

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Doctorado en Ciencias de la Ingeniería



**“EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE
SAPONINAS DE SEMILLAS DE *Chenopodium quinoa*
Willd PROVENIENTES DEL NOROESTE ARGENTINO”**

Tesis Doctoral

Vicente Gianna

Córdoba

2013

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Doctorado en Ciencias de la Ingeniería



**“EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE
SAPONINAS DE SEMILLAS DE *Chenopodium quinoa*
Willd PROVENIENTES DEL NOROESTE ARGENTINO”**

Lic. Vicente Gianna

Comisión Asesora

Dr. Carlos Alberto Guzmán – Director

Dr. Edgardo Luis Calandri

Dr. Abel Gerardo López

Córdoba

2013

Dedicado a mis hijos María Soledad y Sergio Daniel, a mi esposa Mónica Liliana Longobardi.

A mis padres Vicente Gianna y María Elena Calle, presentes espiritualmente, por los principios éticos y morales que me enseñaron y por los esfuerzos y sacrificios que debieron realizar para poder darme una educación de calidad.

Agradecimientos

A todas las personas que de alguna manera colaboraron en la realización de éste trabajo, fundamentalmente al director de ésta tesis, Dr. Carlos Guzmán, un amigo no solo por su guía sino también por el apoyo moral en un momento crítico y doloroso como fue mi jubilación en el cargo de Profesor Titular por Concurso. También a la Comisión de tesis constituida por los doctores Abel López y Edgardo Calandri por sus esclarecedores y buenos consejos.

A la Dra. Gloria Barboza de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC por el asesoramiento botánico.

A mis compañeros de la Planta Piloto del ICTA.

A mi Ayudante de Investigación Alumno Ing. Juan Manuel Montes.

También quiero agradecer a las entidades que con su valioso aporte técnico y financiero ayudaron a que éste sueño sea posible; SECYT, MinCyT y FCEFyN.

Por último y de todo corazón a quienes fueron mis alumnos, que se transformaron en la razón de ser de mi actividad académica.

A todos los que directa o indirectamente colaboraron ¡MUCHAS GRACIAS!

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	II
Índice General.....	III
Resumen.....	1
Abstract.....	3
Resumo.....	5
Abreviaturas.....	7

Antecedentes Generales

Antecedentes generales.....	9
Taxonomía.....	12
Importancia del cultivo.....	20
Valor nutricional.....	21
Producción de quinoa en América.....	25
Producción y consumo mundial de quinoa.....	26
La industria en la Argentina.....	28

Capítulo 1 – Las saponinas de la quinoa: propiedades

Los procesos de desaponificación por vía seca y húmeda

1.1 Saponinas: definición.....	32
1.2 Saponinas de la quinoa.....	34
.3 Bioactividad de las saponinas de quinoa.....	39
1.4 Impacto del procesamiento de la quinoa para consumo y destino de las saponinas.....	41
1.4.1 Procesos por vía seca.....	42
1.4.2 Desaponificado por vía húmeda.....	44
1.4.3 Desaponificado por método combinado.....	46
Hipótesis.....	47
Objetivos.....	47

Capítulo 2 – Extracción de las saponinas asistida por microondas**Determinación de las condiciones óptimas de extracción**

2.1 Materiales y métodos.....	49
2.1.1 Material vegetal.....	49
2.1.2 Materiales y equipos.....	49
2.2 Calentamiento por microondas.....	50
2.2.1 Fundamentos.....	50
2.2.2 Viscosidad.....	53
2.2.3 Dispositivo experimental.....	54
2.3 Reactivos utilizados.....	57
2.4 Extracción con microondas.....	57
2.4.1 Optimización de las condiciones de extracción.....	58
2.4.2 Metodología.....	59
2.4.3 Procedimiento de extracción con microondas.....	60
2.5 Cuantificación de saponinas.....	61
2.5.1 Curva de calibración.....	64
2.6 Resultados y discusiones.....	68
2.6.1 Diseño experimental.....	68
2.6.2 Ensayos de tendencia.....	70
2.7 Conclusiones sobre la extracción con microondas.....	73

Capítulo 3- Extracción de las saponinas a alta presión**Determinación de las condiciones óptimas de extracción**

3.1 Materiales y métodos.....	74
3.2 Fundamentos de la extracción de saponinas a alta presión.....	74
3.2.1 Dispositivo experimental empleado.....	76
3.2.2 Procedimiento de extracción con alta presión.....	78
3.3 Resultados y discusión.....	78
3.3.1 Diseño experimental.....	78
3-3-2 Ensayo de tendencias.....	80
3.4 Conclusión.....	82

Capítulo 4. Análisis comparativo de la EAM y la HPSE con dos métodos clásicos de extracción

4. Introducción.....	83
4.1 Extracción sólido-líquido.....	83
4.1.1 Factores que afectan la velocidad de extracción.....	83
4.1.2 Extracción por Soxhlet.....	84
4.2 Comparación de métodos de extracción.....	86
4.3 Resultados y discusión.....	87
4.3.1 Extracción con agitación.....	88
4.4 Tabla general comparativa de los métodos extractivos realizados.....	90

Capítulo 5- Purificación de las saponinas a partir de las soluciones de las extracciones realizadas

Determinación por análisis de la pureza

5.1 Purificación de las saponinas extraídas.....	92
5.2.1 Cromatografía.....	92
5.2 Métodos de purificación encontrados en bibliografía.....	92
5.2.2 Fluidos supercríticos.....	92
5.2.3 Extracción con solvente.....	94
5.2.4 Procedimiento.....	95
5.3 Purificación.....	99

Conclusiones generales

Métodos de extracción.....	102
Purificación.....	103

Bibliografía

Bibliografía.....	104
-------------------	-----

RESUMEN

Los principales objetivos de este trabajo fueron dos; por un lado determinar las condiciones óptimas de extracción de las saponinas de los frutos de *Chenopodium quinoa* Willd, por dos métodos originales: la extracción asistida con microondas y la extracción de esta sustancia a alta presión, que permiten una extracción eficiente en un tiempo breve comparado con los métodos tradicionales, como ser el de Soxhlet, reflujo, etc. Por otro lado se estableció un método para cuantificar el contenido de saponinas.

El trabajo se divide en Antecedentes Generales y 5 capítulos. En el primero se describen los orígenes de su nombre, la quinoa como alimento vegetal, su valor nutricional, la taxonomía, las características del fruto, producción y consumo mundial y aplicaciones industriales de la quinoa.

En el Capítulo 1 se describen químicamente las saponinas que se encuentran en el aquenio de quinoa, las estructuras de las mismas, las agliconas más importantes, las aplicaciones de las saponinas y los procesos para eliminarlas (desamargado de las semillas) por vía seca y húmeda, las ventajas y desventajas de los mismos.

En el Capítulo 2 se aborda la extracción asistida por microondas (EAM); se analizaron los fundamentos del calentamiento por microondas, el procedimiento experimental empleado y la optimización del proceso extractivo mencionado utilizando un diseño experimental de Taguchi. Las variables estudiadas fueron: i) temperatura, ii) tiempo, iii) relación volumen de solvente/gramo de aquenio, y iv) porcentaje de alcohol (se utilizaron mezclas etanol-agua e isopropanol-agua).

En el Capítulo 3 se desarrolló la extracción a alta presión con un gas inerte (nitrógeno). Se discute el diseño del reactor empleado y su operación, se analizan los fundamentos de este proceso extractivo, y el procedimiento experimental empleado. Las variables fueron: i) presión manométrica inicial, ii) tiempo, iii) temperatura y iv) porcentajes de alcohol en las mezclas hidroalcohólicas

En el Capítulo 4, se realizó un análisis comparativo de los rendimientos de extracción antes mencionados con los métodos de Soxhlet y de extracción con agitación lineal ("shaker"). El método que mostró mayor rendimiento extractivo y

menor tiempo de extracción es el método de extracción con presiones altas (HPSE).

En el capítulo 5 se analizaron comparativamente algunos métodos de purificación de saponinas. En forma experimental se realiza la purificación por extracción con solventes y recuperación de las saponinas sólidas con un evaporador rotatorio, por disolución de éstas en agua y precipitación por agregado de un solvente de menor constante dieléctrica, por recristalización del precipitado se obtuvo una pureza del 96,3%.

ABSTRACT

The main objectives of this study were two on one hand determine the optimum conditions of extraction of saponins from the fruits of *Chenopodium quinoa* Willd by two original methods: microwave-assisted extraction and extracting this substance under high pressure, both methods have an efficient extraction in a short time of process compared with conventional methods such as: Soxhlet or reflux. In a second place it was established a quantifying method for saponins content.

The work organization starts with general antecedents and is followed by five chapters. It begins with a description about the origin of its name, information of quinoa as vegetable food, its nutritional value, taxonomy, fruit characteristics, production, global consumption and industrial applications of quinoa seeds.

In Chapter 1, the quinoa saponins are described chemically. It is shown its structure, the most important aglycones, saponins applications and processes to eliminate it (to obtain debittered seed) that can be accomplished by dry or wet method, also the advantages and disadvantages are mentioned.

Chapter 2 deals with microwave-assisted extraction (MAE) where the fundamentals of microwave heating were analyzed, is explain the experimental procedure employed and the extraction process optimization using Taguchi experimental design. The variables studied were: i) temperature, ii) time, iii) volume ratio of solvent / gram of achene, and iv) percentage of alcohol (were considered mixtures of ethanol-water and isopropanol-water).

In Chapter 3 was developed high-pressure extraction with an inert gas (nitrogen) (HPSE: high pressure solvent extraction). It discusses the reactor design and the operation employed, are explained the base of this extraction process and the experimental procedure. Variables were: i) initial gauge pressure, ii) time, iii) temperature and iv) percentage of alcohol in alcohol mixtures

In Chapter 4, is found a comparative analysis of yields in extraction methods suggested here with the normal yields obtained in Soxhlet extraction and linear shaking ("shaker"). The method that showed a higher performance and a shorter extractive time is the method with high pressures (HPSE).

Chapter 5 presents a comparison between some saponins purification methods. Experimentally saponins purification is performed by solvent extraction and recovery of saponins as solids is made with a rotary evaporator. Saponins were dissolved in water and precipitated by adding a solvent of lower dielectric constant, and then with a recrystallization of the precipitate it was obtained 96.3% of purity.

RESUMO

Os principais objetivos deste estudo foram duas, por um lado determinar as melhores condições de extração de saponinas dos frutos de *Chenopodium quinoa* Willd por dois métodos originais: extração assistida por microondas e remoção desta substância a alta presión.

Os principais objetivos deste estudo foram, por um lado determinar a extração óptima das saponinas dos frutos de *Chenopodium quinoa* Willd originais dois métodos de extração: extração de microondas e remoção desta substância sob pressões superiores a atmosférico, permitindo a extracção eficiente de um curto período de tempo em comparação com os métodos convencionais, tais como o Soxhlet de refluxo, etc. Por outro lado, foi estabelecido um método para a quantificação do teor de saponinas.

O trabalho está dividido em fundos gerais e em cinco capítulos. No primeiro descrevem-se as origens de seu nome, quinoa e alimentos vegetais, o seu valor nutricional, taxonomia, características de frutos, produção e consumo global e aplicações industriais de quinoa.

No Capítulo 1 descrevem-se quimicamente as saponinas encontradas na quinoa aquênio, as estruturas dos mesmos, as agliconas mais importantes, aplicações saponinas e de processos de eliminação (semente desamargada) por seca e molhada, as vantagens e desvantagens dos mesmos.

O Capítulo 2 trata da extração assistida por microondas (MAE), foram analisados os fundamentos do aquecimento por microondas, o procedimento experimental empregado e a otimização do processo de extração mencionado, utilizando o desenho experimental de Taguchi. As variáveis estudadas foram: i) a temperatura, ii) o tempo, iii) relação do volume de solvente / grama de aquênio, e iv) o percentual de álcool (utilizaram-se misturas de etanol-água e água-isopropanol).

No Capítulo 3 foi desenvolvido a extração a alta pressão com um gás inerte (azoto) (HPSE: (High pressure solvent extraction). Discute-se o desenho do reator empregado e sua operação, analisando os fundamentos de este processo extrativo, e o procedimento experimental empregado. As variáveis estudadas

foram: i.) pressão manométrica inicial, ii) o tempo, iii) temperatura e iv) percentagem de álcool, em misturas de álcool.

No Capítulo 4, foi realizada uma análise comparativa dos rendimentos das extrações acima assinaladas com os métodos de Soxhlet e de extração com agitação linear ("shaker"). O método que mostrou maior desempenho extrativo e menor tempo de extração é o método de extração com altas pressões (HPSE).

No capítulo 5 são analisados comparativamente alguns métodos de purificação de saponinas. De forma experimental é realizada a purificação por extração com solventes e recuperação de saponinas sólidas com um evaporador rotativo, através da dissolução em água e precipitação por adição de um solvente de menor constante dielétrica, por a recristalização do precipitado foi obtido com uma pureza de 96,3%.

ABREVIATURAS

HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i> . Cromatografía líquida de alta presión.
AOAC	Association of Official Analytical Chemist. Asociación oficial de químicos analíticos.
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
RMN	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear
FAO	Food and Agriculture Organization
ONU	Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo
Gal	D-galactosa
GlcA	ácido D-glucurónico
GalA	ácido D-galacturónico
Rha	L-ramnosa
Ara	L-arabinosa
Xyl	D-xilosa
Fuc	D-fucosa
ASTM	American Society for Testing Materials. Sociedad Americana para el Ensayo de Materiales
ICTA	Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
MO	Microondas
EAM	Extracción asistida por microondas
PLE	Pressure liquid extraction. Extracción líquida bajo presión.
ASE	Accelerated solvent extraction. Extracción con solvente acelerada.
PLPW	Polarity low pressure water. Agua de baja polaridad a presión.
PSE	Pressure solvent extraction Extracción con solvente a presión.
HPSE	High pressure solvent extraction. Extracción con solvente a alta presión.
SLE	Solid liquid extraction. Extracción sólido líquido.

PEV	Pressure vessel extraction. Recipiente para extracción a alta presión.
SFE	Supercritical fluid extraction. Extracción con fluido supercrítico.
UV	Ultra violeta
VIS	Visible
IR	Infra rojo
min	Minuto
rpm	Revoluciones por minuto
g	Gramo
C ₂ H ₆	Etano
C ₂ H ₄	Eteno
C ₃ H ₈	Propano
mL	Mililitros
FAB	Fast Atomic Bombardment. Bombardeo con átomos rápidos.
TLC	Thin layer chromatography. Cromatografía en capa delgada.

Antecedentes Generales

**Estudio Integral de la
planta y de las semillas
de quinoa provenientes
del noroeste argentino**

ANTECEDENTES GENERALES

En la Argentina hay centros de investigación que trabajan sobre distintos aspectos relacionados con la quinoa:

- Fundación Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán. Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Tucumán: doctores Gallardo y González "Efecto de factores estresantes sobre la germinación en quinoa" y "Morfología del fruto y semilla de *Chenopodium quinoa* Wild".
- Cátedra de Fisiología Vegetal y Producción Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. El Dr. Héctor Daniel Bertero que investiga en Ecofisiología y bases fisiológicas para el mejoramiento de cultivo de granos de la quinoa y Procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo de los cultivos.
- Instituto de Investigaciones para la Industria (INIQUI). Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Salta. La Ing. Margarita Armada entre otras líneas de investigación desarrolla métodos en seco de desaponificación de la quinoa por escarificado.
- Departamento de Suelos y Ecología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Jujuy. El Dr. Buitrago trabaja en Diversificación productiva para valles, quebrada y puna jujeñas, mediante el rescate y la re-introducción de dos cultivos andinos: quinoa y amaranto
- Cátedra de Nutrición Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. La Dra. Anabel Pallaro , investiga, entre otros temas sobre el valor nutricional de la quinoa mediante estudios in vivo.
- En el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos los doctores Guzmán y Calandri investigan sobre: desarrollo de productos preparados en base a quinoa (sopas, papillas, aderezos, etc.) sobre aislados proteicos de quinoa, obtención de almidón de quinoa y el autor de esta Tesis Doctoral, Vicente Gianna, investiga sobre métodos extractivos de la saponina por vía

húmeda, con una doble finalidad: cuantificar el contenido de saponinas e implementar métodos extractivos a nivel de laboratorio, pero que podrían ser extrapolados sin inconvenientes, a nivel piloto o industrial.

El nombre vulgar más apropiado es “quinoa”, siguiendo a Feuileé y Willdenow, primeros botánicos que mencionaron el nombre vulgar de la planta (Feuileé, 1725; Willdenow, 1797). Otros nombres vulgares son, en Bolivia y Perú quinua (el 7 de marzo de 1538 un poblado fundado en Perú en la época de la conquista fue bautizado con el nombre de Quinua, en Chile: quingua, etc. (Hunziker, 1952).

“La quinoa recibe diferentes nombres en el área andina que varían entre localidades y de un país a otros, así como también recibe nombres fuera del área andina que varían con los diferentes idiomas.

En Perú: Quinua, Jiura, Quiuna; en Colombia: Quinua, Supha, Uba, Luba, Ubalá, Juba, Uca; en Ecuador Quinua, Juba, Subacguque, Ubaque, Ubate; en Bolivia: Quinua, Jupha, Jiura; en Chile: Quinua, Quingua, Dahule; en Argentina: Quinua, quiuna.

Español: Quinua, Quinoa, Quingua, Triguillo, Trigo Inca, Arrocillo, Arroz del Perú, Kinoa.

Inglés: Quinoa, Quinua, Kinoa, Swet quinoa, Peruvian rice, Petty rice.

Francés: Anserine quinoa, Riz de peruo, Petit riz de Peruo, Quinoa.

Italiano: Quinua, Chinua.

India: Vathu.

China: Han.

Quechua: Kiuna, Quinua, Parca.

Aymara: Supha, Jopa, Jupha, Jauira, Aara, Ccallapi, Vocali, Jiura.

Azteca: Huatzontle.

Chibcha: Suba, Supha, Pasca” (Mujica, 1996)

La quinoa, es el único alimento vegetal que posee todos los aminoácidos esenciales, oligoelementos y vitaminas y no contiene gluten. Los aminoácidos

esenciales se encuentran en el núcleo del grano, a diferencia de otros cereales que los tienen en el exosperma o cáscara, como el arroz o trigo (Bojanic, 2011).

Esta planta posee resistencia a factores abióticos como la sequía, el frío y los suelos salinos (Tapia, 1990)

En los últimos años la quinoa adquiere una importancia económica por su alto valor nutritivo como se describe en el párrafo anterior. Tiene gran demanda sobre todo a nivel mundial. La producción, que inicialmente correspondía a las zonas Andinas de Latinoamérica, ha trascendido las fronteras de esta parte de América. En Estados Unidos la quinoa se produce en los estados de Colorado y Nevada, y en el Canadá en las praderas de Ontario, sumando una superficie de 2.300 ha (Apaza, 2008). En el estado de Colorado se cultiva este grano con rendimientos promedio de 1.000 kg/ha (Jacobsen, 2003).

En Europa varios países de este continente fueron miembros del proyecto “Quinoa un cultivo multipropósito para la diversificación agrícola de los países Europeos” aprobado en 1993.

También se han desarrollado cultivares en África y Asia con buenos resultados.



Foto 1. Canchas, Puno, Perú ((S.-E. Jacobsen)

“La región de los Andes, cuna de grandes civilizaciones como la Incaica y Tiahuanacota, es considerada centro de origen de numerosas especies nativas como la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), la misma que durante miles de años fue el principal alimento de las culturas antiguas de los Andes y que está distribuida en diferentes zonas agroecológicas de la región”. (FAO, 2011)

El nombre científico de la quinoa es *Chenopodium quinoa* Willd. (Hunziker, 1943). **Chenopodioideae** es una subfamilia de las Amaranthaceae, considerada hasta época reciente como una familia independiente (*Chenopodiaceae*) y en la actualidad en vista de los estudios genéticos (Fuentes *et al.*, 2009), se ha demostrado que Chenopodieae es monofilética con las restante subfamilias de las Amarantáceas. Incluye unas 1400 especies repartidas en un centenar de géneros. Con la denominación de la especie *Chenopodium quinoa* Willd se incluyen tanto las variedades silvestres como las “domesticadas” (Wilson, 1981, 1988).

El género *Chenopodium* incluye alrededor de 250 especies (Bhargava *et al.*, 2003). La quinoa es una planta anual que se encuentra en la región andina de América del Sur, existen variedades de quinoa para todas las zonas agroecológicas, desde el nivel del mar hasta los 4000 m (altura del Altiplano boliviano) (Tapia y Fries, 2007).

TAXONOMIA

Chenopodium quinoa Willd

Desde el punto de vista botánico es ginomonoica, anual, de 0,5 a 1,6 m de altura, muy ramificada desde la base, verde o con pigmentos betaciánicos (Gallardo, *et al.*, 2000). Hojas algo gruesas, 3-nervadas, con ápice redondeado o agudo, recubiertas sobre todo en la cara inferior y cuando jóvenes de pelos vesiculosos blancuzcos.

Las hojas presentan formas variables, de colores verdes, rojas o moradas; inflorescencias cimosas en compactos racimos piramidales las flores son pequeñas y carecen de pétalos; pueden ser hermafroditas o pistiladas.

Fruto recubierto en parte por el perigonio acrescente con el pericarpio blancuzco, blanco-ocráceo o rojo ladrillo. La semilla es pequeña, aproximadamente

de 2 a 3 mm de diámetro y 1 mm de espesor. El color puede ser amarillo, café, crema, blanco o translucido.

El período vegetativo es entre 90 y 220 días, dependiendo de las variedades (Hunziker, 1952).

En la Foto 2 se pueden observar plantas de quinoa mostrando diferentes colores y formas de inflorescencia.

El color de las hojas es variable dependiendo de los genotipos, se han observado pigmentos rojos, púrpuras, amarillos, que están constituidos por betalainas, tanto del tipo, betacianinas (rojo- violeta) y betaxantinas (amarillas) (Gallardo *et al.*, 1996).



Foto 2. Plantas de quinoa mostrando diferentes colores y formas de inflorescencia, en la zona de los salares de Bolivia (Mujica *et al.*, 2001)

El tallo es cilíndrico en el cuello de la planta y anguloso a partir de las ramificaciones. El diámetro puede variar de 1 a 8 cm, siendo mayor en la base que en el ápice. Posee corteza firme, compacta con membranas celulósicas, interiormente contiene una médula, que a la madurez desaparece, quedando seca, esponjosa y vacía; este tallo por su riqueza y gran contenido de pectina y celulosa se puede utilizar en la fabricación de papel y cartón (ONUDI, 2006).

Las hojas son alternas y polimorfas en la misma planta; las de la base son romboides, triangulares las de la parte media y las hojas superiores son lanceoladas.

Son bastante higroscópicas, captando la humedad atmosférica nocturna, controlan la excesiva transpiración por humedecimiento de las células y reflejan los rayos luminosos disminuyendo la radiación directa sobre las hojas evitando el sobrecalentamiento (Mujica *et al.*, 2001).



Figura 1. *Chenopodium quinoa* Willd. Planta Fructífera (Argentina: Jujuy, Humahuaca, 2931 m., leg A. T. Hunziker 2099, 20-V-1942; Herb. A. T. Hunziker). La línea vertical representa 4 cm; dibujó A. E. Cocucci.

Las hojas son de carácter polimorfo en una sola planta; las de la base son romboides, mientras que las hojas superiores, ubicadas alrededor de la inflorescencia, son lanceoladas. Ver Figura 2.

La coloración varía de verde claro en la variedad Nariño, hasta verde oscuro en Kcancolla; se transforma en amarilla, roja o púrpura según la madurez, cayéndose finalmente las hojas en la base.

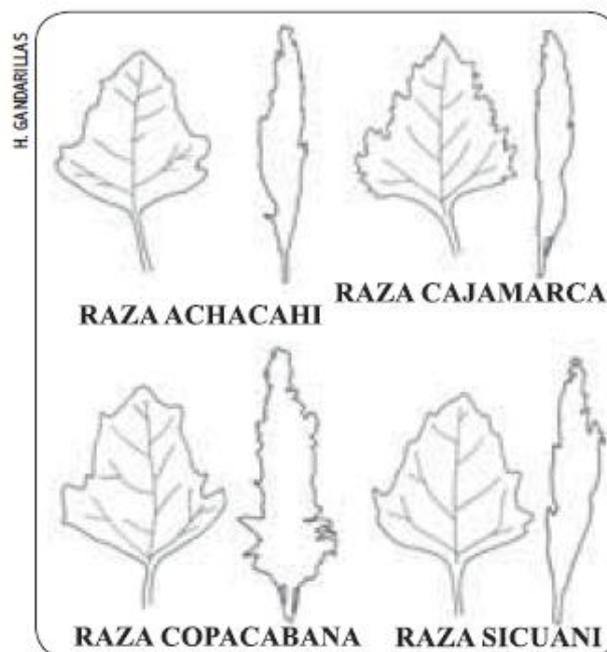


Figura 2. Quinoa. Formas de hojas según las panojas (Tapia *et al.*, 2007)

La inflorescencia de la quinoa es una panícula y puede ser compacta (glomerulada) o laxa (amarantiforme), existiendo formas intermedias entre ambas. Es glomerulada cuando las inflorescencias forman grupos compactos y esféricos con pedicelos cortos y muy juntos, dando un aspecto apretado y compacto (racimo), Fig. 3A. Es amarantiforme cuando los glomérulos son alargados y el eje central tiene numerosas ramas secundarias y terciarias y en ellas se agrupan las flores formando masas bastante laxas. Fig. 3B. El tamaño de la inflorescencia está asociado con el rendimiento del grano (Mujica *et al.*, 2001).

