,00	4,33	4,38	4,43	9,35	9,21	9,42	11,95	11,84	12,18	12,79	12,57	13,40
75 %	0,00	0,00	0,00	2,15	2,16	2,12	9,08	8,91	9,02	11,74	12,02	12,35	13,16	12,61	12,75
100 %	0,00	0,00	0,00	2,16	2,19	2,24	3,75	3,67	3,67	8,80	8,69	8,82	11,85	11,35	11,28

Cuadro 2. Resultados del índice de daño (ID) de naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa codificada.

Día	3			5			7			9					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Control	0,00	0,00	0,00	4,61	4,65	4,49	11,50	11,74	11,63	12,65	13,67	13,54	15,09	16,54	14,83
25 %	0,00	0,00	0,00	2,23	2,26	2,26	5,76	6,11	5,92	13,99	14,36	14,94	13,05	13,16	12,49
50 %	0,00	0,00	0,00	2,20	2,30	2,29	5,72	5,83	5,93	11,48	12,70	12,76	11,73	11,04	11,61
75 %	0,00	0,00	0,00	0,03	2,21	2,18	3,75	3,89	3,79	10,22	10,97	11,20	11,92	11,12	11,56
100 %	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,88	1,90	1,89	10,65	10,80	10,78	10,18	9,94	9,95

ANEXO 6

Cuadro 1. Cuadro ANVA de la evaluación del índice de daño (ID) de naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa aislada.

ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F	significancia
Índice de daño	22,0027	4	5,5007	5,0295	0,0081	3,0069	*
Días	580,5873	4	145,1468	132,7131	0,0000	3,0069	*
Error	17,4990	16	1,0937				
Total	620,0890	24					

Cuadro 2. Cuadro TUKEY de la evaluación del índice de daño (ID) de naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa aislada. ($\alpha = 0.05$).

	control	25	50	75	100
control		-0,05	0,15	0,47	2,44*
25 %			0,20	0,52	2,49*
50 %				0,32	2,30*
75 %					1,97
100 %					

*Valores significativos al ser comparados con HSD= 2,0265.

Cuadro 3. Cuadro ANVA de la evaluación del índice de daño (ID) de naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa codificada.

ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F	significancia
Índice de daño	57,1573	4	14,2893	6,6902	0,0023	3,0069	*
Días	645,7340	4	161,4335	75,5830	0,0000	3,0069	*
Error	34,1735	16	2,1358				
Total	737,0647	24					

Cuadro 4. Cuadro TUKEY de la evaluación del índice de daño (ID) de naranjas recubiertas con saponina frente a *Penicillium digitatum* de cepa codificada. ($\alpha = 0.05$).

	control	25	50	75	100
control		1,89	2,62	3,47*	4,46*
25 %			0,73	1,58	2,57
50 %				0,85	1,84
75 %					0,99
100 %					

*Valores significativos al ser comparados con HSD= 2,8320

ANEXO 7

**ESCALA HEDONICA PARA REALIZAR EL ANALISIS CUALITATIVO DEL
DESARROLLO DE *Penicillium digitatum*.**

Valor 0



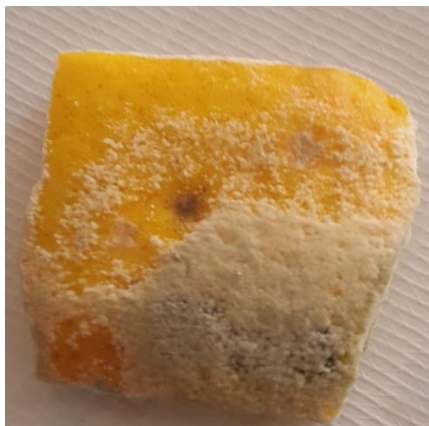
Valor 1



Valor 2



Valor 3

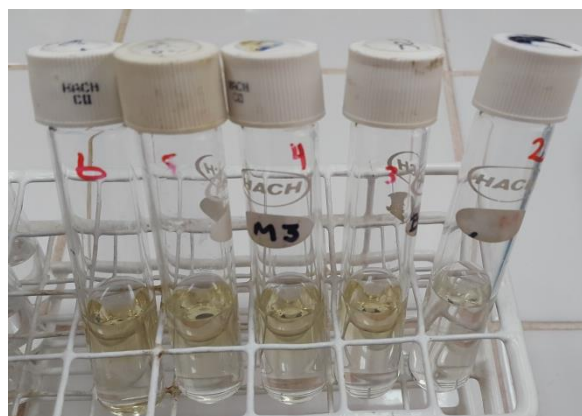


Valor 4



ANEXO 8

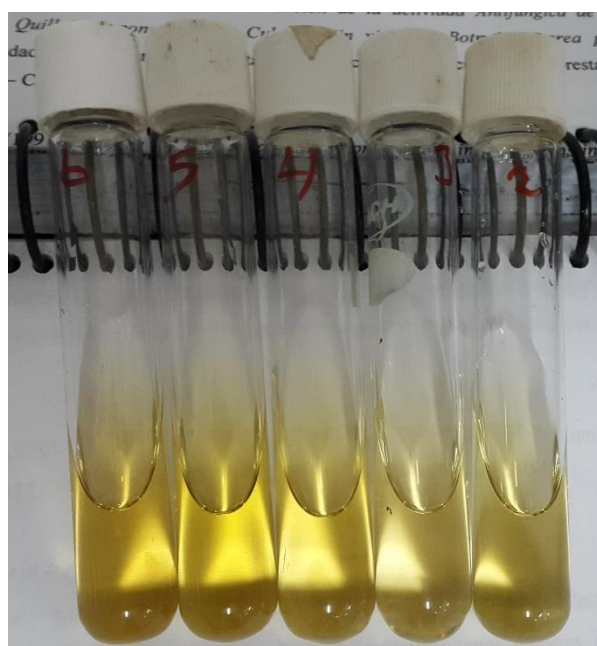
FOTOGRAFIAS



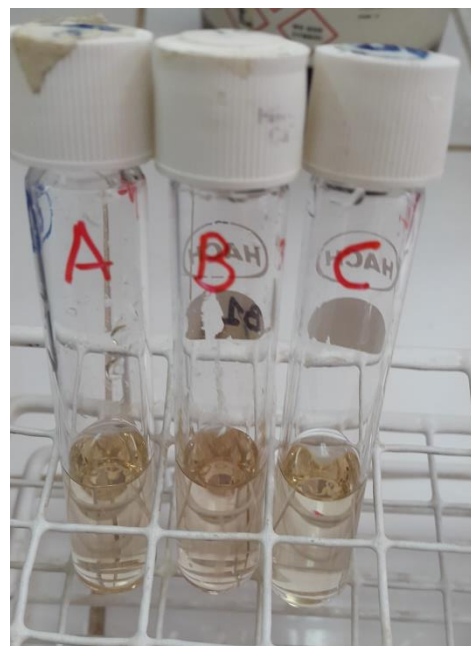
Fotografía 01. Preparación de la solución de diosgenina - metanol



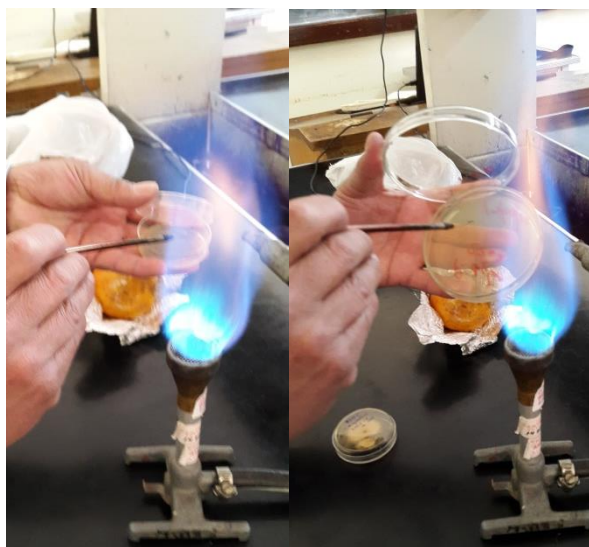
Fotografía 02. Reacción de la solución de diosgenina al reactivo LB.