Las flores de la quinoa son incompletas, es decir sin pétalos y pueden ser pistiladas (flores femeninas) o hermafroditas.

En una misma inflorescencia se pueden encontrar flores hermafroditas y femeninas o pistiladas. Las flores hermafroditas son las que predominan, aunque es posible encontrar plantas androestériles que son funcionalmente femeninas. La forma de fecundación de la quinoa es autógama con polinización cruzada frecuente (ONUDI, 2006).

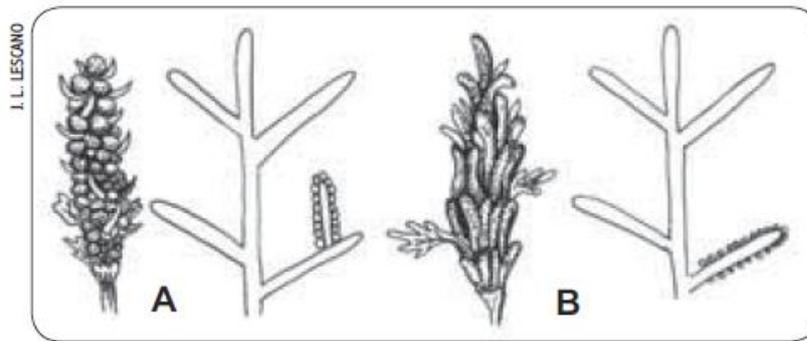


Figura 3. Tipos de inflorescencia: A. Glomerulada B. Amarantiforme (Tapia *et al.*, 2007)

El fruto es un aquenio que tiene forma cilíndrico-lenticular, levemente ensanchado hacia el centro, en la zona ventral se observa una cicatriz que es la inserción del fruto en el receptáculo floral (ver Foto3). Está constituido por el perigonio que envuelve al fruto por completo y contiene una sola semilla, de coloración variable, con un diámetro de 1,5 a 3 mm la cual se desprende con facilidad a la madurez y en algunos casos puede permanecer adherido al grano incluso después de la trilla dificultando la selección. El contenido de humedad del fruto a la cosecha es de 14,5% (Gallardo *et al.*, 1997).

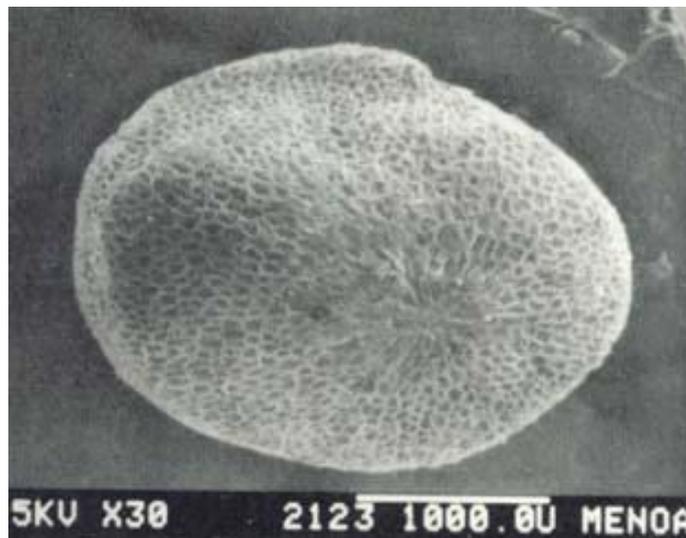


Foto 3. Vista ventral del fruto de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) al microscopio electrónico de barrido (Gallardo *et al.*, 1997)

El fruto como antes se mencionó es un aquenio, con un perigonio que se desprende fácilmente y dos capas internas: episperma exterior y perisperma interior que difícilmente se separan del grano o frutos.

La semilla es de forma lenticular, elipsoidal, cónica o esferoidal, presenta tres partes bien definidas que son: episperma, embrión y perisperma (ver Foto 4).

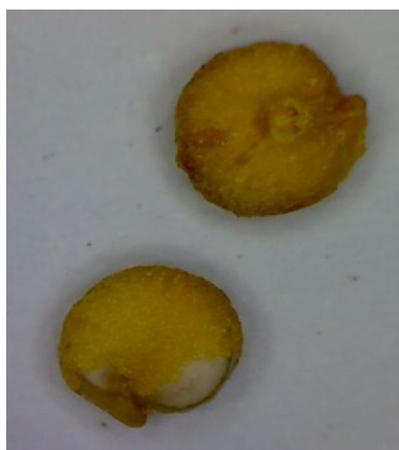


Foto 4. Semillas de quinoa (Gianna, 2013))

El episperma está constituido por cuatro capas: una externa de superficie rugosa, quebradiza, la cual se desprende fácilmente al frotarla, en ella se ubica la saponina que le da el sabor amargo al grano y cuya adherencia a la semilla es variable con los genotipos. Tiene células de forma alargada con paredes rectas; la segunda capa es muy delgada y lisa, se observa sólo cuando la capa externa es translúcida; la tercera capa es de coloración amarillenta, delgada y opaca y la cuarta capa, translúcida, está constituida por un solo estrato de células (Mujica *et al.*, 2011).

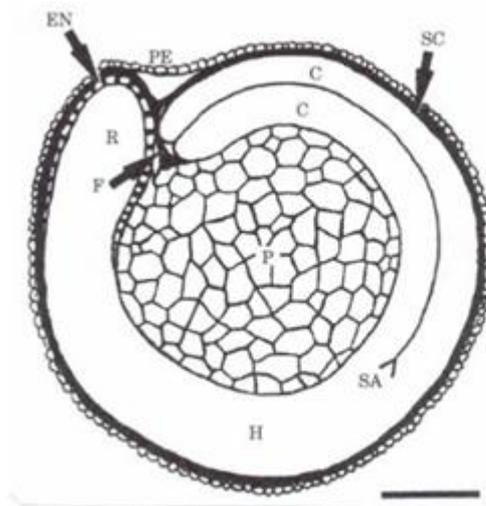


Figura 4. Sección longitudinal del grano de quinoa (Prego *et al.*, 1998).

PE: Pericarpio, SC: Cubierta de la semilla, EN: Endosperma, C: Cotiledones, H: Hopocotilo; SA: Apice del meristemo; R: Radícula, P: Perisperma, F: Funículo. Segmento = 500 μm .

El embrión está formado por dos cotiledones y la radícula, como se ve en la Fig. 4. Constituye el 30% del volumen total de la semilla el cual envuelve al perisperma como un anillo, con una curvatura de 320 grados; es de color amarillento mide 3,54 mm de longitud y 0,36 mm de ancho, en algunos casos alcanza una longitud de 8,2 mm de longitud y ocupa el 34 % de toda la semilla y con cierta frecuencia se encuentran tres cotiledones. En ella se encuentra la mayor cantidad de proteína que alcanza del 35-40%, mientras que en el perisperma solo del 6,3 al 8,3 % de la

proteína total del grano; la radícula, muestra una pigmentación de color castaño oscuro (Mujica *et al.*, 2011).

El perisperma es el principal tejido de almacenamiento y está constituido mayormente por granos de almidón, es de color blanquecino y representa prácticamente el 60% de la superficie de la semilla. Sus células son grandes de mayor tamaño que las del endosperma, de forma poligonal con paredes delgadas, rectas y con grandes agregados de almidón (Mujica *et al.*, 2011).

Dimensiones geométricas de las semillas de quinoa, variedad Cica.



Foto 5. Radio y sección longitudinal media (Gianna, 2013)

La foto 5 fue tomada con un microscopio USB Digital marca NISUTA que permite medir el radio, perímetro y superficie del objeto visualizado. Se tomaron 20 semillas y se determinaron los siguientes valores promedios: radio de la semilla $r = 1,2 \pm 0,1 \text{ mm}$, el perímetro $C = 7,7 \pm 0,2 \text{ mm}$ y la superficie es de $4,8 \pm 0,4 \text{ mm}^2$. En la fotografía que está a la derecha (la semilla está fotografiada de perfil) el espesor es de $0,90 \text{ mm}$ para esa semilla.

Es un pseudocereal es decir falso cereal. Los cereales verdaderos son gramíneas con características muy definidas. Los gramíneas más conocidas como cereales son el trigo, la cebada, y el maíz. Las plantas de estos cereales tienen hojas delgadas, puntiagudas, forman inflorescencias llamadas espigas donde se localizan finalmente los granos (cariopsis) que conocemos como cereales.

Este pseudocereal se viene consumiendo desde la antigüedad de la misma manera que se consumen los granos de los cereales verdaderos, ya que debido a su alto contenido de almidón sus usos son similares a los de los cereales, es decir, molidos, como harina y en una variedad de productos (Borneo, 2009).

Fue cultivada por los Incas en los sectores andinos de Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador y Perú. Su consumo ha sido ancestral (3000–5000 años AC) en la dieta de la población campesina de estos países; la quinoa era conocida en quechua (una de las lenguas de los incas) como “chisiya mama” que significa “semilla madre”, esta semilla constituye la base de la alimentación de los pueblos andinos. Se asocia en numerosos rituales de fertilidad practicados en la cultura inca.

La quinoa, además de semilla sagrada, era un símbolo del imperio Inca, por ese motivo la conquista española en América del Sur trató de destruir ese símbolo para terminar con la civilización Inca. Este hecho junto con los nuevos cultivos introducidos por los españoles, hizo que la quinoa y su consumo disminuyeran drásticamente por casi 400 años (Zesarino, 2011).

IMPORTANCIA DEL CULTIVO

La quinoa tiene un gran valor social, teniendo en cuenta que en el altiplano se concentra la mayor población rural, con elevados niveles de pobreza y desnutrición. Los cultivos son desarrollados por el núcleo familiar (en pequeña escala), que además crían llamas que sirven de alimento, pero también aportan el excremento utilizado como abono orgánico de esos mismos cultivos, manteniendo de esa forma la fertilidad del suelo.

La importancia económica de estos granos es destacable no solo a nivel del mercado local sino también del internacional mediante exportación. Es por eso que mediante la participación de la agroindustria, las opciones económicas se acrecientan considerablemente (ONUDI, 2006).

La FAO, organismo internacional de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, ha declarado el año 2013 “Año Internacional de la quinoa” y considera uno de los alimentos más promisorios de la humanidad no sólo por sus

grandes propiedades benéficas y por sus múltiples usos, sino también por considerarla como una alternativa para solucionar los graves problemas de nutrición humana.

Por otro lado el cultivo tiene una extraordinaria adaptabilidad a diferentes pisos agroecológicos, puede crecer con humedades relativas desde 40% hasta 88%, y soporta temperaturas desde -4°C hasta 38°C. Es una planta eficiente en el uso de agua, es tolerante y resistente a la falta de humedad del suelo, y permite producciones aceptables con precipitaciones de 100 a 200 mm. (Bojanic, 2011).

La NASA también la incluyó para alimentar a sus tripulantes en los viajes espaciales de larga duración por ser un alimento de composición nutritiva excelente, de aprovechamiento integral, su breve ciclo de cultivo y su capacidad de crecer en ambientes adversos (Miralla, 2009).

La quinoa cuenta con más de tres mil variedades o ecotipos tanto cultivadas como silvestres que se resumen en cinco categorías básicas según el gradiente altitudinal: ecotipos del nivel del mar, del altiplano, de valles interandinos, de los salares y de las Yungas (Bojanic, 2011).

Valor nutricional

La calidad nutricional de un producto depende tanto de la cantidad como de la calidad de sus nutrientes.

	Proteína	Grasa	Fibra cruda	Cenizas	Carbohidratos
Quinoa	14,4	6,0	4,0	2,9	72,6

Tabla 1. Composición proximal de la quinoa (g/100g de semilla seca). (Repo Carrasco, *et al.*, 2003).

	Quinoa	Kañiwa	Kiwicha	Arroz	Trigo
Ácido aspártico	7,8	7,9	7,4	8,0	4,7
Treonina	3,4	3,3	3,3	3,2	2,9
Serina	3,9	3,9	5,0	4,5	4,6
Ácido glutámico	13,2	13,6	15,60	16,8	31,3

Prolina	3,4	3,2	3,4	4,0	10,4
Glicina	5,0	5,2	7,4	4,1	6,1
Alanina	4,1	4,1	3,6	5,2	3,5
Valina	4,2	4,2	3,8	5,1	4,6
Isoleucina	3,4	3,4	3,2	3,5	4,3
Leucina	6,1	6,1	5,4	7,5	6,7
Tirosina	2,5	2,3	2,7	2,6	3,7
Fenilalanina	3,7	3,7	3,7	4,8	4,9
Lisina	5,6	5,3	6,0	3,2	2,8
Histidina	2,7	2,7	2,4	2,2	2,0
Arginina	8,1	8,3	8,2	6,3	4,8
Metionina	3,1	3,0	3,8	3,6	1,3
Cistina	1,7	1,6	2,3	2,5	2,2
Triptofano	1,1	0,9	1,1	1,1	1,2
% N del grano	2,05	2,51	2,15	1,52	2,24
% proteína	12,8	15,7	13,4	9,5	14,0

Tabla 2. Contenido de aminoácidos (mg de amino ácido/16 g de nitrógeno). (Repo-Carrasco *et al.*, 2003)

Si bien la quinoa no tiene un alto contenido de proteínas es sumamente importante la calidad de las mismas.

Su valor alimenticio radica en la composición aminoacídica de su proteína, como se puede observar en la Tabla 2.

Como se puede observar en la tabla antes mencionada, la quinoa, tiene un alto contenido en *lisina*, un aminoácido que no es muy abundante en el reino vegetal. Además contiene otros aminoácidos esenciales, particularmente *arginina* e *histidina*, que son muy apropiados para la alimentación infantil. Además contiene leucina, isoleucina, metionina, fenilamina, treonina, triptofano y valina.

Cervilla *et al.*, (2012), evaluaron la cantidad y calidad proteica de harinas obtenidas de dos lotes de granos provenientes del noroeste argentino, variedad CICA. La calidad proteica se evaluó por el método del score químico en

combinación con la PDCAAS teórica (protein digestibility corrected amino acid score). “El contenido de proteínas fue de 15 y 12,4% en los lotes 2009 y 2010 respectivamente. La concentración de aminoácidos por cien gramos de proteínas fue similar, excepto lisina e histidina que fueron mayores en el lote 2010. Los aminoácidos limitantes en la proteína de quinoa fueron cisteína y metionina, pero existen otros que se encuentran en bajas concentraciones en relación a los requerimientos de los niños en edad preescolar. La proteína de quinoa es más adecuada para satisfacer los requerimientos de la población de más edad. Los cálculos de aprovechamiento de la misma son relativamente bajos, sin embargo este obstáculo puede ser sorteado realizando complementación proteica con cereales.

Los resultados que obtuvieron se pueden ver en la siguiente tabla:

**Porcentaje de proteínas y contenido de aminoácidos
(g AA/100 g de harina) en harinas de quinoa de origen Argentino.
Lotes 2009 y 2010.**

	HARINA (Lote 2009)	HARINA (Lote 2010)
Proteínas	15,01 ± 0,20	12,44 ± 0,17
Ácido Aspártico	1,09 ± 0,06	0,84 ± 0,04
Ácido Glutámico	1,90 ± 0,1	1,47 ± 0,04
Serina	0,55 ± 0,03	0,11 ± 0,03
Histidina	0,40 ± 0,02	0,90 ± 0,03
Glicina	0,78 ± 0,04	0,66 ± 0,02
Treonina	0,43 ± 0,02	0,35 ± 0,02
Arginina	1,15 ± 0,08	0,89 ± 0,04
Alanina	0,58 ± 0,03	0,48 ± 0,01
Prolina	0,35 ± 0,06	0,09 ± 0,03
Tirosina	0,32 ± 0,02	0,28 ± 0,01
Valina	0,71 ± 0,08	0,56 ± 0,07
Metionina	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,03
Cisteína	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,03
Isoleucina	0,53 ± 0,03	0,43 ± 0,00
Leucina	0,88 ± 0,05	0,71 ± 0,02
Fenilalanina	0,52 ± 0,03	0,43 ± 0,01
Lisina	0,60 ± 0,03	0,60 ± 0,02

Los resultados del trabajo son similares a los hallados por Repo Carrasco, (2003), y, aunque este autor no menciona el origen y variedad de la muestra

investigada, sus datos corresponden al grano entero y en nuestro caso a la harina integral.”

Las proteínas de quínoa son principalmente del tipo albúmina y globulina, como se puede observar en el siguiente cuadro.

	Albúminas+globulinas	Prolaminas	Glutelinas+proteínas insolubles
Quinoa	45	23	32
Kañiwa	41	28	31

Tabla 3. Fracciones proteicas de la quinoa y kañiwa (% de proteína total) (Scarpati de Briceño y Briceño, 1980).

Esta semilla presenta un interesante perfil de ácidos grasos. Así el mayor porcentaje de ácido graso en el aceite de quinoa es el ácido linoleico (Omega 6), siendo de 50,24%, que es un valor muy similar al encontrado en el aceite de germen de maíz, que tiene un rango de 45 a 65% (Reppo-Carrasco *et al.*, 2003)

El ácido oleico (Omega 9), está en un 26,04%, el ácido *linolénico* (Omega 3), 4.77%, y 9,59% de ácido palmítico. Se encuentran también ácidos grasos en pequeña proporción, como el ácido esteárico y el eicosapentaenoico. La composición de estos ácidos grasos es muy similar al aceite de germen de maíz (Reppo-Carrasco *et al.*, 2003).

El 82,71% de ácidos grasos en el aceite de quínoa pertenece a ácidos grasos no saturados. En las últimas décadas los ácidos grasos no saturados han cobrado gran importancia por la actividad benéfica para el organismo que se les atribuye, al mantener la fluidez de los lípidos de las membranas celulares. (Reppo-Carrasco *et al.*, 2003)

Otro componente es el almidón que es el carbohidrato más importante en todos los cereales. El contenido de almidón oscila entre 58,1-64,2 %. Algunas investigaciones recientes mencionan que el almidón de quínoa tiene una excelente estabilidad frente al congelamiento y la retrogradación. Estos almidones podrían ofrecer una alternativa interesante para sustituir almidones modificados químicamente (Reppo-Carrasco *et al.*, 2003).

También es importante el contenido en micronutrientes (sustancias que el organismo necesita en pequeñas dosis), vitaminas y oligoelementos que forman parte de su composición. La quínoa, además de las vitaminas del complejo B, contiene vitamina C, E, tiamina y riboflavina. Además de un alto contenido en minerales, tales como fósforo, potasio, magnesio y calcio entre otros. Las personas que se ven obligadas a consumir poca leche y productos lácteos, tiene en la quínoa un sustituto ideal para la suplementación de calcio (Repo-Carrasco, 2011).

Sin embargo, el alto contenido de saponinas en la semilla sin tratamiento de lavado podría alterar la mucosa intestinal. Vidueiros *et al.*, (2012), utilizaron ratas Wistar divididas en 3 lotes y fueron alimentadas desde el destete y durante 7 días con dieta al 10% de proteínas de 1) quinoa sin lavar; 2) quinoa comercial lavada; 3) caseína como grupo de control. Se calculó la velocidad de ganancia de peso (VGP,g/día/100g). Los intestinos se procesaron por la técnica de Saint Marie. Observaron procesos inflamatorios provocados por las saponinas de la quinoa sin lavar. Esto podría afectar la absorción normal intestinal de nutrientes.

PRODUCCIÓN Y CONSUMO MUNDIAL DE QUINOA

La distribución geográfica de la producción mundial de quinoa se presenta en la Figura 5, donde se puede observar que los países con mayor producción son Bolivia, Perú y Ecuador. Sin embargo, producto de más de veinte años de trabajo que se viene desarrollando en países potenciales de Europa, Asia, África, Australia, Norte América, la producción de la quinoa se encuentra en franco proceso de expansión hacia diferentes espacios geográficos del planeta por sus extraordinarias características de adaptación y adaptabilidad abriendo una importante expectativa para suplir la falta de alimentos para la creciente población humana.



●	Ecuador - Perú – Bolivia
●	Canadá – Estados Unidos – México – Colombia – Brasil – Chile – Argentina – Suecia – Reino Unido – Francia – Países Bajos – Alemania – Dinamarca – Francia – Italia India – Kenia – Somalia - Australia

Figura 5. (FAO, 2011)

Producción de quínoa en América

La producción de quínoa generalmente se clasifica en dos grupos, un grupo lo constituye la de quínoa de grano grande y amargo que se conoce como quínoa Real y otro grupo de grano pequeño, llamada quínoa dulce. El principal producto de exportación corresponde a la quínoa Real.

Este alimento se cultiva ampliamente en la región andina como se puede observar en la figura 6, desde Colombia hasta el norte de Argentina para las condiciones de montañas de altura, aunque una variedad que se cultiva en Chile, se produce a nivel del mar.



Figura 6: Distribución de las áreas de cultivo de quinoa en Sudamérica (Tapia, 2011)

A continuación se presenta un resumen de distribución de la quinoa, de acuerdo a los países de la región y sus zonas tradicionales de producción (Rojas *et al.*, 2010):

- En Colombia en el departamento de Nariño, en las localidades de Ipiales, Puesres, Contadero, Córdova, San Juan, Mocondino y Pasto.
- En Ecuador en las áreas de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo, Loja, Latacunga, Ambato y Cuenca.
- En Perú se destacan las zonas de Cajamarca, Callejón de Huayllas, Valle del Mantaro, Andahuayllas, Cusco y Puno (altiplano).
- En Bolivia en el altiplano de La Paz, Oruro y Potosí y en los valles interandinos de Cochabamba, Chuquisaca, Potosí y Tarija.
- En Chile en el altiplano Chileno (Isluga e Iquique) y Concepción. También existen reportes de quinoas cultivadas en la Novena y Décima región.

• En Argentina se cultiva en forma aislada en Jujuy y Salta. El cultivo se amplió también hacia los Valles Calchaquíes de Tucumán.

En la figura 7, se representan las producciones de los tres países que mayor cantidad de toneladas anuales producen.

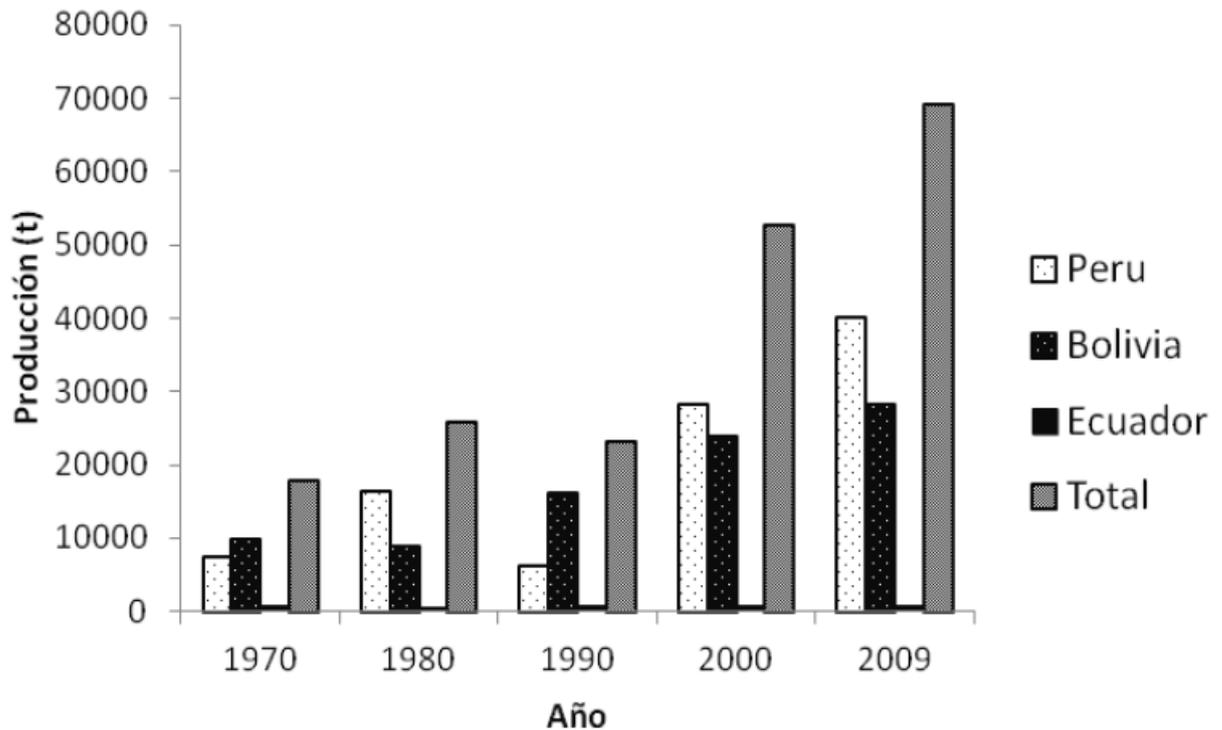


Figura 7. (FAO, 2011)

Producción de quinua en tres países Andinos en cinco años referenciales.