Fotografía 03. Variación de color en función a la concentración de diosgenina



Fotografía 04. Preparación de la solución de saponina - metanol



Fotografía 05. Inoculación y réplica del hongo *P. digitatum* – cepa codificada



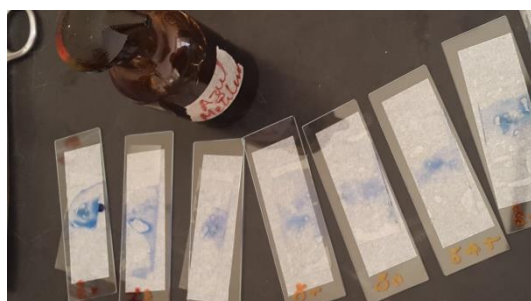
Fotografía 06. Cepas del hongo *P. digitatum* – cepa codificada



Fotografía 07. Recolección de naranjas en estado de descomposición



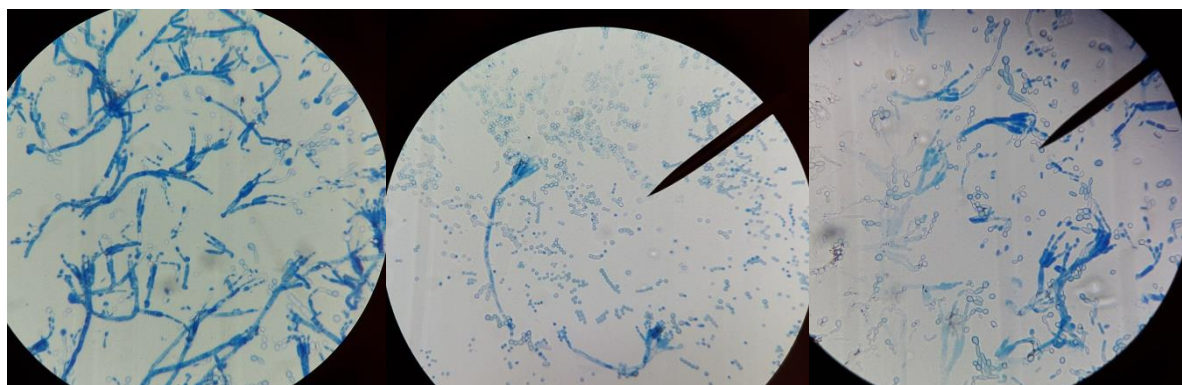
Fotografía 08. Obtención de *P. digitatum* de cepa silvestre



Fotografía 09. Identificación de la cepa silvestre de *P. digitatum*



Fotografía 10. Observación al microscopio



Fotografía 11. Vista microscópica del cuerpo fructífero del *P. digitatum* de cepa silvestre



Fotografía 12. Aislación y purificación de *P. digitatum* de cepa silvestre



Fotografía 13. Tamizado de la saponina de quinua



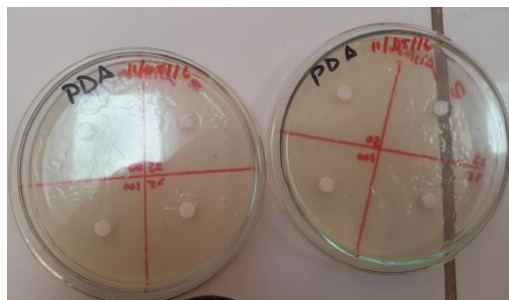
Fotografía 14. Preparación de los discos concentrados en saponina



Fotografía 15. Inoculación del *P. digitatum* ajustado a 1×10^5 según escala Mc Farland