Fuente: Elaboración propia con datos de FAOSTAT

La industria en la Argentina

La siembra se realiza a partir de septiembre y se cosecha y trilla manualmente en abril.

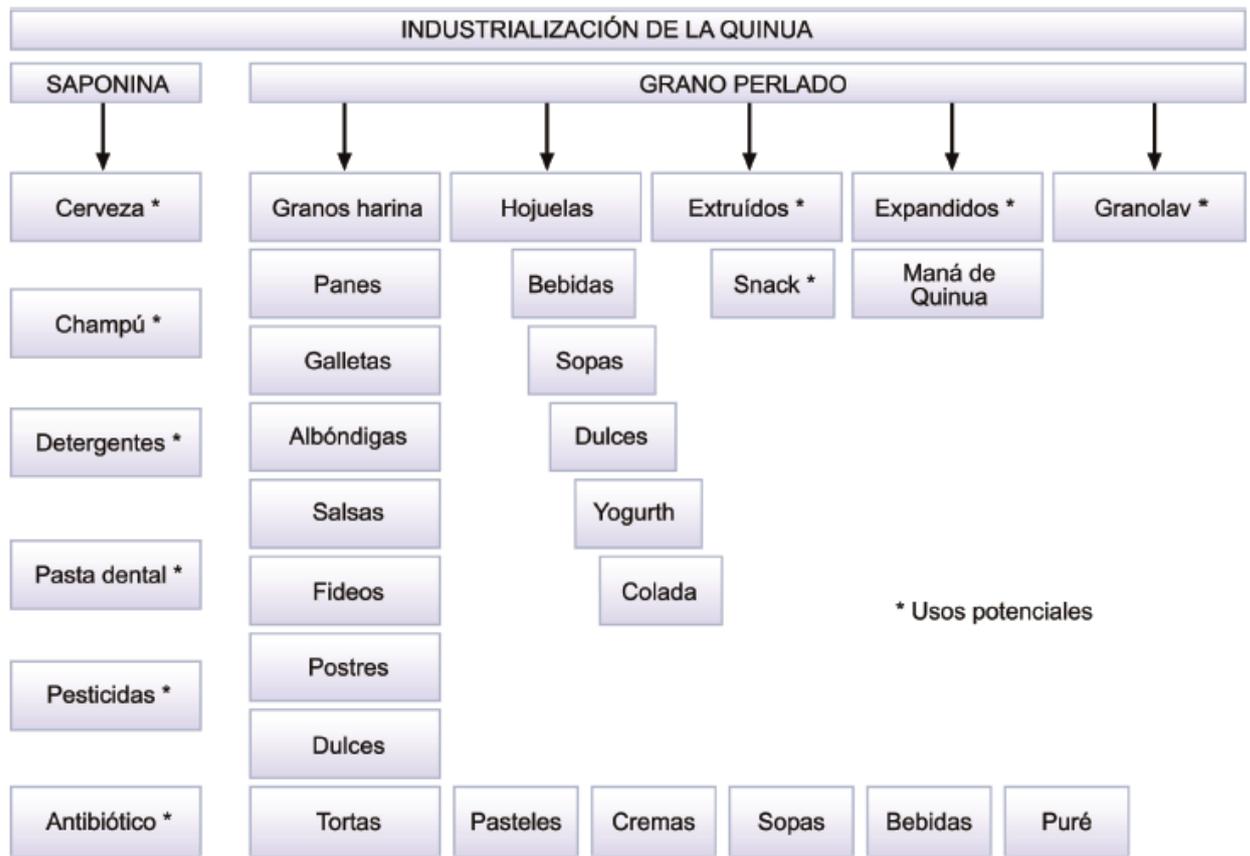
El NOA se constituye como la zona tradicional de cultivo de quinua. La producción se localiza en la Quebrada de Humahuaca y alrededores, donde existen pequeños productores que cultivan quinua para consumo propio. En la provincia de Jujuy se produce quinua con rendimientos aproximados de 2.000 kg/ha, de variedad desconocida por el productor. En esta provincia, como en otras

zonas andinas, el cultivo de quinoa se realiza con el propósito del autoconsumo de la familia campesina, siendo incipiente la producción de tipo comercial.

Con respecto a la comercialización, la quinoa se vende en los mercados locales de Jujuy y Salta proveniente de la importación o del contrabando hormiga desde Bolivia, sin identificación varietal. En términos generales el sistema comercial es informal, donde se adquiere al productor sin lavar eliminándose posteriormente la saponina a mano, lo que disminuye su calidad comercial.

En general se vende en negocios de dietéticas, envasado en bolsas plásticas de medio kilo, siendo baja la vinculación con los diferentes eslabones de la cadena. (COFECyT, 2008).

La industrialización de la quinoa puede observarse en la figura 8, la cantidad de productos que pueden elaborarse es bastante extensa.



Usos del grano de quinoa (Montoya Restrepo et al. 2005)

Figura 8. Usos del grano de quinoa

En nuestro grupo de investigación en el ICTA se desarrollaron sopas cremas e instantáneas libres de gluten a partir de harina obtenida por molienda directa de semillas de quinoa crudas y cocidas destinada a de población específicos: celíacos, niños y adultos mayores (Cervilla *et al.*, 2008 y 2009).

Barboza *et al.*, (2011), desarrollaron galletas dulces y saladas a base de harina integral de quinoa, con la intención de obtener productos que proporcionen buen aporte proteico, libres de gluten y de buena aceptabilidad al paladar.

Se emplearon conjuntamente con la harina de quinoa, otras harinas que también cumplan con la condición de estar exentas de gluten y, que a la vez, permitan obtener galletas con buenas cualidades organolépticas.

Obtuvieron harina integral de quinoa de distintas granulometrías, para su posterior utilización en la elaboración de galletas dulces y saladas libres de gluten y lograron una adecuada formulación mediante el uso de diferentes harinas sin gluten y con ingredientes permitidos.

Una vez elaboradas las galletas, establecieron la composición química (Hidratos de Carbono, Proteínas, Grasas, cenizas) y el valor energético de las galletas dulces y saladas a base de harinas libres de gluten.

Finalmente valoraron la aceptabilidad del producto desarrollado mediante un panel de degustación integrado con alumnos de la Universidad Nacional de Córdoba, en la Sala Sensorial del ICTA, considerando sabor, color, olor y consistencia, mediante una escala hedónica de cinco puntos, determinando también la preferencia entre los productos obtenidos (galleta dulce o salada). Presentaron ambas una óptima aceptabilidad.

Martini y Storani, (2010), obtuvieron almidón de quinoa y determinaron las características del mismo que sirvieren al diseño del proceso.

Desarrollaron las etapas del proceso para obtención de almidón, y la secuencia de operaciones comprendidas en cada etapa a escala de laboratorio y a escala piloto.

Obtenido el producto realizaron los análisis físicos químicos al almidón para verificar si el mismo cumplía con los requisitos establecidos por el Código Alimentario Argentino.

Si bien la semilla de quinoa se cotiza con valores superior a otras, como pueden ser el maíz o arroz, el almidón obtenido de la misma, tiene la ventaja de ofrecer ciertas propiedades relacionadas con su tamaño y composición principalmente, pudiendo cumplir con ciertos requisitos que actualmente son demandados por algunas industrias, ofreciendo a su vez, nuevas alternativas, como está comprobado, para productos congelados y polímeros.

Olmedo y Sicilia, (2011), desarrollaron “Aderezo a base de quinoa con prevalencia de ácidos grasos monoinsaturados y muy bajo en sodio”: El aderezo presentó las siguientes características nutricionales: 19% de carbohidratos, 14,5% de lípidos principalmente de ácidos grasos monoinsaturados (64%), 3,5% de proteínas, 62% de humedad y 0,6% de cenizas. El valor energético del mismo fué 222 kcal/100g y 27 kcal/por porción.

El aderezo sabor mostaza tuvo mayor aceptabilidad que el sabor apio.

Mufari, (2010) trabajó sobre la “Determinación y cuantificación de proteínas solubles y de aminoácidos totales en harinas de quinoa”

El objetivo de su trabajo fue el estudio de las proteínas solubles y aminoácidos totales en harinas de quinoa cruda y cocidas, a fin de evaluar posibles pérdidas a nivel nutricional durante el tratamiento térmico de las semillas,

Mufari *et al.*, (2012) investigaron sobre la extracción de proteínas solubles de quinoa y su caracterización basada en perfiles electroforéticos.

Previa a la elaboración de cualquier producto alimenticio en base a quinoa, es necesario realizar el desamargado de las semillas. Esta consiste en la eliminación de las saponinas. Los métodos que se pueden utilizar se tratan en el capítulo 1.

Capítulo 1

**Las saponinas de
la quinoa: propiedades**

**Los procesos de
desaponificación por vía
seca y húmeda**

1. Saponinas

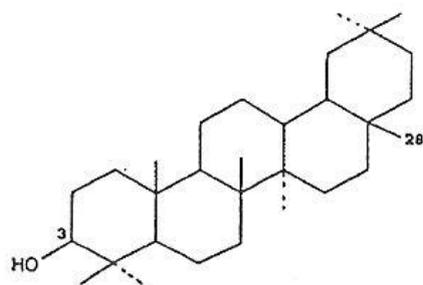
1.1. Definición: Las saponinas constituyen un amplio grupo de glucósidos encontrados en las plantas, su nombre proviene de la planta del género *Saponaria*, cuya raíz se utilizó como jabón (Sparg *et al*, 2004.), son fitoquímicos que se encuentran en una gran cantidad de vegetales. Las fuentes más conocidas de saponinas son los guisantes, la soja, y algunas plantas con nombres que indican la propiedad de formar espuma como la *Quillaja saponaria*, saoproot, soapbark y jaboncillo. Justamente de esto se deriva el nombre de estas sustancias ya que en latín “sapo” significa jabón.

Pueden ser de glucósidos esteroides o triterpenoides, este último se encuentra más comúnmente en cultivos de plantas superiores (Francis *et al.*, 2002).

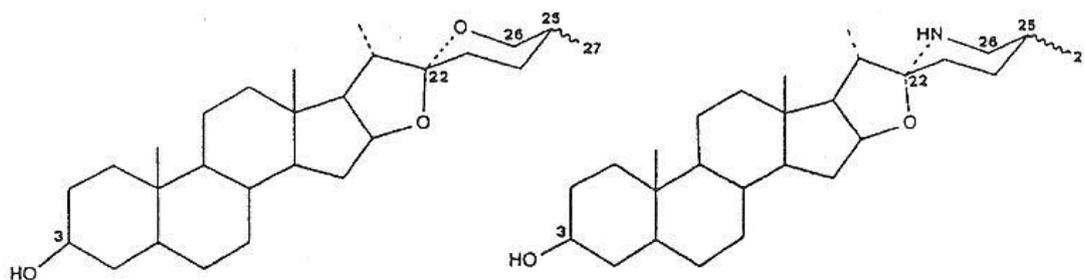
Las saponinas de quinoa se concentran en el exterior de las capas del grano, el cual es un aquenio con un pericarpio adherido cubriendo dos capas como si fueran un revestimiento de la semilla (Varriano-Marston y DeFrancisco, 1984). Las estimaciones del contenido de saponinas en los granos en diferentes cultivares de quinoa van desde valores próximos a 0 a 12,0 mg/g (0 a 1,2%) según (Wahli, 1990; Koziol, 1991). Sin embargo Szakiel *et al.*, 2011 consideran que el contenido de saponinas oscilan entre el 0,1 y el 5%. Las diferencias en el contenido de saponinas que se encuentran en la bibliografía se deben a factores ambientales y/o genéticos.

Son glucósidos de alto peso molecular que consisten de una azúcar ligada a un núcleo policíclico. La definición clásica de “saponina” se basa en sus propiedades tensioactivas, formando en agua espumas estables. Esto hace que presenten actividad hemolítica, sean tóxicas para los peces y además de tener un sabor amargo. Sin embargo, estas propiedades no son comunes a todas las saponinas y no se pueden utilizar para definir lo que es una “saponina”. Por eso es más conveniente definir las por sus características estructurales. Las saponinas están formadas por una aglicona policíclica unida a una o más cadenas laterales de azúcares. La aglicona, o porción no sacárida de la molécula de saponina se denomina sapogenina o genina, y puede ser un esteroide (C27), o un alcaloide esteroidal (C27) o un triterpeno (C30). La capacidad de formación de espuma de

las saponinas es causada por la combinación de la sapogenina hidrófoba y un azúcar hidrófilo.



Clase triterpénica



Clase esteroidal

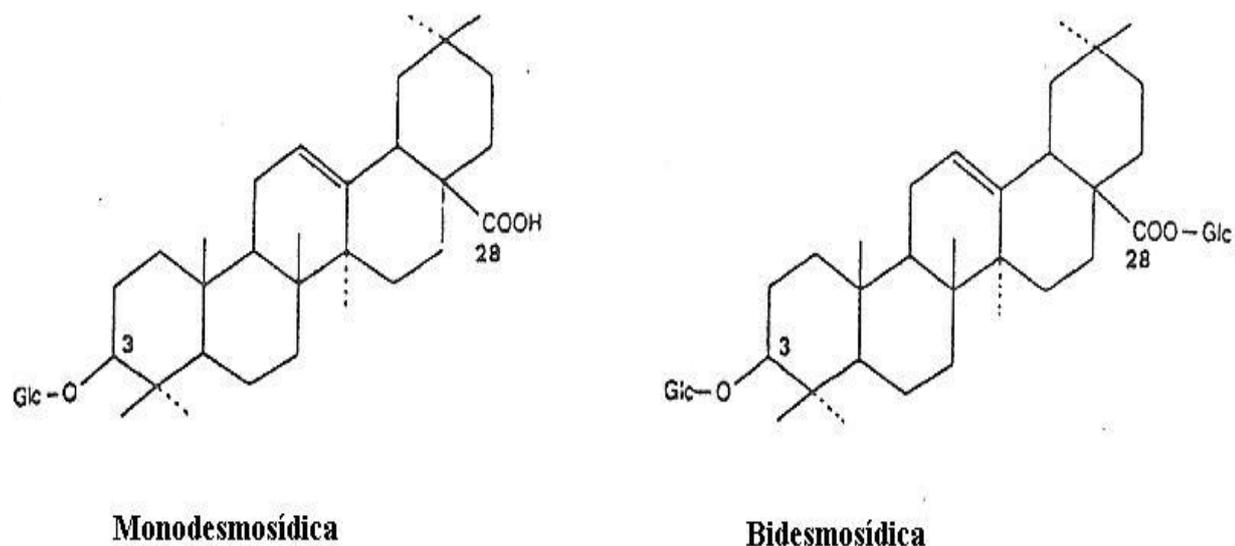
Clase alcaloide esteroidal

Tipos de esqueletos de geninas encontradas en las 3 clases principales de saponinas

Figura 9. Tipos de geninas en las tres clases principales de saponinas (Hostettmann y Marston, 1995).

Todas las saponinas presentan una o más cadenas de hidratos de carbono unidas a la aglicona.

Cuando presentan una sola cadena de hidrato de carbono, normalmente unida al **C-3** se denominan monodesmosídicas, pueden ser dos cadenas una unida al **C-3** y la otra (en saponinas triterpénicas) al **C-28** y se denominan bidesmosídicas. Muy rara vez se encuentran saponinas tridesmosídicas. Las saponinas bidesmosídicas se transforman fácilmente en monodesmosídicas por hidrólisis del azúcar esterificado en el **C-28**.



Saponinas monodesmosídica y bidesmosídica

Figura 10: Saponinas mono y bidesmoscídicas (Hostettmann y Marston, 1995).

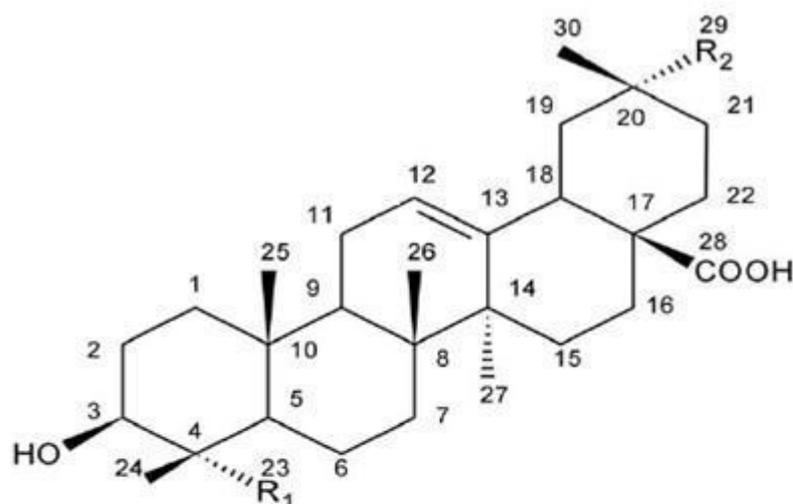
Los monosacáridos más comúnmente unidos a la aglicona son: D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), ácido D-glucurónico (GlcA), ácido D-galacturónico (GalA), L-ramnosa (Rha), L-arabinosa (Ara), D-xilosa (Xyl) y D-fucosa (Fuc). (Hostettmann y Marston, 1995).

1.2. Saponinas de la quinoa

Las saponinas de la quinoa son de agliconas triterpénicas:

Las cuatro estructuras principales de agliconas que se han identificado en las semillas de quinoa son: ácido oleanólico, hederagenina, ácido fitolacagénico, y ácido serjánico (30-O-methylspergulagenato) (Zhu *et al.*, 2002). Ver Figura 11.

En lo que respecta a los carbohidratos principales, estos son glucosa, arabinosa y galactosa. Además, 20 saponinas triterpénicas se han aislado de diferentes partes de *Chenopodium quinoa* (flores, frutos, cubiertas de las semillas y las semillas) (Kuljanabhagavad *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2002).

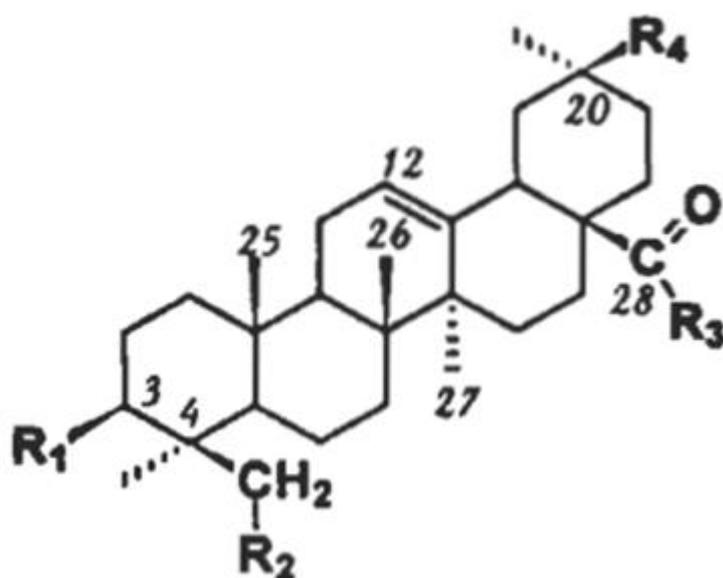


Aglicona	R₁	R₂
Ácido oleanólico	CH ₃	CH ₃
Hederagenina	CH ₂ OH	CH ₃
Ácido fitolacagénico	CH ₂ OH	COOCH ₃
Ácido serjánico	CH ₃	COOCH ₃

Agliconas de saponinas triterpénicas de *Chenopodium quinoa*

Figura 11. (Madl *et al.*, 2006)

Woldemichael y Wink, (2001), determinaron partiendo de extractos metanólicos de la semilla de quinoa purificado por HPLC por FAB MS (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry) es una técnica analítica en la cual las moléculas (con masas moleculares relativas no superiores a 1500) se ionizan por bombardeo con iones positivos de cesio o xenón acelerados con un campo eléctrico de 5 a 20 keV y por espectrometría de masas se determinó la masa molecular relativa del ion padre, la cual dio 817,4371, la que corresponde a: C₄₂H₆₆O₁₄. Realizaron la hidrólisis ácida de las saponinas formando un precipitado que contiene las agliconas, quedando en solución los carbohidratos- Por MS (espectrometría de masa) se determinó las masas moleculares relativas de los mismos, lo cual permite identificar los carbohidratos. En el precipitado se determinaron por MS y NMR las masas moleculares relativas y las clases de agliconas. En la siguiente tabla se pueden observar los resultados que obtuvieron:



1	R ₁ =GlcA	R ₂ =H	R ₃ =Glc	R ₄ = CH ₃
1a	R ₁ =GlcA	R ₂ =H	R ₃ =H	R ₄ = CH ₃
2	R ₁ =Ara	R ₂ =OH	R ₃ =Glc	R ₄ = CH ₃
2a	R ₁ =Ara	R ₂ =OH	R ₃ =H	R ₄ = CH ₃
3	R ₁ =Ara(3←1)Glc	R ₂ =OH	R ₃ =Glc	R ₄ = CH ₃
3a	R ₁ =Ara(3←1)Glc	R ₂ =OH	R ₃ =H	R ₄ = CH ₃
4	R ₁ =Ara	R ₂ =OH	R ₃ =Glc	R ₄ =COOCH ₃
4a	R ₁ =Ara	R ₂ =OH	R ₃ =H	R ₄ =COOH
5	R ₁ =Ara(3←1)Glc	R ₂ =OH	R ₃ =H	R ₄ =COOCH ₃
6	R ₁ =Ara(3←1)Glc	R ₂ =OH	R ₃ =Glc	R ₄ =COOCH ₃

- 1: 3-O-β-D-ácido glucopiranosil oleanólico-28-O- β -D-glucopiranosil éster
 2: 3-O-α-L-arabinopiranosil hederagenina-28-O- β -D-glucopiranosil éster
 3: 3-O-β-D-ácido glucopiranosil-(1→3)-α-L-arabinopiranosil hederagenina-28-O- β -D-glucopiranosil éster
 4: 3-O-α-L-ácido arabinopiranosil fitolacagénico-28-O- β -D-glucopiranosil éster
 5: 3-O-β-D-ácido glucopiranosil-(1→3)—O-α-L-ácido arabinopiranosil fitolacagénico
 6: 3-O-β-D-ácido glucopiranosil-(1→3)—O-α-L-ácido arabinopiranosil fitolacagénico-28- O- β -D-glucopiranosil éster

Figura 12. Estructuras de las saponinas triterpénicas de quinoa. (Woldemichael y Wink, 2001)

La principal sapogenina es el ácido oleanólico Burnouf-Radosevitch, (1984); Dini *et al.*, (2000), encontraron varias saponinas, algunas de las cuales no habían sido aisladas antes en la quinoa. Todas estaban constituidas por alguna de las cuatro sapogeninas mencionadas.

Las cuatro saponinas más importantes en la quinoa, son según Kuljanabhadgavad *et al.*, (2008), las siguientes:

1: Aglicón: ácido fitolacagénico, sustituyente en el C-3 β -D-Glc (1 \rightarrow 3)- α -L-Ara, se puede ver en la figura 13.

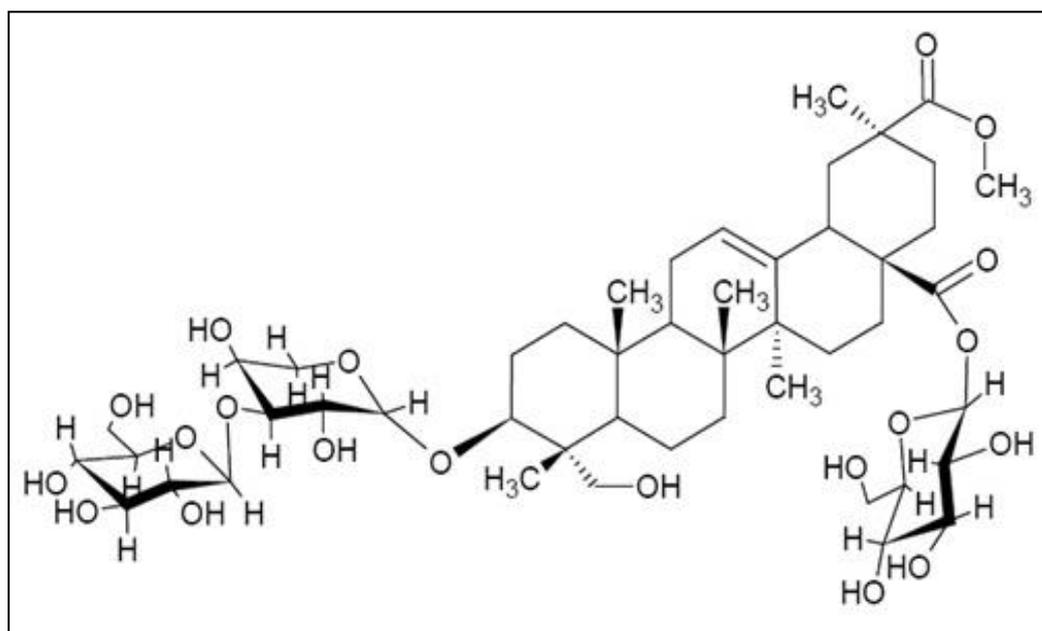


Figura 13. Fórmula química: $C_{48}H_{76}O_{20}$

2: Aglicón: ácido fitolacagénico y un sustituyente en el carbono 3: α -L-Ara se puede ver en la figura 14.

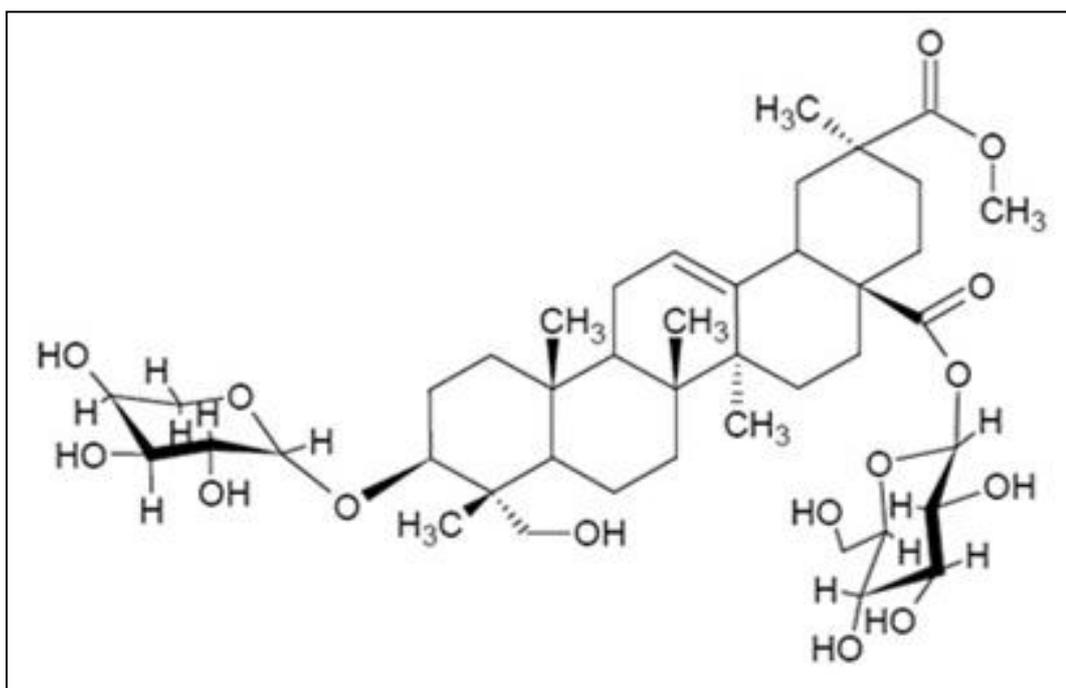


Figura 14. Fórmula química: C₄₂H₆₆O₁₅

3: Aglicón: hederagenina y con un sustituyente en el carbono 3: β-D-Glc (1
3)-α-L-Ara, ver en la figura 15.

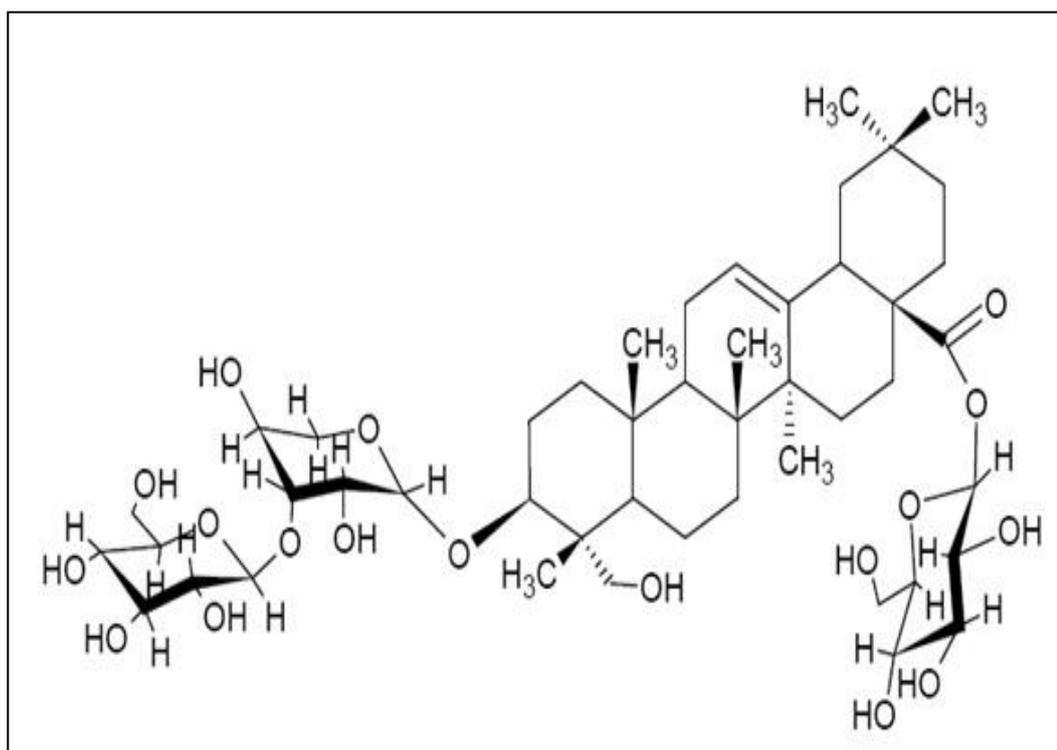


Figura 15. Fórmula química: C₄₇H₇₆O₁₈

4: Aglicón del ácido oleanólico con un sustituyente en el carbono 3: β -D-GlcA. Ver en la figura 16.

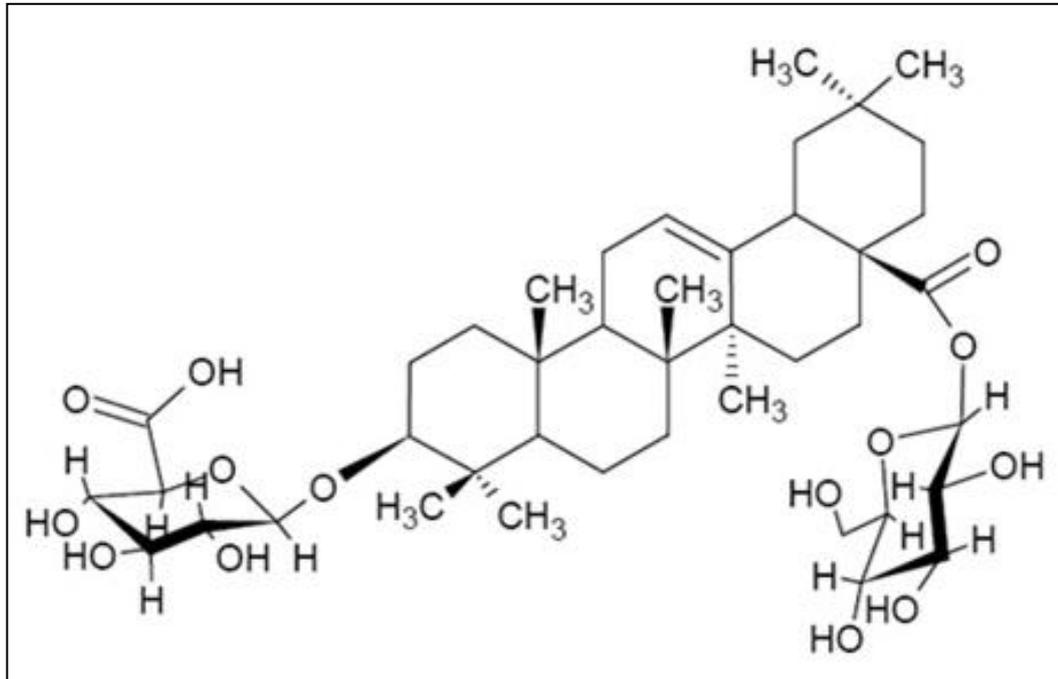


Figura 16. Fórmula química: $C_{42}H_{66}O_{14}$

En todos los casos las saponinas tienen como sustituyente en el carbono 28 una molécula de glucopiranosas.

Las saponinas se encuentran en muchas especies de las plantas, por ej. espinaca, espárrago, alfalfa y frijol de soya. El contenido de las saponinas de la quinoa varía de acuerdo al ecotipo.

1.3. Bioactividad de las saponinas de quinoa

Una importante propiedad de las saponinas es su actividad anti fúngica. Se ha comprobado que las saponinas inhiben el crecimiento de *Candida albicans* (Woldemichael y Wink, 2001), las saponinas tratadas con álcali también tienen una significativa actividad anti fúngica sobre la *Botrytis cinérea* (Stuardo & San Martín, 2008).

Muestran además propiedades insecticidas (se estudió la actividad insecticida de las saponinas de quinoa sobre *Drosophila melanogaster*.) molusquicida, y antibióticas, (Reilly *et al.*, 2004 y que Las saponinas disminuyen la tensión

superficial, es decir son sustancias tensioactivas y además poseen propiedades emulsificantes.

Algunas tienen efecto hemolizante en los glóbulos rojos, esta propiedad la presentan las saponinas monodesmosídicas (Woldemichael y Wink, 2001), La hemólisis se puede producir debido a interacciones de las saponinas con las membranas, que producen poros que llevan a la rotura de la misma. (Seeman *et al.*, 1973).

Las saponinas tienen propiedades anticarcinogénicas y estimulan el sistema inmune (Li *et al.*, 2002). El ácido oleanólico, uno de los cinco componentes mayoritarios de las saponinas de quinoa, muestra una significativa actividad antitumoral en células de colon (Estrada *et al.*, 1998).

En la actualidad se ha determinado que las saponinas tienen beneficiosas propiedades para la salud, entre las cuales se pueden mencionar diversos efectos biológicos: por su actividad antiviral, como analgésico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, y cito tóxico, tiene un importante efecto sobre la absorción de minerales y vitaminas, produce efecto inmunoestimulador, aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal y tiene acción neuroprotectora. Además actúa como hipolipemiente (Güçlü-Üstündag and Mazza, 2007).

Por lo anteriormente expuesto se puede afirmar que las saponinas tienen importantes aplicaciones en el campo industrial y farmacéutico.

La quinoa puede ser clasificada de acuerdo a la concentración de saponinas como: dulce (libre de saponinas o contenido menor de 0,11 % de saponinas libres en base a peso fresco) o amarga (más de 0,11 % de saponinas) (Koziol, 1992).

Según (Szakiel *et al.*, 2011) el contenido de saponinas en las semillas de quinoa oscila entre el 0,1 y el 5% dependiendo de la variedad y de factores ambientales abióticos.

Las saponinas se caracterizan, además de su sabor amargo, por la formación de espuma en soluciones acuosas. Forman espumas estables en concentraciones muy bajas, 0,1 %, y por eso tienen aplicaciones industriales en bebidas, como la cerveza, en la formulación de shampoo, jabones, en la industria cosmética, en extinguidores de espuma para incendios, en fotografía, etc. Además las saponinas se han usado en la industria farmacéutica y la agricultura (San Martín y Briones, 1999).

Las saponinas además de tener un sabor amargo son tóxicas en grandes cantidades, según la U.S. Environmental Protection Agency la $DL_{50} > 5000$ mg/kg. El sabor amargo que le confieren las saponinas desempeña una función de defensa de los granos de quinoa, ya que no son comidos por los pájaros.

Las saponinas se consideran tóxicas para diferentes organismos. (Meyer *et al.* 1990). Además, son el factor principal antinutricional presentes en la cubierta de la semilla (Ruales y Nair, 1994a, b). Estudios nutricionales *in vivo* en ratas revelaron que los animales alimentados con dietas que incluyeron quinoa no lavada mostraron alteraciones en el crecimiento. Se observó una importante reducción de la eficiencia de conversión de los alimentos impidiendo su completa asimilación (Gee *et al.*, 1996).

Vidueiros *et al.*, (2012) estudiaron dietas basadas en quinoa y su incidencia sobre la mucosa intestinal de ratas Wistar, los grupos ensayados fueron con: quinoa sin lavar, quinoa comercial lavada, comparados con caseína como grupo de control. Esto podría afectar la absorción intestinal normal de nutrientes, lo cual se refleja cuando se comparan para los grupos el peso corporal de las ratas, ingesta diaria en gramos, y la tasa de crecimiento ponderal.

Por esta razón las saponinas contenidas en la semillas de quinoa, más precisamente en el pericarpio de las semillas (Taylor & Parker, 2002) deben ser removidas antes de su consumo.

1.4. Impacto del procesamiento de la quinoa para consumo y destino de las saponinas

En la página web “*Todo sobre la Quinoa*” se menciona que “en las plantas de tratamiento de quinoa se desperdician 1200 toneladas anuales de saponinas, noticia publicada el Domingo 20 de julio de 2008”. A esto se debería agregar que las saponinas “no solo se desperdician” sino que además contaminan los cursos de agua, en el lavado manual en las vertientes y cursos de agua y que si bien no está contabilizada la pérdida monetaria por el desperdicio de las saponinas, tal vez se agregue un problema económico mucho más grave debido a la contaminación y al desequilibrio ecológico producido matando una gran parte de la fauna ictícola. Es por ello que la “eliminación” de las saponinas de las semillas de quinoa deberá

realizarse no solo sin alterar las cualidades nutricionales de la semilla sino además sin contaminar los cursos de agua.

Analizaré brevemente los métodos que se emplean para la remoción de las saponinas:

Por su estructura química, las saponinas pueden ser parcialmente eliminadas por lavado con agua (Chauhan *et al.*, 1999), pero incluso después del lavado algunas saponinas permanecen en la semilla. Zhu *et al.*, (2002), recomiendan el uso de agua ligeramente alcalina en lugar de agua neutra. Brady *et al.*, (2007), han informado que el sabor amargo puede ser reducido mediante procesos de extrusión y tostado, mientras que Bacigalupo y Tapia, (1990), sugieren el escarificado.

Por esto, los métodos de eliminación de saponinas pueden ser clasificados en: métodos húmedos, métodos secos y métodos combinados.

El lavado manual con agua requiere grandes consumos de 10 a 14 m³ de agua por cada tonelada de semillas, lo cual no es recomendable por los grandes volúmenes de agua que se utilizan y contaminan.

El método seco que consiste en la eliminación del pericarpio por abrasión, ya sea a temperatura ambiente o con calor seco. El método húmedo que consiste en lavar las semillas con agua y un tercer método que combina los dos anteriores, en este método es la semilla la que se escarifica en primer término y luego se realiza el lavado con agua para eliminar los restos de saponinas que quedaron por escarificado. (Bacigalupo y Tapia 2000)

1.4.1. Procesos por vía seca

A temperatura ambiente

Esta vía de desaponificación puede realizarse por cepillado, molienda diferencial de granos y por escarificación. Ésta última permite eliminar el pericarpio de la semilla de quinoa mediante fricción, separando el polvillo que contiene las saponinas del aquenio.

Torres y Minaya, (1980), desarrollaron un sistema que combina medios mecánicos abrasivos con paletas giratorias que golpean al grano contra tamices estacionarios

que permiten un raspado eficiente de las semillas. El polvillo que se genera pasa a través de un tamiz que separa el episperma de la semilla, las semillas escarificadas son sometidas a una corriente de aire lo que permite una eficiente separación del polvillo y de las semillas. La eficiencia y capacidad de procesamiento de la escarificadora fue del 94,6% según los autores, los contenidos de saponina en el producto final oscilan entre el 0.04 y 0.25%. En la figura debajo se puede ver un esquema de la máquina escarificadora desarrollada por Torres y Minaya, (1980).

Este método presenta en ocasiones el inconveniente que se desprende el germen del grano disminuyendo la calidad proteica del mismo, pero hasta el momento no se ha podido diseñar un equipo que permita sin tratamiento posterior, eliminar totalmente las saponinas y evitar la disminución de la calidad proteica de la semilla.

Máquina escarificadora de quinoa

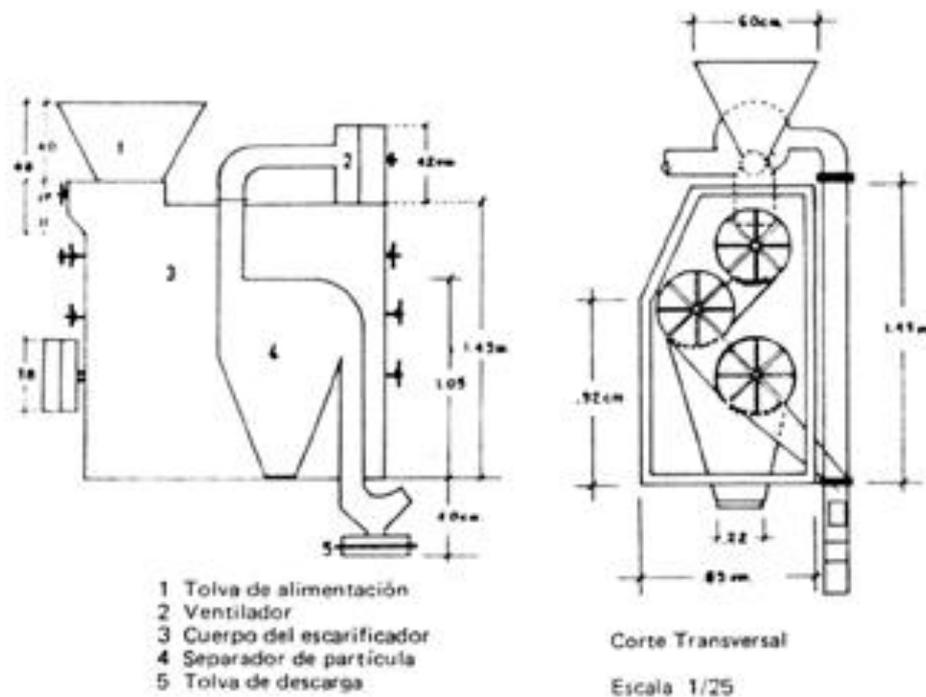


Figura 17. Máquina escarificadora (Torres y Minaya, 1980)

A temperatura mayor que la ambiente usando calor seco

En 1954, en Breña, Lima se producía harina de quinoa procesada por tostado mediante una bola de hierro que rotaba mientras se proporcionaba calor

con un quemador, posteriormente por medio de una zaranda se separaban la cascarilla tostada de la semilla. Brady *et al.*, (2007) han informado de que el sabor amargo impartida por saponinas potencialmente se podría reducir mediante procesos de extrusión y el tostado. La desventaja de estos procesos radica en la dificultad de obtener un tostado uniforme sin quemar una parte de los granos. A esto se le suma las pérdidas apreciables de nutrientes, especialmente de aminoácidos como lisina, con el uso del calor seco. (León y Rosell, 2007)

1.4.2. Desaponificado por vía húmeda

Los métodos húmedos se basan en someter al grano de quínoa a un proceso de remojo y turbulencia, en agua circulante o fija, donde la saponina se elimina por solubilización con el agua de lavado. En algunos países como Bolivia, Perú, Brasil se investigaron las condiciones óptimas de extracción de las saponinas, como tiempo de remojo, turbulencia del extractante (agua), temperatura del extractante, etc. Uno de los proyectos de procesamiento de quínoa por este método, fue el proyecto Huarina, en Bolivia, Reggiardo y Rodríguez (citado en Bacigalupo y Tapia, (1990)), en el año 1983, diseñaron un dispositivo que consistía en un tanque vertical provisto de paletas giratorias para producir turbulencia. El grano de quínoa fué sometido a un remojo inicial, seguido de agitación con turbulencia, durante de 5 a 15 minutos, y luego se realizó un enjuague final de las semillas y finalmente las semillas, fueron sometidas a un proceso de secado.

Otras investigaciones desarrollaron el proceso de extracción con agua a entre 40 y 70°C, se comprobó que a mayor temperatura era más eficiente la extracción, sin embargo, si bien a 70°C se lograba una buena extracción de saponinas, las semillas alteraron su aspecto y muchas de ellas perdieron su embrión o germen. Esto se explica por la gelatinización del almidón a 70°C, por este motivo no es conveniente superar los 50°C durante el proceso de extracción. (Scarpati y Briceño, 1982).

Zavaleta, (1982), estudió detalladamente la desaponificación de la quinoa y llegó a las siguientes conclusiones:

“- La mayor parte de la desaponificación se debe a un efecto mecánico abrasivo del solvente desplazado a alta velocidad sobre la superficie de la quinoa y no tanto, por la difusión del mismo. Consecuentemente, esta parte de la operación podría ser realizada más eficientemente utilizando la vía seca.

- El lavado debe realizarse a régimen completamente turbulento y con tiempos de contacto reducidos. Sin embargo, no debe excederse el número de Reynolds crítico de 130.000, por encima del cual se aprecia destrucción de las semillas de quinoa.

- El número de Reynolds debería quedar confinado alrededor de 50.000 con el consiguiente ahorro en la potencia destinada a la agitación, evitándose así el desplazamiento del grano de quinoa respecto al solvente; la creación de zonas de baja presión en la parte posterior de la superficie del grano de quinoa; la reducción del área efectiva de transferencia de masa y la aparición de burbujas pequeñísimas que eliminan la homogeneidad del solvente, creando zonas inactivas para la transferencia de masa.

- Tiempos prolongados de extracción de saponinas de quinoa con agua no mejoran sustancialmente el rendimiento de extracción y eventualmente pueden bajarlo, acarreado además la desventaja de producir niveles muy elevados de hidratación ligada del grano de quinoa, lo que implica mayores gastos para el secado.

- Independientemente de las condiciones que se utilicen al aplicar exclusivamente la vía húmeda, una sola pasada no sería suficiente para rebajar el contenido de saponinas de quinoa Real a un nivel aceptable para el consumidor.

- El contenido porcentual de humedad de la quinoa inmediatamente posterior a su tratamiento puede llegar al 27%. A estos niveles de hidratación, los secadores solares o inclusive la exposición directa al ambiente pueden resultar suficientes como medios de secado, sin peligro de germinación precoz del grano de quinoa.”

1.4.3. Desaponificado por método combinado

Lo que menor contenido de saponinas deja en la semilla es una combinación del proceso de escarificado y posteriormente de extracción por vía húmeda, dando mejores resultados que por vía húmeda o seca, por otra parte al aplicar el método combinado se produce un significativo ahorro del volumen de agua empleado en el proceso, y una reducción de la ruptura de los granos. Este proceso combinado fue perfeccionado exitosamente en Ecuador y en Oruro, Bolivia (Bacigalupo y Tapia, 2000). Mediante el escarificado se elimina alrededor del 65% de la saponina, luego la quinoa pasa al proceso de lavado y a un secado final. En este caso, el agua de lavado, a pesar de no tener una alta concentración de saponinas, es sometida a un proceso de filtración antes de ser vertida en el sumidero.

HIPÓTESIS

Es posible desarrollar métodos de extracción de saponinas de las semillas de quinoa a escala de laboratorio, que reduzcan considerablemente el tiempo de extracción de los métodos clásicos utilizados.

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo general de la presente Tesis fue determinar las condiciones óptimas de extracción de saponinas de semillas de quinoa por métodos no clásicos para luego cuantificar la misma por un método analítico.

Objetivos Específicos

1. Diseñar y desarrollar a escala de laboratorio un reactor para extracción con microondas de las saponinas de las semillas de quinoa.
2. Determinar las condiciones óptimas de extracción con microondas de las saponinas.
3. Diseñar y desarrollar a escala de laboratorio un reactor para extracción a alta presión de las saponinas de las semillas de quinoa.
4. Determinar las condiciones óptimas de extracción a alta presión de las saponinas de las semillas de quinoa.
5. Desarrollar un procedimiento que partiendo de las soluciones de saponinas provenientes de las extracciones de las semillas de quinoa, permita obtener un concentrado de saponinas.
6. A partir del concentrado, desarrollar un procedimiento para obtener saponinas de quinoa purificadas.

7. Establecer el procedimiento más conveniente para obtener cristales de saponinas de alta pureza.

Capítulo 2

**Extracción de las
saponinas asistida
por microondas**

**Determinación de las
condiciones óptimas de
extracción**

EXTRACCIÓN CON MICROONDAS

2.1. MATERIALES y MÉTODOS

2.1.1. Material Vegetal

Las semillas utilizadas en este trabajo, quinoa variedad CICA, fueron cosechadas en el año 2009 en La Poma, Provincia de Salta, Argentina localizada entre los 65° 56´ y 66° 33´ de longitud oeste y entre los 23° 20´ y 24° 55´ de latitud sur.