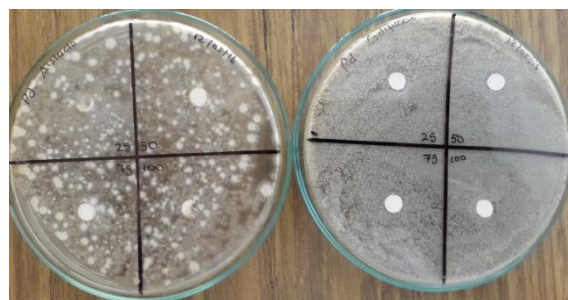
Fotografía 16. Preparación de los discos Concentrados



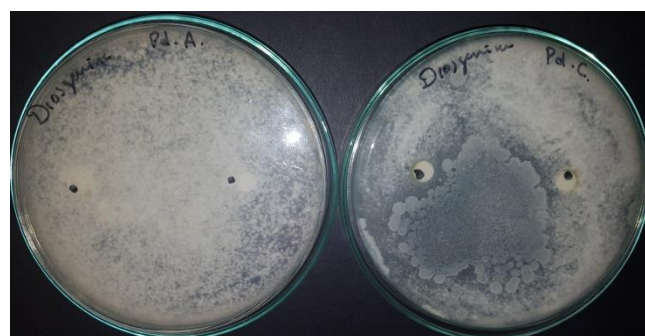
Fotografía 17. Colocación de los discos a diversas concentraciones



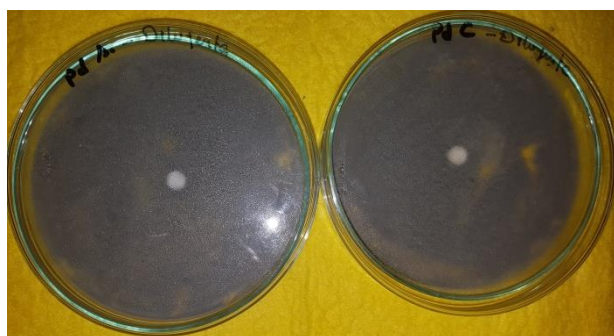
Fotografía 18. Placas infectadas con *P. digitatum* a los cinco días de crecimiento, las imágenes muestran que no hubo halo de inhibición a ninguna concentración.



Fotografía 19. Halo de inhibición del fungicida Tiabendazol.



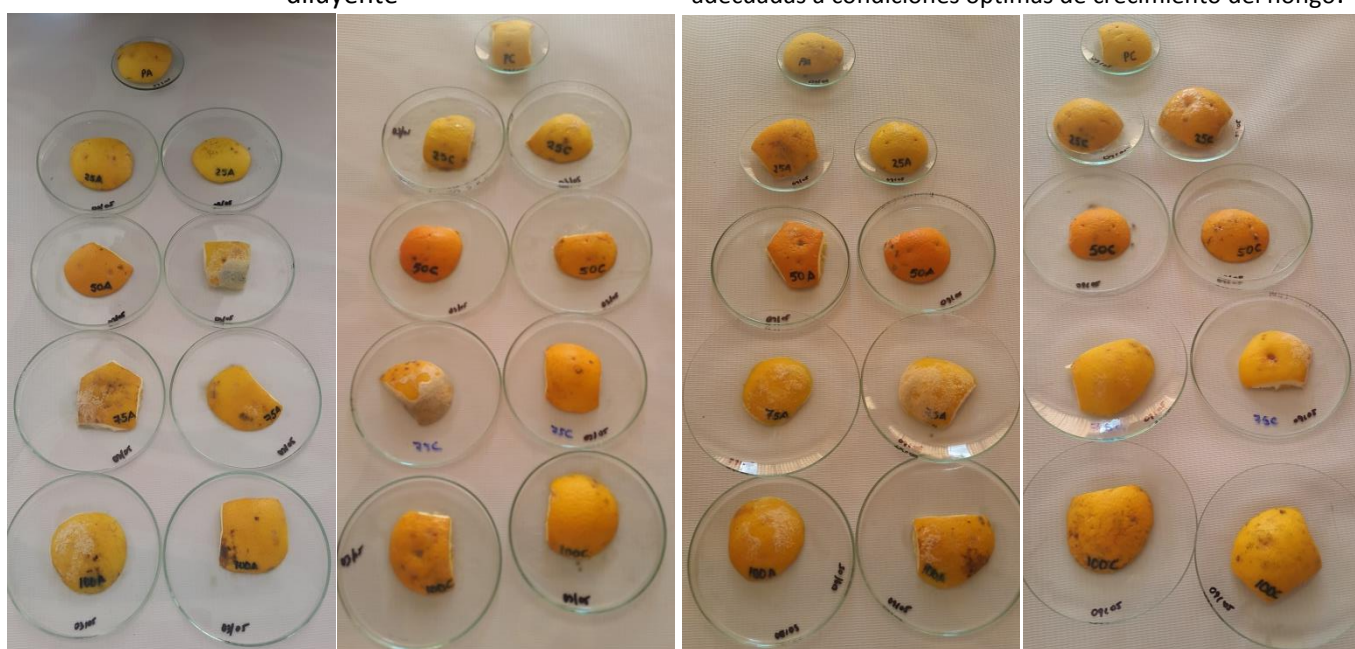
Fotografía 20. Placas con discos concentrados de diosgenina.