Las semillas embolsadas en lugar de origen en envases de 30 kg fueron mezcladas uniformemente y muestreadas por cuarteo.

2.1.2. Materiales y equipos

A la muestra tomada para los ensayos se les eliminó impurezas tales como palillos, piedritas, semillas partidas, etc. Para ello se utilizaron una serie de 3 tamices montados en el vibrador, pertenecientes a la Planta Piloto del ICTA y el colector, como se puede ver en la Foto 6



Foto 6. Vibrador con tamices

Los tamices utilizados fueron, de acuerdo a las normas ASTM: N° 8 de 2380 μm de apertura, el N° 16 de 1160 μm y el N° 20 de una apertura de 841 μm .

Antes de ser embolsadas las semillas se secaron a la temperatura de 50°C con un secador en lecho fluidizado, de la Planta Piloto del ICTA (Foto7). Luego se almacenaron en bolsas selladas de polietileno hasta el momento de su utilización.



Foto 7. Secador en lecho fluidizado

2.2 Calentamiento por microondas

2.2.1 Introducción

Las microondas son radiaciones electromagnéticas no ionizantes, no causan cambios en la estructura molecular pero producen movimientos, como la migración de iones o la rotación de dipolos de moléculas, que generan colisiones moleculares, dando como resultado que algunas sustancias se calienten. Si bien

las microondas tienen frecuencias comprendidas entre 300 MHz a 300 GHz (lo que corresponde a longitudes de onda comprendidas entre 1 m y 1 mm, la frecuencia más usada a nivel industrial y dispositivos domésticos es de 2,45 GHz (Lidström *et al.*, 2001).

La utilización de las microondas para la extracción de compuestos orgánicos se desarrolló por primera vez utilizando un horno de microondas doméstico a finales de la década de los 80 (Ganzler *et al.*, 1986).

La interacción entre la energía de la microonda y el medio depende de las propiedades dieléctricas de la sustancia que se está calentando y de la cantidad de radiación de microonda que puede penetrar una sustancia.

Los materiales conductores de la electricidad no se calientan bajo la acción de las microondas y las reflejan completamente; los materiales aislantes como el vidrio y el teflón tampoco se calientan y dejan pasar completamente esta energía, y los materiales dieléctricos los absorben y se calientan. La medida de este comportamiento es el coeficiente dieléctrico ϵ_r , que es característico para cada sustancia y su estado, es un número complejo $\epsilon_r = \epsilon_r' + i \epsilon_r''$ representa la capacidad de un material para almacenar energía eléctrica bajo la influencia de un campo eléctrico. ϵ_r'' cuantifica la eficiencia con la cual la energía absorbida es convertida en calor.

La capacidad de los materiales de absorber la energía de microondas y convertirla en calor depende de ambos parámetros y es llamado factor de disipación, relacionados mediante la ecuación:

$$\tan \delta = \frac{\epsilon_r''}{\epsilon_r'}$$

Cuanto mayor es la constante dieléctrica, mayor es la energía térmica desprendida y, por ende, más rápido es el calentamiento. La capacidad de un disolvente para absorber la energía de microondas y transferir el calor a otras moléculas depende en parte del factor de disipación ($\tan \delta$). (Nüchter *et al.*, 2004).

La extracción asistida por microondas (MAE) utiliza la radiación de microondas como fuente de calentamiento de la muestra y del disolvente. Debido a los efectos particulares de las microondas sobre la materia (es decir rotación

dipolar y la conductancia iónica), la calefacción con microondas es muy rápida y se produce en el seno de la muestra, dando lugar a extracciones muy rápidas.

El calentamiento dieléctrico puede resultar de la polarización dipolar como consecuencia de la interacción dipolo-dipolo de moléculas polares con el campo electromagnético, que origina disipación de energía como calor, debido a la agitación y fricción generadas cuando los dipolos cambian de orientación mutua por la alternación del campo eléctrico a alta frecuencia. Los iones se moverán bajo la influencia del campo eléctrico, resultando en un aumento de energía debido a un incremento en la velocidad de colisión, convirtiendo la energía cinética en calor, ver Figura 18 (Perreux y Loup, 2001).

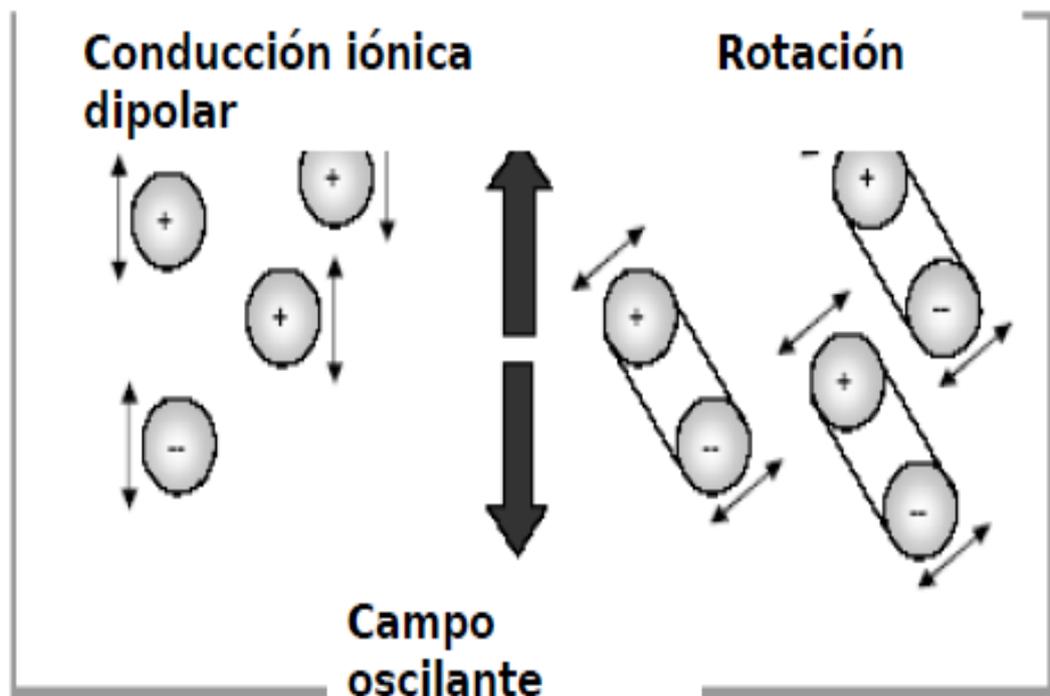


Figura 18. Movimiento de iones y dipolos en un campo oscilante

En la figura 19 se puede observar un esquema de extracción con microondas que son producidas por el magnetrón. También se ve una celda cerrada de extracción.

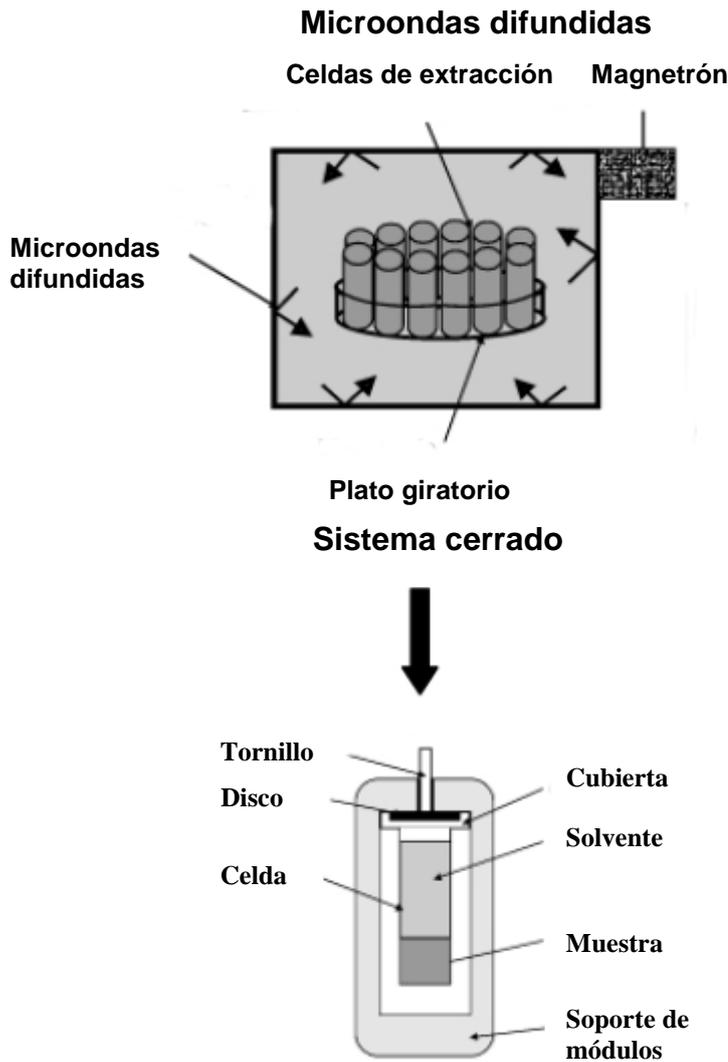


Figura 19. Principio de la extracción asistida con MO (Camel, 2001)

2.2.2. Viscosidad

La viscosidad es un parámetro importante ya que afecta al tiempo de relajación de forma directa, (requerido para que un sistema que está sometido a irradiación por microondas regrese a su estado de desorden; cuanto menor sea el tiempo de relajación mayor va a ser la eficiencia de absorción de las microondas para convertirse en calor). (Gabriel *et al.*, 1998).

$$\tau = \frac{4\pi r^3 \eta}{k T}$$

τ = Tiempo de relajación
 k = Constante de velocidad

η = viscosidad
 r = Radio molecular

T = Temperatura

El campo electromagnético generado por el magnetrón hace rotar a las moléculas de agua o que contengan el dipolo O-H, la orientación del campo electromagnético cambia 2.450.000 veces por segundo por lo cual las moléculas de agua (qué rotan) se calientan debido a la agitación molecular y el calor producido está relacionado de manera directa con la agitación molecular. (Valderrama, 2008)

2.2.3. Dispositivo experimental

El reactor utilizado para la extracción está compuesto por el sensor de temperaturas del microondas, ver Foto 8.



Foto 8. Sensor de temperatura del microondas

Un frasco de gruesas paredes Schott DURAN de 50 mL que resiste presiones de hasta 5 bar, Foto 9.



Foto 9. Frasco Schott

Una tapa torneada de Teflón provista de 2 aros sellos para evitar que escapen los vapores del solvente extractante, (Foto 10).

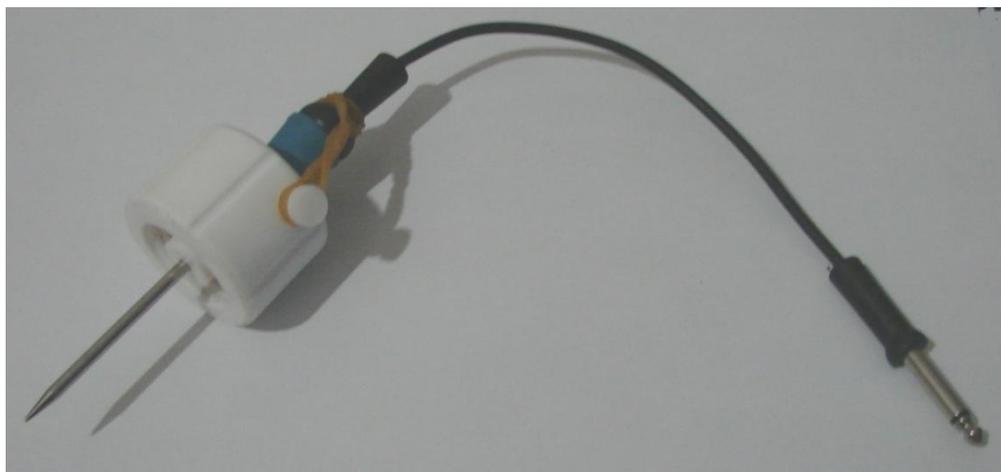


Foto 10. Tapa de Teflón con sensor de temperatura

En la foto 11 se puede observar una cámara protectora como medida de seguridad en el eventual caso de una explosión del reactor evitando la proyección de los trozos de vidrio. Fue hecha con una botella de gaseosa de PET de paredes gruesas, a la cual se le hicieron orificios, para que en, caso de rotura del reactor, los gases se puedan expandir fácilmente.



Foto 11. Cámara protectora

Todo el conjunto armado para realizar la extracción, se puede ver en la Foto 12. El reactor se introduce en el microondas con la cámara de protección colocada como se puede observar en la siguiente foto.

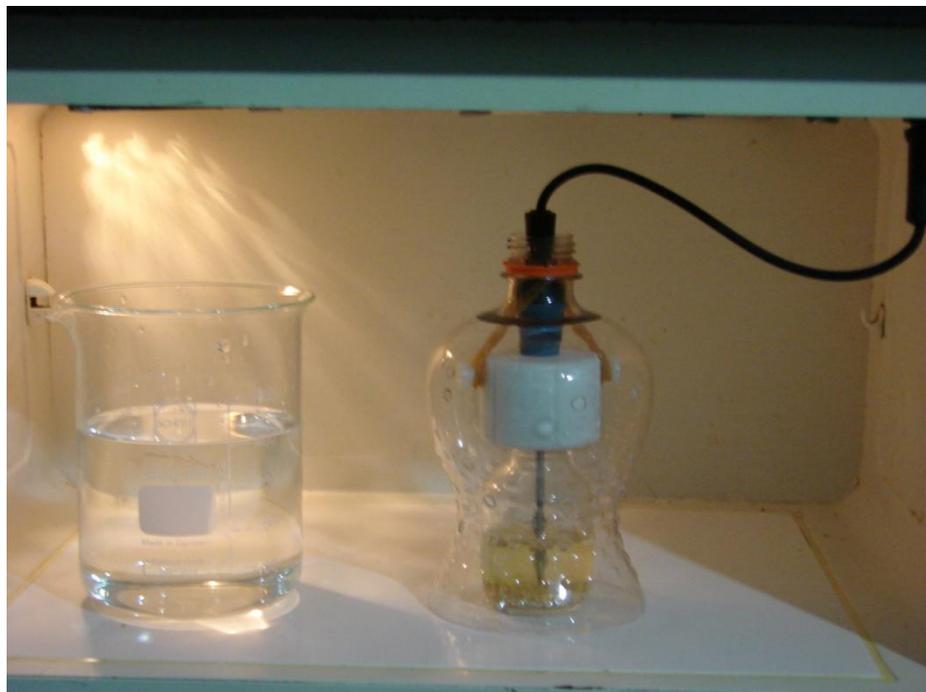


Foto 12. Conjunto armado en microondas

El microondas utilizado es un BGH Quick Chef 16650, que no tiene bandeja giratoria. La potencia del microondas es de 900 Watios y la masa del reactor con las semillas (entre 1 y 2 gramos) y el solvente extractante (entre 10 y 40 mL) tienen juntos una capacidad calorífica muy pequeña. Para poder mantener la temperatura constante, cuando se alcanza la temperatura consignada el magnetrón deja de emitir microondas y vuelve a hacerlo cuando la temperatura disminuye trabajando de manera pulsante. Al ser la capacidad calorífica tan pequeña el pulso de microondas generado por el magnetrón aumenta la temperatura en el reactor muy por encima de la consignada, ya que estos aparatos están destinados a cocinar alimentos que poseen capacidades caloríficas mucho mayores. Por este motivo, para controlar la temperatura se determinó experimentalmente que era necesario colocar un vaso de precipitación de vidrio con 400 mL de agua a temperatura ambiente (cantidad determinada empíricamente), además de seleccionarse distintos Niveles de cocción (ver Tabla 4).

T real	T seteada	Nivel de cocción
50°C	37°C	10%
60°C	50°C	20%
70°C	66°C	30%
80°C	77°C	60%
90°C	87°C	90%
95°C	90°C	100%

Tabla 4 Temperatura real y temperatura de consigna en el MO

En la siguiente fotografía puede observarse el microondas con la puerta cerrada. Cuando en el display aparece “hold” se empieza a cronometrar el tiempo, finalizado este, se abre la puerta para detener el funcionamiento del microondas.



Foto 13. Microondas utilizado

2.3.1. Reactivos utilizados

Alcoholes etílico e isopropílico calidad reactivo analítico y agua destilada para preparar los solventes extractantes (mezclas hidroalcohólicas).

2.4. Extracción con microondas

Entre las principales ventajas de la extracción asistida por microondas se destacan que los tiempos de extracción por lo general no superan los 20 o 30

minutos, entre otras cosas porque en principio se calienta el solvente extractante y no el recipiente que lo contiene. Además, hace uso de pequeños volúmenes de disolventes orgánicos, entre los 20 y los 50 mL (Chee *et al.*, 1996).

La EAM (Extracción asistida con microondas) ha sido utilizada para la extracción de compuestos biológicos activos a partir de diferentes materiales (Ganzler *et al.*, 1986). Más recientemente, los investigadores desarrollaron métodos de extracción de fitoquímicos con microondas, como en la extracción de taxanos a partir de biomasa de *Taxus*. (Mattina *et al.*, 1997), extracción de saikosaponinas de las raíces de *Blupearum falcatum* (Kwong *et al.*, 2006), extracción de ginsenosidos a partir de la raíz de ginseng (Youn *et al.*, 2003), extracción de aceites esenciales de Cardamomo (Marie *et al.*, 2007).

2.4.1. Optimización de las condiciones de extracción

En la optimización de las condiciones de extracción, los parámetros a tener en cuenta fueron: composición y volumen del disolvente, temperatura, potencia de microondas, tiempo de extracción y características de la matriz.

El disolvente es comúnmente de naturaleza orgánica con capacidad de absorber energía de microondas, o mezclas de disolventes para asegurar la adecuada combinación de características de solvatación y susceptibilidad al calentamiento por microondas.

La temperatura es un parámetro de gran importancia ya que la velocidad de extracción depende de ella y debe controlarse adecuadamente para no superar valores que produzcan la descomposición de sustancias termolábiles. En recipientes cerrados, el disolvente puede calentarse por arriba de su punto de ebullición, y así, de esta forma se produce un aumento en la eficiencia de la extracción y un aumento de la velocidad del proceso de extracción. Sin embargo, temperaturas elevadas podrían ocasionar la descomposición de la sustancia a extraer.

Es sumamente importante determinar el tiempo óptimo. Tiempos demasiado breves pueden disminuir la eficiencia de la extracción, mientras que los demasiados largos pueden provocar la degradación de algunos compuestos.

La optimización de las condiciones de la Extracción Asistida por Microondas (EAM) fue investigada empleando diseños factoriales para encontrar las condiciones óptimas de extracción (Eguizabal *et al.*, 1998) .

La EAM ha sido aplicada con éxito para diversos tipos de compuestos y de muestras. En una revisión realizada por Eskilsson y Bjorlund, (2000), se describen una interesante serie de aplicaciones analíticas.

2.4.2. Metodología

La extracción asistida con microondas (EAM), es un método extractivo relativamente nuevo y con un gran impulso en estos últimos tiempos. Consta básicamente en poner en contacto una matriz que contiene un compuesto de interés con un solvente adecuado, el cual es calentado por la energía de las microondas.

Las microondas presentan una ventaja en cuanto a velocidad de calentamiento y evitan el sobrecalentamiento en algunas zonas de la muestra, que podría producir una desnaturalización de sustancias termolábiles. El tiempo es uno de los mayores atractivos de esta técnica, ya que se obtienen buenos rendimientos en tiempos cortos.

El objetivo de esta parte de la investigación fué analizar la eficiencia de extracción de saponinas de la semilla de quinoa, mediante una adecuada combinación de las variables operativas, en combinación con la radiación de microondas, para lograr extracciones en tiempos más breves que en los métodos clásicos de extracción sólido-líquido, como el método de Soxhlet.

Se ensayaron distintos sistemas extractivos con microondas a saber:

- a- Mezclas etanol-agua
- b- Mezclas isopropanol-agua

El tipo de extracción fue sólido – líquido, siendo el sólido el fruto entero, y el líquido, las mezclas previamente mencionadas. Se descartó la utilización de metanol y de alcoholes superiores por que dejan residuos tóxicos en las semillas.

Las variables intervinientes en la extracción fueron cuatro: 1- Temperatura, 2- Composición del solvente, 3- Tiempo de contacto y 4- Relación volumen de solvente / peso de frutos.

Respecto a la temperatura fue variada entre 50 y 95°C. Cuidando no sobrepasar el límite superior debido a que las saponinas comienzan a descomponerse por encima de los 90°C (Yi *et al.*, 2007).

2.4.3. Procedimiento de extracción con equipo microondas

Para las extracciones con microondas, el procedimiento operativo fue el siguiente:

- 1- Introducción de aproximadamente 1 gramo pesado con una precisión de 0,1 mg de frutos enteros en el reactor y luego se tomó el peso conjunto: muestra más reactor.
- 2- Agregado de una cierta cantidad y tipo de solvente, determinados según el experimento.
- 3- Pesada del reactor con semilla y solvente.
- 4- Tapado del reactor.
- 5- Introducción en el MO con el sensor de temperatura conectado al equipo de microondas.
- 6- Programación de la potencia y de la temperatura de operación del equipo.
- 7- Cierre del equipo e inicio de la operación.
- 8- Conteo del tiempo de operación a partir del momento que el equipo indicó que la temperatura en el microondas es la programada (aparece en el display "Hold").
- 9- Finalizado este tiempo se abrió la puerta deteniendo así el funcionamiento del equipo.
- 10- Enfriado del reactor con agua corriente.
- 11- Pesada del reactor a temperatura ambiente y sin tapa.
- 12- Separación de extracto y semillas por filtración a través de una membrana de tamaño de poro de 0,2 μm , como puede observar en la siguiente fotografía.



Foto 14. Jeringa con filtro(Merck Millipore)

Es importante destacar que el reactor con los frutos y el solvente se pesan antes y después de la extracción en una balanza analítica, con la finalidad de asegurar que no haya pérdida de solvente en la operación.

2.5. Cuantificación de saponinas

En el extracto se puede determinar el contenido de saponinas de diversas maneras (espectrofotometría, cromatografía gaseosa, cromatografía líquida de alta presión, etc.). En esta investigación la determinación se realizó por derivatización de las saponinas y medición de su absorbancia en la parte visible del espectro a 528 nm.

Para la cuantificación de las saponinas en el extracto se derivatizaron mediante la reacción de Libermann-Burchard, (Monje *et al.*, 2006): “Para dar coloración a la solución de saponina total extraída se utiliza el reactivo de color que es una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico en una proporción de 1:5 (16,7 %). La proporción de la muestra con el reactivo de color 1:3,5 (22,23%). La muestra fué leída a una longitud de onda de 528 nm. La presente técnica no tiene interferencia con colores que pueda presentar la quinua y tiene la virtud de determinar el total de las saponinas presentes en el producto”.

Hostettmann y Marston, (2005), puntualizaron que las saponinas con anisaldehído, vainillina u otros aldehídos aromáticos en un ácido mineral fuerte, por ejemplo (sulfúrico y perclórico) dan con las agliconas productos coloreados que absorben entre 510 y 620 nm. Probablemente ocurre una reacción de

deshidratación, formando grupos metilenos no saturados que dan productos de condensación coloreados con los aldehídos.

Abisch & Reichstein, (1960), puntualizan que los triterpenos dan un color rojo y los esteroides color verde con la mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico, lo cual permite diferenciar las saponinas triterpénicas de las esteroidales.

Baccou *et al.*, (1977) describen la formación de compuestos coloreados entre las agliconas triterpénicas y vainillina disuelta en ácido perclórico concentrado.

En esta investigación se utilizó la técnica analítica descrita en Monje *et al.*, (2006).

Las absorbancias fueron medidas con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 que se puede ver en la Foto 15.



Foto 15. Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35

El reactivo de Liebermann-Burchard (ácido sulfúrico concentrado: anhídrido acético concentrado, 5:1) se preparó midiendo el volumen necesario de ácido sulfúrico, calidad analítica y colocándolo en un frasco de Erlenmeyer, se colocó algunos minutos en un freezer, y luego se agregó lentamente el volumen de anhídrido acético necesario, calidad analítica agitando continuamente. Es de

destacar que si los reactivos se mezclan al revés, se forman “compuestos” de color amarillo que puede llegar a ser intenso si no se enfrió adecuadamente.

Se tomó 1,00 mL de la solución del extracto alcohólico (cuando fué necesario, la solución del extracto se diluyó previamente, utilizando etanol absoluto o isopropanol absoluto, según el extractante utilizado) y se le agregó lentamente (ya que la reacción es fuertemente exotérmica, y se pueden producir proyecciones) 3,50 mL del reactivo de Liebermann-Burchard (que se debe preparar en el momento de realizar la determinación ya que no se conserva).

La solución se agitó en un vortex, repitiendo a intervalos regulares durante 30 minutos, antes de los 50 minutos, de acuerdo a lo indicado en la bibliografía mencionada, se procedió a medir la absorbancia.

La longitud de onda que correspondió al máximo de absorbancia se determinó mediante barrido espectral entre 400 y 600 nm a una velocidad de 1 nm/seg. La máxima absorción se produjo a una longitud de 528 nm, lo cual coincide con lo indicado en la bibliografía. En la figura siguiente se puede observar el espectro de absorción de una de las tantas muestras determinadas.

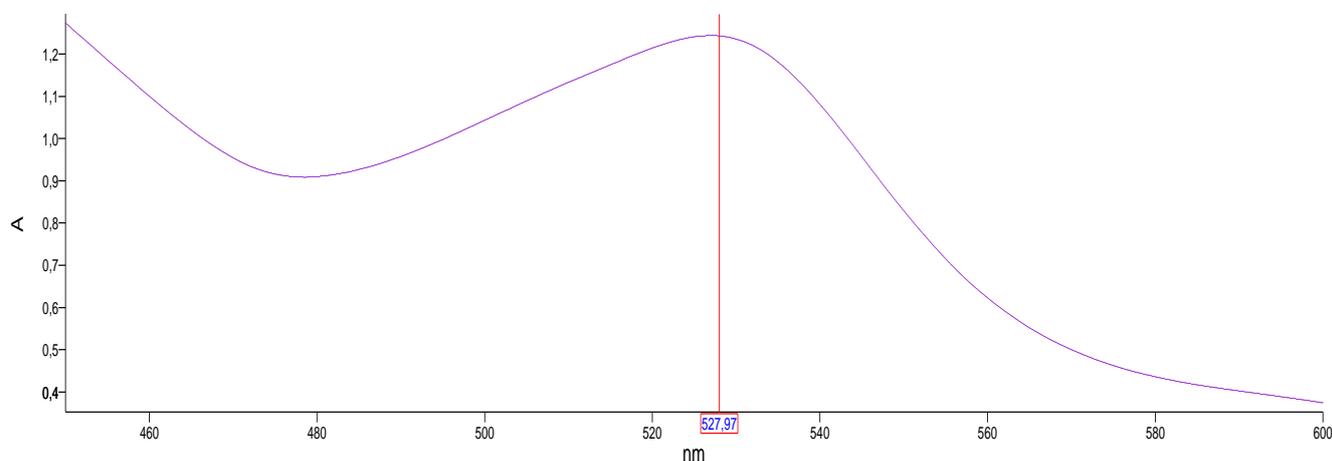


Figura 20 Espectro de absorción de una muestra, el máximo corresponde a 527,97 nm.

2.5.1. Curva de calibración

Se construyó utilizando como droga patrón saponinas de quinoa purificadas dos veces por recristalización (Capítulo 5, página 99) y secadas con vacío a 60°C. La masa de saponinas para preparar la solución patrón concentrada se midió en una balanza analítica a la centésima de miligramo y se disolvió en un matraz aforado con etanol al 96%. A partir de la solución patrón concentrada se realizaron diluciones con el mismo solvente. A 1,00 mL de estas soluciones se les adicionó el reactivo de Liebermann-Burchard en relación 2:7 siguiendo el procedimiento antes detallado. Para cada una de ellas se midió la absorbancia entre los 30 y los 50 minutos. Con el conjunto de datos y utilizando Excel se realizó la gráfica y se obtuvo por correlación lineal la ecuación que relaciona la concentración de saponinas con la absorbancia. La absorbancia obtenida es la sumatoria de los aportes de la saponina, del reactivo y la del pigmento (sustancias coloreadas que contiene la semilla de quinoa). Por ello se realizó un blanco que contuvo una solución del extracto sin el reactivo de color para determinar cuánto es su absorbancia, luego se midió la absorbancia del reactivo sin la muestra, para luego restar ambas a la absorbancia de la muestra.

$$A_M \text{ (Absorbancia medida)} = A_S + A_R + A_P$$

$$\text{por lo tanto } A_S = A_M - A_R - A_P$$

A_S : Absorbancia de la saponina

A_M : Absorbancia medida de la muestra

A_R : Absorbancia del reactivo

A_P : Absorbancia del pigmento

Para la determinación de saponinas en las extracciones con MO se procedió de la misma forma.

Se preparó una solución patrón que contenía 6,64 mg/mL de saponinas y se prepararon las siguientes diluciones:

mL de solución patrón	[Saponinas]	Absorbancia
0.05	0.033222222	0.17
0.1	0.066444444	0.328
0.2	0.132888889	0.635
0.3	0.199333333	0.909

0.4	0.265777778	1.234
0.5	0.332222222	1.52
0.6	0.398666667	1.837
0.8	0.531555556	2.4599
0.9	0.598	2.751

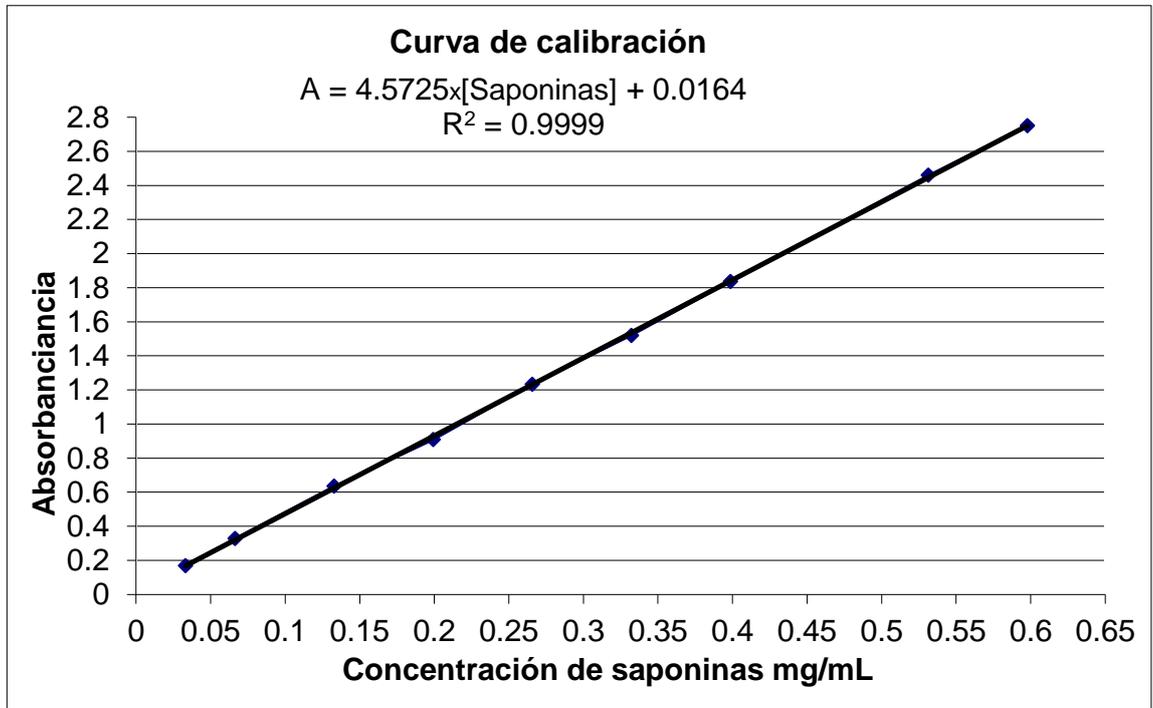


Figura 21. Curva de calibración

La ecuación obtenida fue la siguiente:

$$A = 4.5725 \times C_{\text{saponinas}} + 0.0164 \quad R^2 = 0,9998$$

En la cual $C_{\text{saponinas}}$ es la concentración de saponinas en mg/mL y R^2 es el coeficiente de correlación al cuadrado de la curva de calibración.

El límite de cuantificación fue 0,05 mg/mL de saponinas y el límite de linealidad fue de 0,65 mg/mL de la mencionada sustancia.

Todas las mediciones se realizaron por quintuplicado y se utilizó la prueba “Q” como criterio de rechazo de datos. Se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilks y Q-QPLOTS para verificar que los datos estuvieran distribuidos normalmente, obteniéndose los siguientes resultados:

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
Eje de la Y	7	1,00	1,00	2,1E-04	-39,77	-39,93

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor
CpMallows						
const	0,02	0,01	2,2E-03	0,04	2,86	0,0355
Eje de las X	4,57	0,02	2,96	3,07	138,90	<0,0001
16078,97						

Y = 0,02 + 4,57X + 5,9e-04

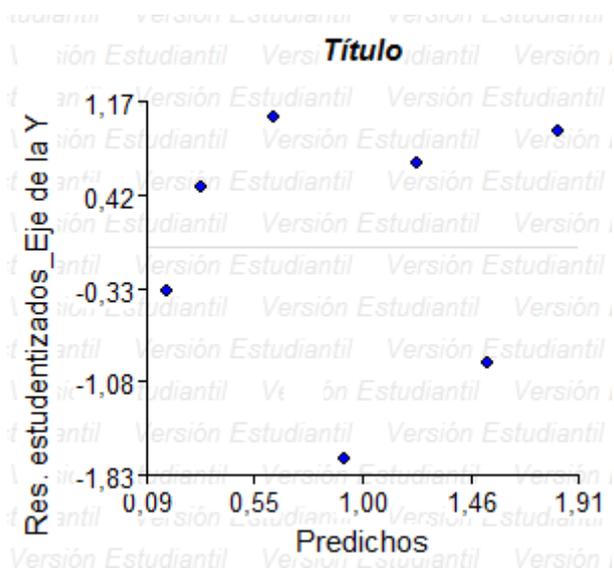
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

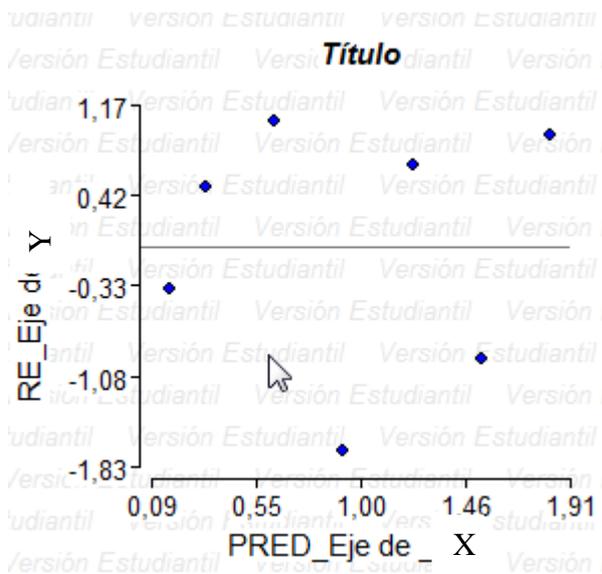
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,29	1	2,29	19293,36	<0,0001
Eje de las X	2,29	1	2,29	19293,36	<0,0001
Error	5,9E-04	5	1,2E-04		
Total	2,29	6			

Nueva tabla: 11/09/2012 - 11:06:57 a.m.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (una cola)
RDUO Eje de	7	0,00	0,01	0,89	0,3409





Figuras 22. Gráficos de residuos en función de predichos para odenadas y absisas

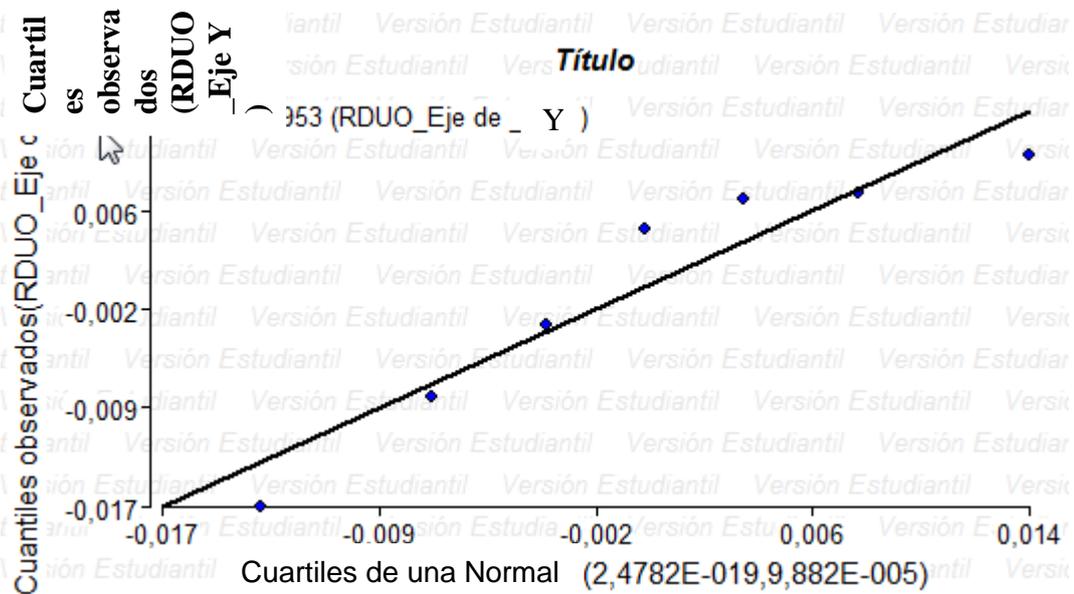


Figura 23. Q-Q Plot

Para verificar si los datos de la curva de calibración están distribuidos normalmente, tomando los residuos como datos, una de las técnicas fué construir un Q-Q Plot normal. Si los residuos son normales, entonces se alinean sobre una recta a 45° (como se ve en la figura 23). Para determinar la homogeneidad de las varianzas se hizo un gráfico de dispersión de residuos vs. predichos, se debe observar una nube de puntos sin patrón alguno para comprobar que las varianzas son homogéneas. (Ver figura 22) (Di Rienzo *et al.*, 2008)

Los resultados se expresan como mg de saponinas/mL.

Para calcular el rendimiento de la extracción “R”, se utilizó la siguiente ecuación:

$$R = 100 \times [V \cdot C / 1000]$$

$$R = 10 \times V \times C / \text{masa de semilla (en gramos)}$$

Dónde: V = volumen del extracto total en mL

C = concentración de saponinas en el extracto

2.6. Resultados y discusiones

2.6.1. Diseño experimental

Con el fin de encontrar las mejores condiciones de extracción, se analizaron cuatro variables independientes o factores, cada una con cuatro niveles.

Para lograr este objetivo, se recurrió al diseño experimental de Taguchi (Montgomery, 2004; Anderson and Witcomb, 2007).

La tabla 5 muestra la matriz del diseño experimental de Taguchi donde se muestran los valores (niveles) asignados a cada variable (factor).

Nivel	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D
	Vol. Solvente/g fruto	Tiempo, min.	T°C	% alcohol
I	15	5	50	20
II	20	15	60	60
III	25	20	70	80
IV	30	30	90	95

Tabla 5: Matriz de diseño experimental.

Las variables independientes son “volumen de solvente por gramo de fruto”, denominado Factor A, “tiempo”, Factor B, “temperatura a la que se realiza la extracción”, Factor C y “porcentaje de alcohol en la mezcla hidroalcohólica”, Factor D. Cada una de estas variables presenta cuatro niveles denominados I, II, III y IV.

Para la obtención de la matriz ortogonal, se recurrió al Design Expert 8 para Windows. Para los parámetros de ensayos establecidos, el software recomienda el uso de una matriz Taguchi de L16(4⁴).

Tal como se muestra en la Tabla 6. Si se hubiese aplicado un diseño factorial, 4⁴ = 256 ensayos hubieran sido necesarios, mientras que con el método

Taguchi, bastan dieciséis experimentos para establecer la mejor condición de extracción. Cada una de las filas indicadas desde la 1 a la 15 contiene los niveles (valores) en que debe encontrarse cada uno de los factores (variables) para cada experimento. Las dos últimas columnas presentan los rendimientos obtenidos para cada experimento, con mezclas etanol-agua e isopropanol-agua, respectivamente.

Cada extracción se realizó por triplicado (n=3) y la cuantificación de saponinas para cada extracción también por triplicado, aplicando como criterio de aceptación o rechazo de datos el criterio Q, el valor del rendimiento en la tabla siguiente es el valor medio \pm desvío estándar, que fue determinado con el InfoStat.

Tabla 6 Taguchi diseño experimental L16(4⁴).

Resultados experimentales(*)

Rendimiento promedio: g saponinas/100 g de semillas

Experimento	Factor A Vol. Solvente/g semillas	Factor B Tiempo min	Factor C T°C	Factor D % de alcohol	Vacante	Mezclas etanol-agua	Mezclas isopropanol- agua
1	I(15)	I(5)	I(50)	I(20)	I	0,765 \pm 0,03	0,804 \pm 0,03
2	I	II(15)	II(60)	II(60)	II	0,797 \pm 0,03	1,008 \pm 0,02
3	I	III(20)	III(70)	III(80)	III	1,070 \pm 0,02	0,477 \pm 0,03
4	I	IV(30)	IV(90)	IV(95)	IV	0,339 \pm 0,04	0,012 \pm 0,07
5	II(20)	I	II	III	IV	0,502 \pm 0,03	0,196 \pm 0,05
6	II	II	I	IV	III	0,107 \pm 0,07	0,015 \pm 0,06
7	II	III	IV	I	II	1,555 \pm 0,02	2,663 \pm 0,01
8	II	IV	III	II	I	1,236 \pm 0,02	1,380 \pm 0,02
9	III(25)	I	III	IV	II	0,065 \pm 0,04	0,002 \pm 0,07
10	III	II	IV	III	I	0,749 \pm 0,03	0,387 \pm 0,04
11	III	III	I	II	IV	0,877 \pm 0,03	0,898 \pm 0,03
12	III	IV	II	I	III	0,933 \pm 0,01	1,568 \pm 0,02
13	IV(30)	I	IV	II	III	0,742 \pm 0,02	0,921 \pm 0,03
14	IV	II	III	I	IV	0,890 \pm 0,01	1,565 \pm 0,02
15	IV	III	II	IV	I	0,073 \pm 0,05	0,001 \pm 0,09
16	IV	IV	I	III	II	0,722 \pm 0,03	0,385 \pm 0,04

*Cada experimento se efectuó con factores en el correspondiente nivel, indicado en números romanos (ver Tabla 5) y siguiendo el procedimiento explicado en Materiales y Métodos.

En esta tabla se proporcionan las siguientes condiciones en el experimento. Por ejemplo, para el experimento 1: volumen de solvente es 15 mL/g de semillas, aplicado un tiempo de 5 minutos, a una temperatura de 50°C y el porcentaje de alcohol es 20%. El rendimiento experimentalmente medido es 0,804. Este valor es el promedio de cinco experimentos desarrollados en las mismas condiciones.

El experimento número siete mostró el máximo rendimiento de extracción para ambas mezclas de solventes (1,65% para etanol al 20% y 2,66% para isopropanol al 20%). El análisis numérico de los resultados aplicando el procedimiento de Taguchi (Montgomery, 2004) revela que las condiciones óptimas para las mezclas de etanol-agua e isopropanol-agua serían las mismas:

- Volumen de solvente/gramo de semilla: 20 mL/g

- Tiempo de extracción: 20 minutos.
- Temperatura de extracción: 90°C.
- Porcentaje de alcohol: 20%.

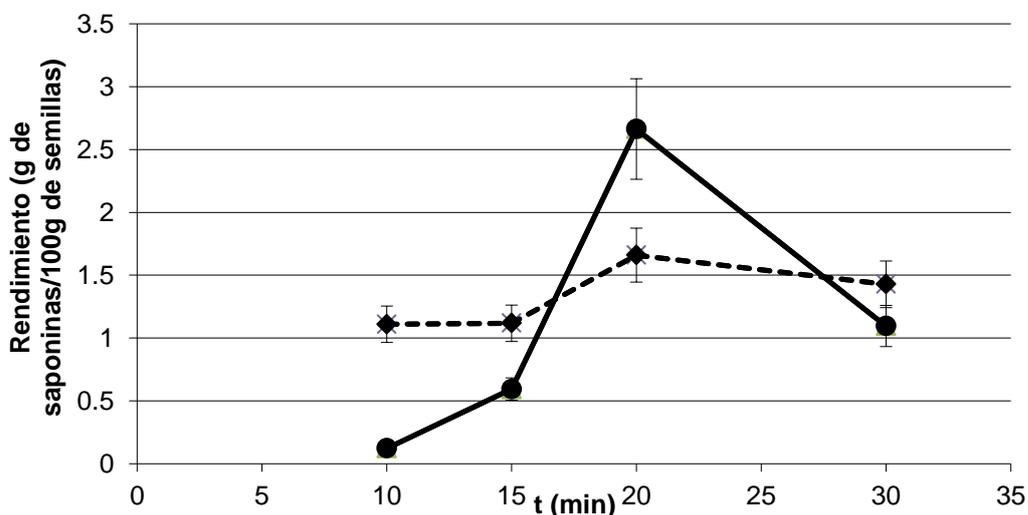
Los resultados muestran que:

1. El mejor extractante fue una mezcla de isopropanol-agua al 20%.
2. El aumento de temperatura favorece la difusión del soluto que está en el sólido hacia el solvente.

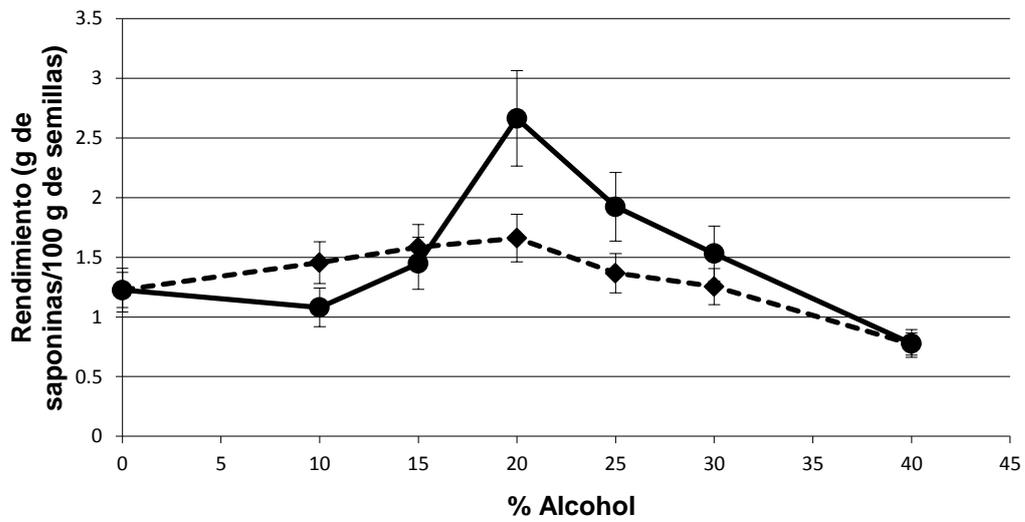
2.6.2. Ensayos de tendencia

Para determinar si los valores anteriores correspondían verdaderamente a rendimientos máximos, una nueva réplica de experimentos se llevaron a cabo, en las que se mantuvieron todas las variables constantes en sus valores óptimos, excepto una, que se cambió regularmente. Los resultados para las mezclas de isopropanol-agua y etanol-agua se muestran en las figuras 24 a-d.