Fotografía 21. Placas con discos concentrados de diluyente



Fotografía 22. Naranjas con recubrimiento de saponina, adecuadas a condiciones óptimas de crecimiento del hongo.



Fotografía 23. Imágenes muestran el crecimiento del hongo, no se observa inhibición o retardo del hongo a ninguna concentración.



Fotografía 24. Presencia de hongos jóvenes en cascara de naranja



Fotografía 25. Se observa capa blanca sobre la pulpa, lo cual indica presencia del hongo



Product Sheet

Penicillium digitatum
(ATCC® 36038™)

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Penicillium digitatum* (ATCC® 36038™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

Description

Strain Designation: 3078B
Deposited Name: *Penicillium digitatum* Saccardo, anamorph
Product Description:
An ampoule containing viable cells (may include spores and mycelia) suspended in cryoprotectant.

Propagation

The information recommended in this section is to assist users in obtaining living culture(s) for their studies. The recommendation does not imply that the conditions or procedures provided below are optimum. Experienced researchers may initiate the growth of a culture in their own way.

ATCC® Medium 325: Malt extract agar (Blakeslee's formula)

Growth Conditions
Temperature: 24.0°C

Notes

No special notes.
Additional, updated information on this product may be available on the ATCC web site at www.atcc.org.

DNA Sequence

No DNA sequencing was performed in house on this product.

Isolation

orange, Brazil

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

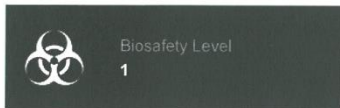
This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.
While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.
This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.



Product Sheet

Penicillium digitatum
(ATCC® 36038™)

Please read this FIRST

**Intended Use**

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Penicillium digitatum* (ATCC® 36038™)

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2012. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [12/06]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 2 of 2

	CERTIFICADO DE ANALISIS CONTROL DE CALIDAD	PCC-03-REG-03	
		Versión: 01	Pág. 2 de 2

2. Saponina de Quinua Blanca

Descripción del Producto			
Ítem	Cantidad	Peso	Fecha de vencimiento
Bolsas	1	2 Kg	MAY-2016
Cajas	----	----	----

Análisis Sensorial - Requisitos organolépticos	
NB NA 0038	
Parámetro	Descripción
Sabor	Característico del producto
Color	Marfil
Olor	Característico del producto
Aspecto	Polvo Granular

Análisis Bromatológico - Clasificación, y Método de ensayo		
Especificaciones	A.V.S.A	Método de Ensayo
Humedad (%)	10.420	AOC 945.15 - Balanza higrométrica
Saponinas (mg/100g)	367	Método de la espuma

Nota: La unidad en la que se expresa el contenido de saponina es en mg/100g.
El valor de 100mg/100g es equivalente a 0.10%

Análisis Químico- Clasificación y Método de ensayo		
Especificaciones	A.V.S.A	Método de Ensayo
pH	6.0	Papel pH

Elaboró	Ing. Mérida Cahuaya Troche Responsable Control de Calidad Andean Valley S.A.	Firma y Sello

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

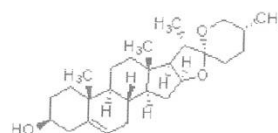
Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Diosgenin - $\geq 93\%$

Product Number: D1634
Batch Number: SLBH4304V
Brand: SIGMA
CAS Number: 512-04-9
MDL Number: MFCD00016887
Formula: C₂₇H₄₂O₃
Formula Weight: 414.62 g/mol
Quality Release Date: 20 AUG 2013



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Faint Yellow	off-white
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Yellow	Yellow
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
50 mg/mL, CHCl ₃		
Purity (TLC)	$\geq 93\%$	99 %

Rodney Burbach, Manager
Analytical Services
St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

SIGMA-ALDRICH

Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland
Tel: +41 81 755 2511 Fax: +41 81 756 5449

Certificate of Analysis

Product Name: MUELLER HINTON AGAR
for microbiology
Product Number: 70191
Batch Number: BCBN9011V
Product Brand: Fluka
Quality Release Date: 02 OCT 2014

TEST	SPECIFICATION	RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	FAINT YELLOW AND FAINT BEIGE AND FAINT BROWN	FAINT BEIGE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
SOLUBILITY (COLOR)	LIGHT YELLOW AND LIGHT BROWN-YELLOW AND LIGHT BROWN	LIGHT BROWN-YELLOW
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO TURBID	CLEAR
PH	7.1 - 7.5, AT 25 °C	7.5
GEL STRENGTH	FIRM, COMPARABLE WITH 1.7 % AGAR GEL	CORRESPONDS
SOLUBILITY (METHOD)	-	38.0 G/L IN WATER, 121 °C FOR 15 MIN.

Cultural characteristics observed after an incubation at 35 - 37°C for 18 - 24 hours. Inoculate the entire agar surface.

Organisms (ATCC)	Growth
<i>Staphylococcus aureus</i> (25213)	luxuriant
<i>Escherichia coli</i> (25922)	luxuriant
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	luxuriant
<i>Enterococcus faecalis</i> (29212)	luxuriant

EXPIRATION DATE - SEP 2019

Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich guarantees the 'Sales-Specification' values only, additional lot specific tests may be included for further information. The current 'Sales-Specifications' sheet is available on request. For further inquiries, please contact our Technical Service. Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of Invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis

Product Name:
TWEEN® 20 - viscous liquid, cell culture tested

Product Number: P2287
 Batch Number: MKBT3263V
 Brand: SIGMA
 CAS Number: 9005-64-5
 MDL Number: MFCD00165986
 Formula: C58H114O26
 Quality Release Date: 04 DEC 2014
 Recommended Retest Date: NOV 2018

Test	Specification	Result
Appearance (Turbidity)	Clear	Clear
Appearance (Color)	Faint Yellow to Yellow and Yellow-Green	Light Yellow
Appearance (Form)	Viscous Liquid	Viscous Liquid
Solubility (Turbidity) at 400mg plus 4ml Water	Clear	Clear
Solubility (Color)	Yellow	Faint Yellow
Assay	≥ 40.0 %	43.5 %
Fatty Acid Composition (as Lauric Acid) Balance Primarily Myristic, Palmitic and Stearic Acids		
Cell Culture Test	Pass	Pass
Recommended Retest Period 4 Years	_____	_____
Note May form precipitate upon standing which does not affect use.	_____	_____

Ali Ataei, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of Invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1