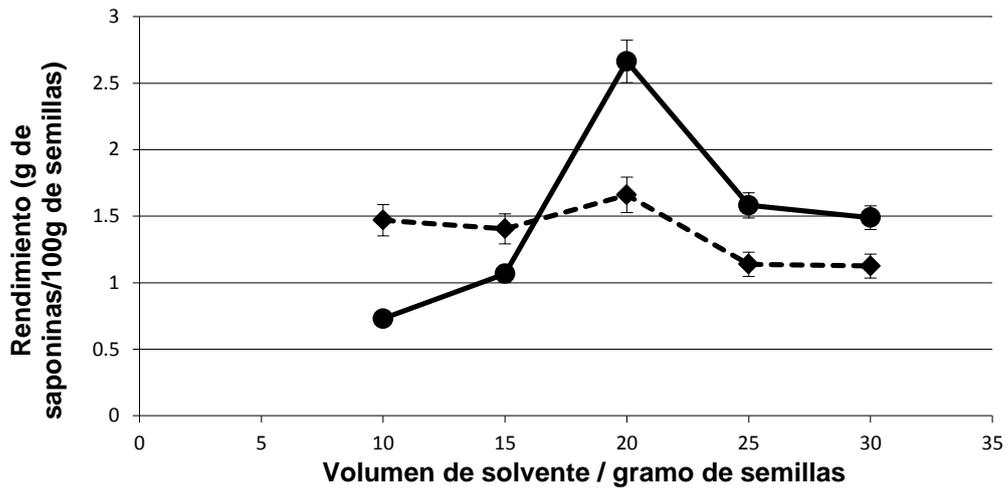
(a)



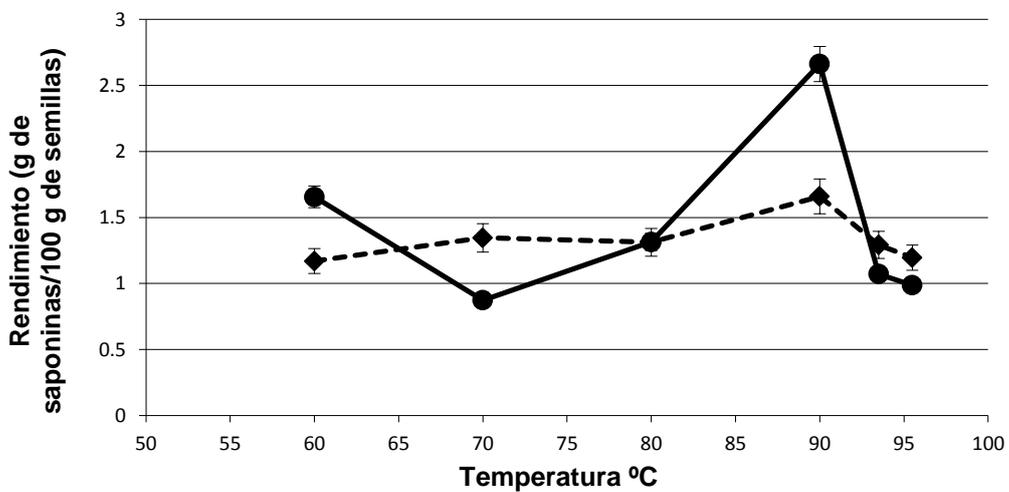
(b)



(c)



(d)



Figuras 24 (a-d)

- (a) Efecto del tiempo de irradiación** (—●— isopropanol; --◆-- etanol). Permanecen constantes: $V/g = 20 \text{ ml / g}$, $T = 90 \text{ }^\circ\text{C}$, $\% = 20$.
- (b) Efecto de la concentración de alcohol** (—●— isopropanol; --◆-- etanol). Permanecen constantes: $V/g = 20 \text{ ml / g}$, $t = 20 \text{ min}$, $T = 90^\circ\text{C}$
- (c) Efecto del volumen de disolvente / gramo de fruto** (—●— isopropanol; --◆-- etanol). Permanecen constantes: $t = 20 \text{ min}$, $T = 90^\circ \text{C}$, $\% = 20$.
- (d) Efecto de la temperatura en la extracción** (—●— isopropanol; --◆-- etanol). Permanecen constantes: $V/g = 20 \text{ ml / g}$, $t = 20 \text{ min}$, $\% = 20$.

Si en la extracción la temperatura supera los 90°C , las saponinas se degradan rápidamente (Chen *et al.*, 2007). Esto parece confirmarse en la figura 24 d, que muestra una marcada disminución en el rendimiento de la extracción a temperaturas superiores a 90°C .

Respecto al efecto de la composición del disolvente en la eficiencia de la extracción, los resultados experimentales mostraron que la máxima extracción de saponinas tuvo lugar a una polaridad bastante alta, pero no la más alta (que correspondería al agua pura). La constante dieléctrica del agua es 80 y la del isopropanol 18 mientras que la de la solución es 67,6. Este hecho podría indicar que la solubilidad de las saponinas no sólo depende de la capacidad de los disolventes para formar enlaces de hidrógeno y / o interacciones dipolo-dipolo. Dado que isopropanol-agua dio el mejor rendimiento, podría estar indicando que la cadena carbonada también participó en el proceso de solubilización de las saponinas.

Las Figuras 25(a) y (b) muestran la eficiencia y el porcentaje de la extracción en varias etapas, donde los mismos granos se extrajeron con porciones sucesivas de disolvente fresco, manteniendo las condiciones óptimas para cada etapa de la extracción. Con la mezcla de isopropanol-agua en la primera etapa se extrajeron 2,663 g de saponinas, 0,155 g en la segunda y 0,082 g, en la tercera, todo expresado por 100 g de semillas. En la cuarta extracción, el nivel de saponinas se mantuvo debajo del límite de cuantificación, por lo tanto, la concentración final debe ser la suma de las tres primeras, es decir $2,900 \pm 0,010 \%$. Este resultado está dentro de los valores típicos de saponinas que contiene la quinua (Repo-Carrasco *et al.*, 2011). Mientras que en la primera etapa de extracción, el rendimiento con isopropanol-agua fue de 91,8%, con etanol-agua fue notablemente inferior (57,2%) (Figuras 25 (a) y (b)).

Figura 25 (a)

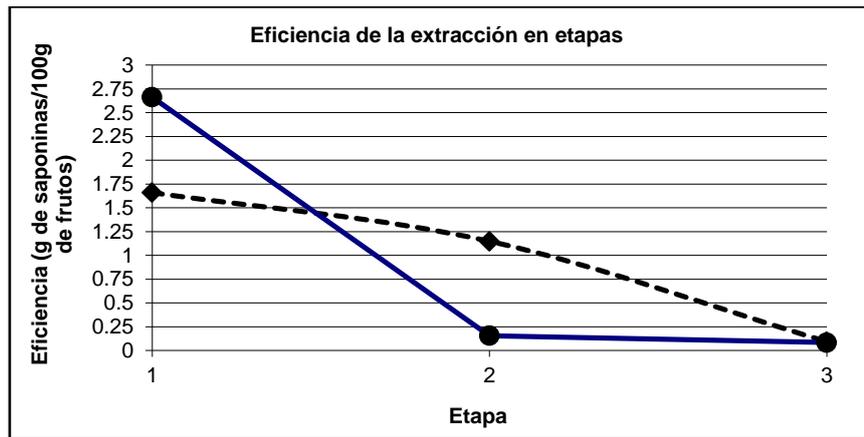
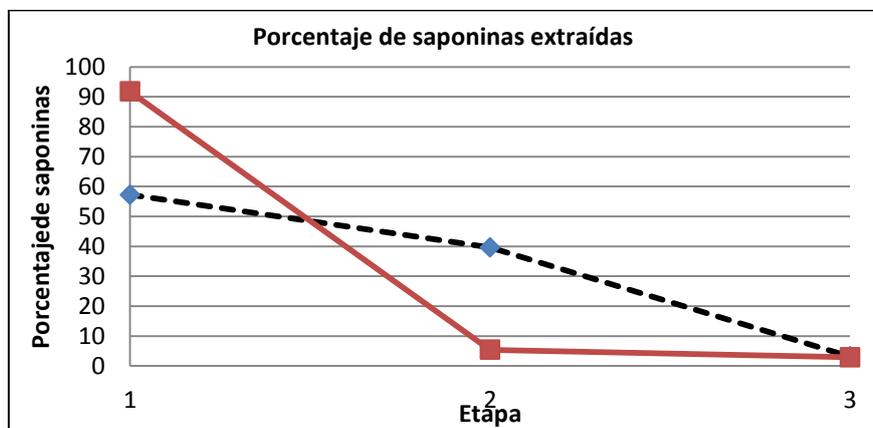


Figura 25 (b)



2.7. Conclusión sobre la extracción con microondas

Esta investigación mostró que el método Taguchi es útil para determinar las condiciones óptimas de extracción de saponinas con MO.

El rendimiento de la extracción por microondas fue significativamente mayor que el correspondiente a la extracción con Soxhlet, y el uso de alcohol como disolvente facilita la disolución de las saponinas.

El tiempo de extracción EAM es considerablemente menor que con el método de Soxhlet (capítulo 6, página 87); por consiguiente, hay menos riesgo de gelificación del almidón, lo que hace más fácil la microfiltración y evita la carbonización del mismo por la acción del ácido sulfúrico concentrado contenido en el reactivo de Lieberman-Burchard. La carbonización del almidón gelificado produce interferencias en el método analítica.

Capítulo 3

Extracción de las saponinas a altas presiones

3. EXTRACCIÓN DE LAS SAPONINAS A ALTAS PRESIONES

3.1. Materiales y métodos

Material vegetal

Ídem al mencionado en el Capítulo 2, página 49.

Materiales y equipos

Ídem al mencionado en el Capítulo 2, páginas 49-50.

3.2. Introducción

Fundamentos de la extracción de saponinas bajo presión

El uso de métodos convencionales de extracción, tales como extracción por Soxhlet y por sonicación, para la extracción de analitos en materiales sólidos tienen una variedad de inconvenientes, siendo los más significativos largos tiempos de extracción, cantidades grandes de solventes orgánicos, y rendimientos de extracción pobres. (Camel, 2001).

La extracción con líquidos presurizados es una técnica innovadora que ha sido desarrollada como una alternativa a los métodos convencionales de extracción en muchas áreas, tales como el medio ambiente, los alimentos, análisis farmacéutico, extracción de fitoquímicos (Peng y Shao-Ping, 2013). Para estas extracciones se utiliza generalmente agua, alcoholes de bajo peso molecular o soluciones tensioactivas no iónicas. Una solución de Triton X-100 en concentraciones del 5 al 10% han arrojado mejores rendimientos de extracción a 50°C que con metanol o agua (Choi *et al.*, 2003).

La PLE “pressurized liquid extraction”, se subdivide en ASE “accelerated solvent extraction” cuando se usan solventes orgánicos y en PLPW “polarity low pressure water” cuando el solvente es el agua. En ambos casos se trabaja en condiciones subcríticas. En mi caso he elegido HPSE “high pressure solvent extraction”.

El aumento de la temperatura aumenta la capacidad de transferencia de masa al solvente (aumentan los coeficientes de difusión) y además disminuye la polaridad del agua modificando la capacidad extractante del solvente (Güçlü-Üstündag *et al.*, 2007, 2008).

Kaufmann y Christen, (2002) expresan que hay un interés creciente en el uso de las técnicas que implican extracción asistida por microondas y extracción con solvente a presión en los laboratorios analíticos. Esta revisión presenta una breve descripción de ambos métodos, y los informes sobre su aplicación a la extracción de productos naturales y la influencia de parámetros tales como la naturaleza del disolvente y el volumen, la temperatura, el tiempo y el tamaño de partícula de la matriz.

Existen varios procesos de extracción de fitoquímicos, como por ejemplo: extracción de fluido supercrítico, extracción con agua subcrítica, extracción con líquido presurizado, etc. La desventaja de estos procedimientos se debe bien a la desnaturalización que provocan de los fotoquímicos presentes, debido a las condiciones de extracción, o bien por los costos involucrados, como sucede en la extracción con fluidos supercríticos (Praveen *et al.*, 2006).

La extracción con solvente a alta presión (HPSE) es una técnica sólido-líquido (SLE), que se ha desarrollado como alternativa a los métodos convencionales de extracción, como Soxhlet, maceración, percolación o reflujo, ofreciendo varias ventajas, por ejemplo, tiempos más cortos de extracción, menores consumos de disolvente y mejores rendimientos de extracción, con buenas reproducibilidades. Además, una presión mayor que la atmosférica fuerza al disolvente a penetrar en los poros de la matriz, ayudando a la extracción de los analitos. Las altas temperaturas disminuyen la viscosidad del disolvente líquido, lo que permite una mejor penetración del mismo en la matriz y el debilitamiento de la interacción soluto / matriz. Además, las temperaturas elevadas mejoran la difusividad del disolvente, resultando en un aumento de la velocidad de extracción. (Kaufmann *et al.*, 2002). Praveen *et al.*, 2006 realizaron una versión modificada de extracción a alta presión hidrostática de los antioxidantes de las frutas del *Morindia citrifolia* a diferentes presiones, temperaturas y tiempos. También se investigó, la extracción con agua a alta presión y baja polaridad (PLPW) para la extracción de las saponinas de la semillas de *Saponaria vaccaria* L. para determinar los efectos

de la temperatura, del tratamiento de la muestra, y tiempo de extracción sobre el rendimiento de extracción de las saponinas (Güçlü-Üstündag *et al.*, 2007, 2008).

En la presente investigación se evalúa la eficiencia extractiva del método a altas presiones, en función de las distintas variables operativas, a fin de establecer su aptitud tanto para el análisis cuantitativo, como para la remoción del contenido de saponinas en los aquenios de *Chenopodium quinoa*. Este último punto es de gran interés, dada la necesidad de “desamargar” el grano para su consumo como alimento.

3.2.1. Dispositivo experimental empleado

A los efectos de efectuar la extracción de las saponinas a alta presión, se diseñó y se construyó un reactor de acero inoxidable (Pressure Extraction Vessel: PEV), con tapa del mismo material provisto de un manómetro con escala hasta 5 bar y una llave de paso para inyectar nitrógeno a presión, mediante un cilindro de que contiene nitrógeno puro (99% de pureza) con su correspondiente regulador de presión.

En las siguientes fotos pueden verse el reactor armado:

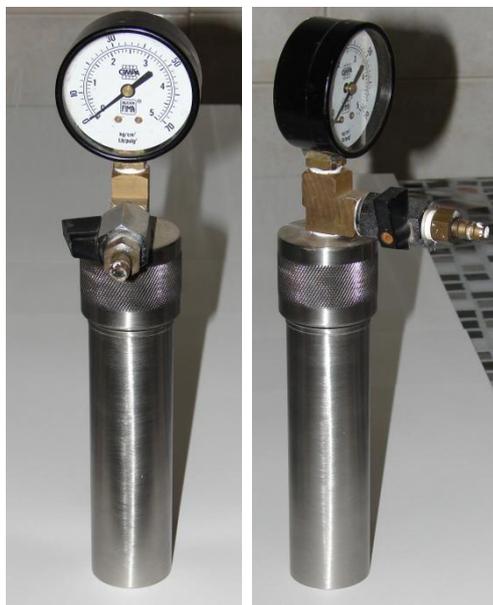


Foto 16. Reactor con manómetro y llave de paso para inyección

El diámetro externo fue de 4,0 cm y el interno de 3,2 cm, el alto total del cilindro es de 16 cm. El volumen que puede contener es de 350 cm³.

Las partes que lo componen se pueden observar en la siguiente fotografía



Foto 17. Reactor desarmado

Como puede verse en la Foto. 17 el cilindro termina en un aro sello para evitar cualquier tipo de pérdida.

El reactor se calentó utilizando el baño termostático de un evaporador rotativo, marca Buchi, modelo R-220.como se puede observar en la Foto. 18.



Foto 18. Reactor en el baño termostático

La llave de paso permite introducir el nitrógeno y su eliminación posterior, al finalizar la extracción. El aparato está dotado de cierres y juntas adecuadas para

garantizar hermeticidad en las condiciones extremas de los ensayos realizados (100 °C y 5 bar).

3.2.2. Procedimiento de extracción bajo presión

El procedimiento operativo fue el siguiente:

- 1- Introducción de 1 gramo de frutos enteros en el Recipiente de extracción bajo presión (Pressure Extraction Vessel), (PEV).
- 2- Agregado de 20 mL de solvente.
- 3- Cierre del reactor.
- 4- Presurización con nitrógeno.
- 5- Inmersión del aparato en el baño termostático.
- 6- Medición del tiempo, a partir del momento que se estabiliza la presión manométrica.
- 7- Enfriamiento del PEV con agua a temperatura ambiente.
- 8- Apertura de la llave de paso para expulsar el nitrógeno.
- 9- Se retira la tapa del PEV y se toma muestra del solvente extractante.
- 10- Se determina el contenido de saponinas.

La forma de verificar que no haya habido pérdida material del reactor es leyendo la presión después de enfriar el PEV (Punto 7), a temperatura ambiente, la cual debe coincidir con la presión antes de la extracción.

Cuantificación de saponinas

Se realizó exactamente de la misma forma como se describe en el Capítulo 2, páginas 56 a 58.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Diseño experimental

Se desarrolló de manera similar a la descrita en el Capítulo 2, páginas 68 y 69.

Nuevamente aquí se recurrió al diseño experimental de Taguchi con el fin de encontrar las mejores condiciones de extracción, se analizaron las cuatro variables o factores, cada una en cuatro niveles: temperatura, composición del solvente,

tiempo de contacto y presión inicial a la cual es inyectado el nitrógeno. De la combinación de las variables en sus distintos niveles se obtuvieron las condiciones de cada ensayo. La relación volumen de solvente/gramo de semillas se mantuvo en todos los experimentos 20:1, que es la relación óptima para la extracción con MO (Gianna *et al.*, 2012) La tabla 7 presenta la matriz de diseño experimental para las extracciones presentadas:

Tabla 7. Matriz de diseño experimental

Nivel	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D
	Presión manométrica inicial (bar)	Tiempo (min)	T (°C)	% alcohol
I	3	5	50	20
II	2	15	60	60
III	1	20	70	80
IV	0	30	90	95

Los factores A, B, C y D son las variables independientes cada una con cuatro niveles (I a IV). A: presión manométrica inicial; B: tiempo; C: temperatura y D: % de alcohol en el solvente.

Tabla 8. Diseño experimental de Taguchi L16 (4⁴)^a

Experimento	Factor A Presión manométrica inicial	Factor B Tiempo (min)	Factor C T °C	Factor D % alcohol	Resultados experimentales g de saponinas/100 g de semillas ^b	
					Mezclas Etanol-agua	Mezclas Isopropanol-agua
1	I(3)	I(5)	I(50)	I(20)	1.052±0,03	0.899±0,03
2	I	II(15)	II(60)	II(60)	1.023±0,02	0.426±0,02
3	I	III(20)	III(70)	III(80)	0.911±0,04	0.319±0,02
4	I	IV(30)	IV(90)	IV(95)	0.175±0,02	0.138±0,03
5	II(2)	I	II	III	0.288±0,02	0.130±0,04
6	II	II	I	IV	0.034±0,01	0.584±0,02
7	II	III	IV	I	1.832±0,03	2.882±0,01
8	II	IV	III	II	1.159±0,02	0.734±0,02
9	III(1)	I	III	IV	0.056±0,05	1.087±0,02
10	III	II	IV	III	0.769±0,02	1.228±0,02
11	III	III	I	II	0.505±0,01	0.742±0,03
12	III	IV	II	I	0.572±0,01	1.476±0,02
13	IV(0)	I	IV	II	0.578±0,01	1.309±0,02
14	IV	II	III	I	0.826±0,02	1.481±0,02
15	IV	III	II	IV	0.032±0,05	1.066±0,02
16	IV	IV	I	III	0.681±0,02	0.183±0,03

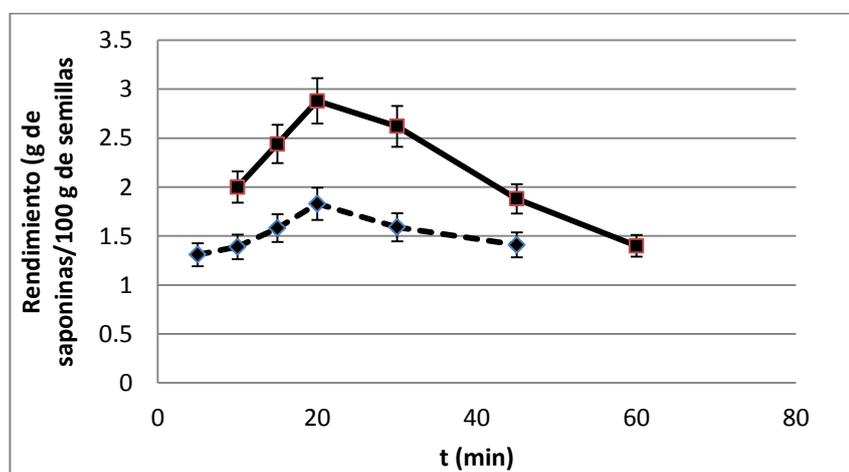
Notas: **a.** En números romanos se indica el nivel del factor o variable independiente, como se presenta en la tabla 8. Cada experimento en la tabla fue realizado con el conjunto de condiciones que surgen de tomar el correspondiente nivel para cada factor, **b.** promedio de los rendimientos para tres extracciones.

Cada extracción se realizó por triplicado ($n=3$) y la cuantificación de saponinas para cada extracción también por triplicado, aplicando como criterio de aceptación o rechazo de datos el criterio Q, el valor del rendimiento en la tabla 8 es el valor medio \pm desvío estándar, que fue determinado con el InfoStat.

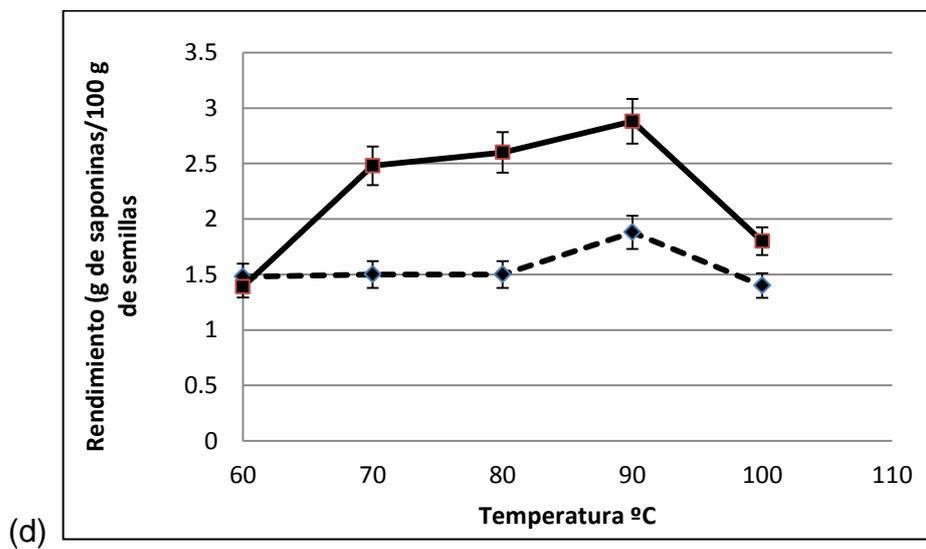
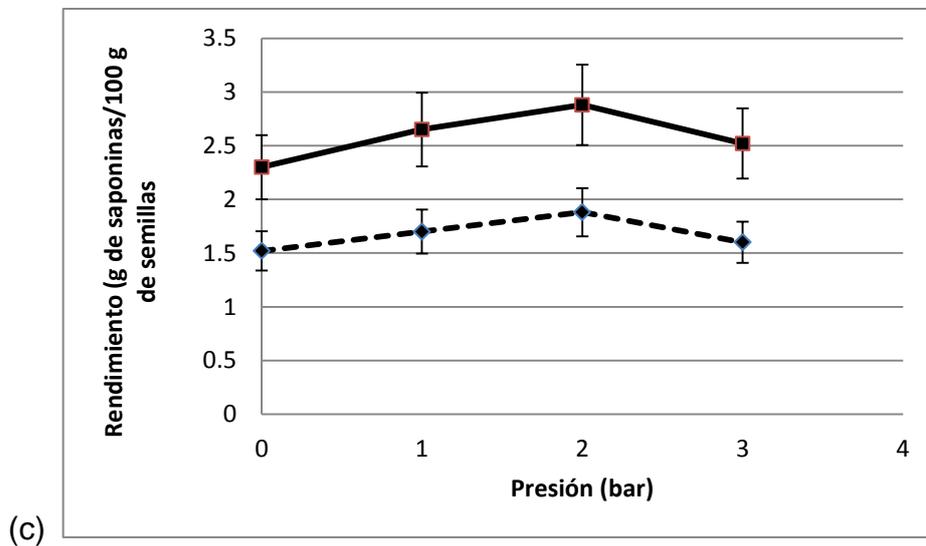
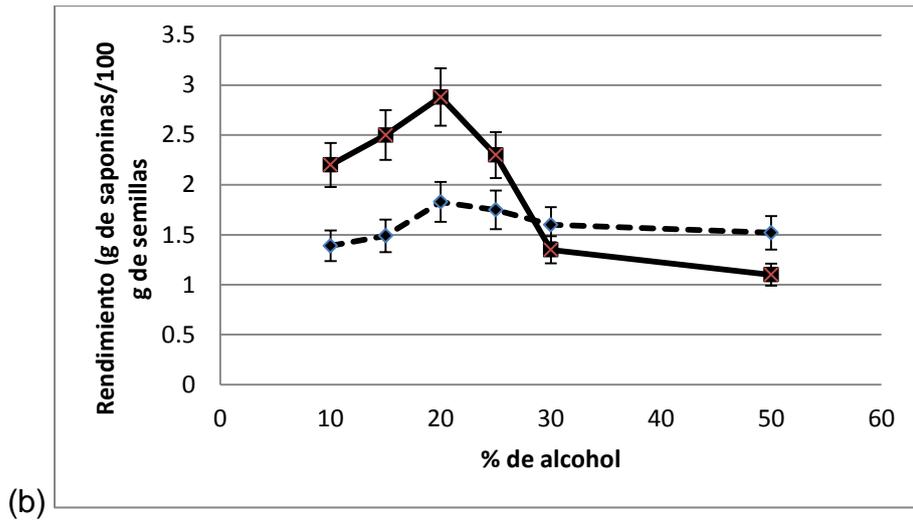
Como se puede comprobar allí, el experimento 7 arrojó los rendimientos más altos, tanto para la extracción con etanol-agua, como con isopropanol-agua. En ambos casos los parámetros de extracción óptimos fueron: presión manométrica inicial 2 bar, temperatura de extracción 90°C , tiempo de extracción 20 minutos y porcentaje del alcohol 20%, obteniéndose rendimientos de 1,83 % y 2,88 % para etanol e isopropanol acuosos, respectivamente. La presión manométrica máxima alcanzada en esta investigación fue de 5 bar, pues en ensayos anteriores pudo comprobarse que a mayores presiones se producía un marcado deterioro de los granos de quinoa (se reventaban) y por esa razón la presión manométrica inicial no podía superar los 3 bar, ya que al aumentar la temperatura, la presión también aumenta. Con el método de extracción con microondas se obtuvo un resultado similar para la mezcla isopropanol (20%)-agua, pero luego de tres extracciones sucesivas, de 20 minutos cada una (Gianna *et al.*, 2012), mientras que en este caso se lo alcanza en una sola extracción.

3.3.2. Ensayo de tendencias

Los valores óptimos encontrados, tanto para composición del solvente como para la temperatura de extracción son los más elevados. En las figura 25 (a-d) se muestran las variaciones del rendimiento de extracción respecto de cada variable, tanto para isopropanol-agua como para etanol-agua, manteniendo las restantes en el valor óptimo correspondiente.



(a)



Figuras 26 (a-d). Se puede observar como el rendimiento es afectado por cada variable mientras las otras se mantienen constantes.

(a) Efecto del tiempo de extracción. Permanecen constantes: (Pi: 2 bar, T: 90 °C, Alc: 20%; —■— isopropanol; --◆-- etanol).

(b) Efecto de la concentración de alcohol. Permanecen constantes: (Pi: 2 bar, t: 20 min, T: 90 °C; —■— isopropanol; --◆-- etanol)

(c) Efecto de la presión manométrica inicial. Permanecen constantes: (t: 20 min, T: 90 °C, Alc: 20%; —■— isopropanol; --◆-- etanol)

(d) Efecto de la temperatura. Permanecen constantes: (Pi: 2 bar, T: 20 min, Alc: 20%; —■— isopropanol; --◆-- etanol).

Pi: presión manométrica inicial, t: tiempo, T: temperatura, Alc: Concentración de Alcohol (%).

3.4 Conclusiones

Se verificó que una presión mayor a la atmosférica aumentó el rendimiento de la extracción, posibilitando la remoción total en menor tiempo. Todo esto parece ser consecuencia de una mayor difusión del extractante en el pericarpio.

La extracción con isopropanol implicó un 63% más de eficiencia que con etanol. Por consiguiente, sería un solvente apropiado para fines analíticos, pero su alto costo lo vuelve prohibitivo como solvente industrial. Esto último solo sería posible si la recuperación del isopropanol se demostrara como económicamente viable.

Sea con etanol o con isopropanol, las extracciones con solventes a altas presiones se presentan como alternativas para el “desamargado” por vía húmeda de la quinoa con la posibilidad de recuperación posterior de las saponinas, para fines comerciales, a través del conveniente escalado a nivel industrial.

Los ensayos de tendencia previamente analizados demuestran el buen funcionamiento del método de Taguchi para la búsqueda de las condiciones óptimas de extracción de saponinas de quinoa, mediante el HPSE.

Capítulo 4

**Análisis comparativo de
la EAM y la HPSE con
dos métodos clásicos de
extracción**

4. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se comparan los métodos extractivos investigados.

A los fines de poder realizar este estudio comparativo se realizaron métodos de extracción por Soxhlet y por lixiviación con agitación “shaker”.

4.1. Extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido es considerada en el campo de la Ingeniería Química una operación unitaria y consiste en poner en solución uno o más componentes de la fase sólida en el líquido extractante, este solvente tiene que ser selectivo, es decir disolver solo algunos solutos de la fase sólida, en el que es insoluble el resto del sólido conocido como inerte. (Welty *et al.*, 1991).

4.1.1. Factores que afectan la velocidad de extracción

1. **Tamaño de las partículas de la fase sólida:** el tamaño de los sólidos pequeños tienen un área interfacial sólido-líquido más grande (por eso en algunos casos para la extracción de saponinas se agregan tensioactivos no iónicos), la distancia de difusión del soluto es más pequeña y es mayor la cantidad de masa transferida.
2. **Tipo de solvente:** además de ser selectivo debe tener baja viscosidad (esto se logra a veces trabajando a temperaturas mayores que la ambiente) a medida que se produce la extracción disminuye el gradiente de concentración y por lo tanto la velocidad de extracción disminuye.
3. **Temperatura:** un aumento de temperatura aumenta la velocidad de extracción, es importante trabajar a una temperatura a la cual no se descompongan los compuestos orgánicos extraídos.
4. **Agitación de la fase líquida:** es importante ya que aumenta el gradiente de concentración y aumenta la velocidad de transferencia de masa al solvente, además evita la sedimentación del sólido con lo cual aumenta la superficie de contacto sólido-líquido y la velocidad de extracción.
5. Al llegar al equilibrio (velocidad de extracción nula) ocurren los siguientes fenómenos:
 1. Cambio de fase del soluto por contacto de la fase sólida con la líquida.

2. Difusión del soluto en el solvente dentro de los poros del sólido por difusión cinética o molecular sin convección.
3. Paso del soluto de la superficie del sólido a la masa de la solución, dada por la difusión y convección de la masa líquida. (Ocón y Tojo, 1970).

Se considera que se alcanzó el equilibrio cuando no hay más transferencia del soluto que pasó a la masa líquida.

La técnica de extracción, denominada *maceración* (que consiste en poner en contacto en un tanque la fase sólida con el líquido), es la más sencilla y económica y por lo tanto se podría usar ampliamente, pero no siempre es aplicable debido a que requiere un largo periodo de contacto entre el sólido y el líquido. Muchas veces, debido a procesos de fermentación rápidos o al desarrollo de alguna flora microbiana o de hongos, se produce la alteración del extracto.

Por otra parte las demandas de la industria, imponen la producción de grandes cantidades de extractos en tiempos breves.

El tamaño de las partículas es casi uniforme y por lo tanto la velocidad de transferencia de masa son prácticamente iguales.

El espesor de la película estacionaria que forma el extractante es infinitesimalmente más pequeño que el diámetro medio de las semillas.

Otra técnica es la extracción con agitación en la cual el material sólido y el solvente extractante son agitados de forma permanente. Esto permite que la película del solvente alrededor de las partículas del sólido se renueve permanentemente lo cual produce un aumento en la velocidad de extracción. Se utiliza un “shaker”, hay de dos tipos, orbitales (que describen una trayectoria circular o elíptica) y lineales (el desplazamiento alcanza una distancia máxima y se invierte el sentido del desplazamiento). El utilizado en esta investigación fue el lineal.

4.1.2. Extracción por Soxhlet

Principios y mecanismos

Las técnicas clásicas para la extracción con disolventes se basan fundamentalmente en la acción del disolvente conjuntamente con el calor y a veces la agitación. La extracción por Soxhlet, se ha utilizado durante mucho tiempo es,

se puede decir, una técnica estándar y ha sido la principal referencia para la evaluación del rendimiento en la extracción sólido-líquido (o lixiviación). La de Soxhlet es una técnica general y bien establecida, que supera en rendimiento a otras técnicas de extracción convencionales, excepto para un campo limitado de aplicaciones cual es la extracción de compuestos termolábiles. Una visión general la aplicación de este método en materiales sólidos fue dada por Luque de Castro y García- Ayuso, (1998).

La extracción por Soxhlet depende fuertemente de las características de la matriz sólida y del tamaño de partícula ya que la difusión en el interior de las partículas puede ser la etapa limitante. Por ejemplo en la extracción de grasas totales a partir de semillas oleaginosas, una extracción de 2 horas da un rendimiento de extracción del 99% si el tamaño de partícula fue de 0,4 mm, mientras que se necesitan 12 horas de extracción para obtener una eficiencia similar si el tamaño de partícula fue de 2,0 mm (Luque García y Luque de Castro, 2004).

La extracción por Soxhlet, se presenta como el método oficial de extracción de numerosos métodos de análisis en el que se requiere la obtención del extracto (la sustancia extraída en solución) de una muestra sólida (Este es el método comúnmente empleado en muchos análisis de alimentos en la AOAC).

Es un proceso muy similar a la maceración, la diferencia consiste en el hecho de que el disolvente de extracción en contacto con la matriz sólida es fresco debido a su evaporación y posterior condensación (Hawthorne *et al*, 2002; Bowyer y Pleil, 1997). Esta técnica se emplea principalmente a escala de laboratorio, aunque también hay extractores de Soxhlet a escala piloto.

Wang y Weller, (2006), comparan el método de Soxhlet con otros como los asistidos por ultrasonido y microondas o con fluidos supercríticos y enumeran algunas ventajas y desventajas del método. Entre las ventajas se pueden enumerar: la temperatura de extracción es alta, no se requiere filtración después de la extracción. Y entre las desventajas: tiempos de extracción largos, no hay posibilidades de agitación para aumentar la velocidad de extracción, gran cantidad de solvente, descomposición de sustancias termolábiles, etc. Además comparan este método con los métodos de extracción asistidos por ultrasonidos, microondas, fluidos supercríticos, etc.

En este trabajo se utilizaron como solvente mezclas, de etanol agua e isopropanol-agua al 20% V/V.

4.2. Comparación de métodos de extracción

A partir de los datos encontrados en la bibliografía, y a manera de síntesis se construyó la siguiente tabla comparativa

Comparación de las características principales relacionados con las actuales técnicas de extracción sólido-líquido

Técnica extractiva	Tamaño de la fase sólida	Solvente	Eficiencia	Tiempo
EAM	No es importante	Fundamental	Elevada	Mínimo
Maceración	Importante	Fundamental	Elevada	Largo
Percolación	Importante	Fundamental	Baja	Medio
Soxhlet	Importante	Fundamental	Elevada	Largo
Fluido supercrítico	Importante	Fundamental	Media	Medio
Ultrasonido	No es importante	Fundamental	Elevada	Medio
HPSE	No es importante	Fundamental	Elevada	Mínimo

Tabla N° 9. Comparación de métodos de extracción sólido-líquido (Camel, 2001)

En la tabla anterior se pueden observar la incidencia cualitativa de parámetros, como: tamaño de la fase sólida, composición del solvente, tiempo de extracción y eficiencia en las diversas técnicas de extracción sólido-líquido en forma general.

Método	Tiempo [min]	Solvente	Consumo de Solvente [mL/g]	Rendimiento de extracción [%]
Extracción con agitación	720	Etanol 95%	40	2,58
Extracción Ultrasónica	30	Etanol 95%	60	1,72
Extracción a reflujo	120	Etanol 95%	40	2,22
SFE	180	Etanol 95% + CO ₂	-	1,52
MAE	5	Etanol 95%	25	5,11

Tabla N° 10. Comparación cuantitativa de métodos extractivos de saponinas triterpénicas de *Ganoderma atrum*. (Chen *et al.*, 2007).

La tabla 10 permite la comparación cuantitativa de la extracción de saponinas. De la misma se puede deducir que la extracción de mayor eficiencia son la EAM y la extracción con agitación, aunque en un porcentaje considerablemente menor.

4.3. Metodología

4.3.1 Soxhlet

Para determinar el final de la extracción, lo que se hizo fue medir el índice de refracción de la solución a intervalos de tiempo regulares hasta que el mismo se mantuvo constante e igual a la del solvente puro (introduciendo un tubo por el extremo del refrigerante hasta la cámara y sacando una gota antes del sifonamiento del solvente). Posteriormente la concentración final de saponinas en el extracto se cuantificó por el método espectrofotométrico antes mencionado.

Los resultados promedio de 3 mediciones fueron los siguientes:

Solvente	Tiempo de extracción	% de saponinas extraídas
Etanol 20% - agua	310 minutos	1,52±0,20
Isopropanol 20% - agua	390 minutos	2,57±0,15

Tabla 11. Rendimientos de extracciones con Soxhlet.

Los porcentajes de alcohol empleados, corresponden a los óptimos obtenidos en la extracción con MO, al igual que la relación volumen de solvente/ g de semilla.

4.3.2. Extracción con agitación

Las extracciones se realizaron con las mismas mezclas hidroalcohólicas y la temperatura fue la ambiente. Se tomó muestra a intervalos de tiempo regulares y se determinó en cada muestra el porcentaje de saponinas extraídas espectrofotométricamente.

Los resultados obtenidos promedio de 3 mediciones fueron los siguientes:

Etanol 20%-agua

Tiempo, h	Rendimiento de Extracción [%]
1	0.625±0.05
2	0.850±0.06
3	0.908±0.05
4	0.988±0.03
6	1.268±0.05
8	1.853±0.03
10	1.985±0.02
12	2.027±0.01
13	2.027±0.01

Tabla 12. Extracción con “shaker”



Figura 27. Extracción con “shaker” etanol-agua

Isopropanol 20%-agua

Tiempo, hs	Rendimiento de Extracción [%]
1	0.913±0.06
2	1.145±0.07
3	1.174±0.05
4	1.28±0.05
6	1.339±0.04
8	1.723±0.04
10	1.956±0.06
12	2.325±0.05
13	2.623±0.02
14	2.623±0.01

Tabla 13. Extracción con “shaker”

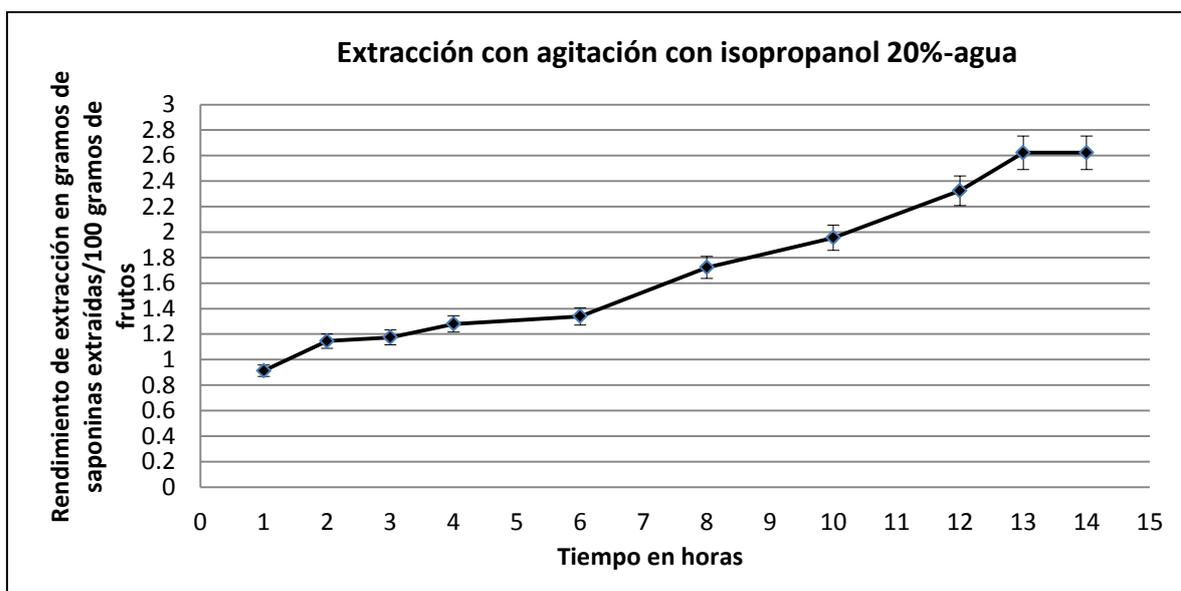


Figura 28. Extracción con “shaker” isopropanol-agua

Como se pueden observar en las tablas 12 y 13, el rendimiento de extracción con la mezcla isopropanol 20%-agua fue casi un 23% mayor en casi el mismo tiempo.

4.4. Tabla general comparativa con los métodos extractivos realizados

Método extractivo	Tiempo (min.)	Solvente	Temperatura °C	Rendimiento de extracción [%]
EAM	20	Etanol 20%-agua	90	1.56
EAM	20	Isopropanol 20%-agua	90	2.66
HPSE	20	Etanol 20%-agua	90	1.83
HPSE	20	Isopropanol 20%-agua	90	2.88
Soxhlet	310	Etanol 20%-agua	80	2.03
Soxhlet	390	Isopropanol 20%-agua	90	2.62
Extracción con agitación	720	Etanol 20%-agua	20	2.03
Extracción con agitación	780	Isopropanol 20%-agua	20	2.62

Tabla 14. Métodos extractivos realizados

Del análisis de la tabla anterior se puede deducir que el tiempo empleado y el rendimiento obtenido, los dos métodos más convenientes son el EAM , y el LPSE con isopropanol 20%-agua. Si bien el rendimiento de extracción por agitación y con Soxhlet para este solvente son casi iguales al de los dos restantes, los tiempos son entre 20 y casi 40 veces mayor es, por el mismo motivo, el gasto de energía en ambos casos es sustancialmente mayor que para EAM o HPSE.

Teniendo en cuenta que el contenido total de saponinas de las semillas es de $2,90 \pm 0,01$, la tabla 14 se transforma en la siguiente tabla:

Método extractivo	Tiempo (min.)	Solvente	Temperatura °C	Porcentaje de saponinas extraídas (1)
EAM	20	Etanol 20%-agua	90	56.9
EAM	20	Isopropanol 20%-agua	90	91.7
HPSE	20	Etanol 20%-agua	90	63.1
HPSE	20	Isopropanol 20%-agua	90	99.3
Soxhlet	310	Etanol 20%-agua	80	70
Soxhlet	390	Isopropanol 20%-agua	90	90.3
Extracción con agitación	720	Etanol 20%-agua	20	70
Extracción con agitación	780	Isopropanol 20%-agua	20	90.3

Tabla 15. Comparación de rendimientos extractivos

(1) El porcentaje de saponinas extraídas se calcula como:

$$\frac{\text{Porcentaje de saponinas extraídas}}{\text{Porcentaje de saponinas totales}} \times 100$$

4.5 Conclusión

Por lo cual el mejor método extractivo es el HPSE, ya que en una sola etapa de 20 minutos se extrae prácticamente la totalidad de las saponinas (99,3%). Con microondas, extrayendo en 2 etapas de 20 minutos cada una, se extrae el 97,1% y en tres etapas (20 minutos más) se extrae prácticamente el 100%.

Capítulo 5

**Purificación de las
saponinas a partir de las
soluciones de las
extracciones realizadas**

**Determinación por
análisis de la pureza**

5.1. Purificación de las saponinas extraídas

Debido a sus características estructurales especiales, la extracción y aislamiento de saponinas plantea un serio desafío. Se han investigado los métodos convencionales, así como también los más recientes, que significan un ahorro de tiempo y de solvente pero hasta el momento no se ha encontrado un proceso óptimo y que económicamente sea factible.

5.2. Métodos de purificación encontrados en bibliografía

5.2.1. Cromatografía

Al extracto de saponinas se lo puede purificar mediante cromatografías con el fin de eliminar todos los compuestos que impurifican a las saponinas. Distintos métodos cromatográficos fueron investigados y publicados entre los que se puede mencionar: la cromatografía flash (Still. et al., 1978) cromatografía líquida de baja presión (Marston and Hostettmann, 1991), cromatografía líquida de media presión (Orsini et al., 1991), cromatografía líquida de alta performance (Gómez-Caravaca et al., 2011).

Un método común es la cromatografía en columna abierta. La cromatografía en columna abierta se puede realizar con una considerable variedad de adsorbentes, entre estos los de mayor utilización son la sílica gel y alúmina. Como eluyentes se utilizan distintos solventes como por ejemplo mezclas ternarias de cloroformo, metanol y agua o cloroformo, etanol y agua como se menciona en Hostettmann y Marston, (2005).

5.2.2. Fluidos supercríticos

Otra alternativa es con fluidos supercríticos, (SFE) Estos presentan propiedades intermedias entre aquellas de los gases y los líquidos, lográndose en general una combinación de las ventajas de ambos estados, como ser altas densidades, bajas viscosidades, altas difusividades y muy bajas tensiones superficiales que permiten la fácil penetración del fluido supercrítico en los microporos de los materiales, lo que permitiría desarrollar procesos extractivos con mayores rendimientos, en comparación con solventes líquidos o gaseosos.

Mediante cambios de presión y temperatura en la región crítica se pueden cambiar sus propiedades termodinámicas y su selectividad como solvente extractivo.

Podría aplicarse a la purificación de las saponinas para separarlas de los demás componentes o para separarlas en distintas fracciones. (McHugh y Krukonis, 1994).

En esta técnica el fluido supercrítico puede actuar como solvente, o incluso como anti-solvente. A veces se puede mejorar la solubilidad utilizando cosolventes.

Características de un fluido supercrítico:

En general presenta gran poder disolvente junto con una enorme capacidad de penetración en sólidos, lo que permite el agotamiento rápido –con el caudal y/o tiempos de extracción apropiados- y prácticamente totales de los sólidos extraíbles. Pueden separarse totalmente de forma sencilla de los extractos, simplemente modificando la presión o la temperatura, hasta el extremo, si es necesario, de que el fluido pase al estado gaseoso.

Los fluidos más usados para este método, son habitualmente: CO₂, H₂O, C₂H₆, C₂H₄, C₃H₈, Xe.

La densidad del fluido supercrítico es de 100 a 1000 veces mayor que la de un gas, y comparable a la de un líquido. En consecuencia, las interacciones moleculares pueden ser fuertes permitiendo acortar las distancias intermoleculares (Knowles *et al.*, 1988). Como resultado, las propiedades de solvatación son similares a las de los líquidos, pero con viscosidades significativamente más bajas y coeficientes de difusión más altos.

Al ser de 10 a 100 veces más bajos los valores de viscosidad y de 10 a 100 veces más altos los coeficientes de difusión respecto a los de los líquidos, hacen que la transferencia de masa de solutos en extracciones con fluidos supercríticos sea significativamente más alta que la de extracciones con líquidos (Schneider, 1978).

En comparación con otros tipos de extracción, las principales ventajas que se destacan en la extracción con fluidos supercríticos son:

1. menores tiempos de extracción,
2. uso, generalmente, de un fluido no tóxico.

3. extracción a temperaturas que no afectan la estabilidad de compuestos termolábiles,
4. fácil separación de los solutos del fluido supercrítico.
5. posibilidad de realizar fraccionamientos en la extracción,
6. posibilidad de seleccionar el tipo de extracción eligiendo la polaridad del fluido, su densidad y la utilización o no de modificadores,

Según McHugh y Krukonis, (1994), al haber una gran compresibilidad los grandes cambios de densidad del fluido y, en consecuencia, el poder de solvatación, pueden ser realizados mediante pequeños cambios en la presión a temperatura constante si se trabaja a temperaturas próximas a la crítica.

Al depender la fuerza solvatante de un fluido supercrítico de su densidad, la posibilidad de solvatación de una sustancia en particular puede ser modificada fácilmente cambiando la presión de extracción y, en menor medida, la temperatura. Esto hace que la extracción con fluidos supercríticos sea selectiva.

Además, con la propiedad de que la transferencia de masa está mejorada, el uso de la extracción con fluidos supercríticos proporciona tiempos de extracción más breves y una mayor eficiencia de extracción debido a una mejor penetración en la matriz (Wright *et al.*, 1987). Debe considerarse también un efecto químico, que explica la interrelación entre el fluido supercrítico y el soluto, y que es diferente para cada soluto y depende de su polaridad, propiedades ácido-básicas y de la formación de enlaces puentes de hidrógeno.

5.2.3. Extracción con solvente

La **extracción líquido-líquido**, también conocida como *extracción con solventes* o *extracción con disolventes*, es empleada para separar una mezcla en solución utilizando la diferencia de solubilidad de sus componentes entre dos líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles (por ejemplo, agua y n-butanol).

En la extracción líquido-líquido se extrae de una solución una sustancia (solute) poniendo la misma en contacto con otro líquido, inmiscible o parcialmente miscible, con el solvente de la solución, que tiene mayor afinidad por el soluto, pasando parte del soluto de la solución al otro líquido (extractante), repartiéndose el soluto entre las dos fases y estableciéndose un equilibrio.

La separación en columnas cromatográficas abiertas, empleando fases estacionarias como silicagel o alúmina y la fase móvil formada por mezclas ternarias: CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:40:10), CHCl_3 -EtOH- H_2O (7:10:3) y nBuOH-EtOH- H_2O (5:1:4) (Kizu et al., 1985) no permitieron una purificación adecuada de las saponinas de quinoa por no lograrse una buena separación con los flavonoides. Lo cual se puso de manifiesto por el color característico de estas sustancias, siendo las saponinas incoloras.

Por ese motivo se optó por la extracción con solvente y la purificación final por precipitación por disminución de la constante dieléctrica del solvente y posteriormente por recristalización, que son métodos clásicamente utilizados en la química orgánica.

5.2.4. Procedimiento

Las soluciones de extracciones de las saponinas de las semillas de quinoa (por EAM y HPSE) fueron de aproximadamente 3 L, se concentraron en un evaporador rotatorio a escala piloto (Foto 19).



Foto 19. Evaporador rotatorio escala piloto marca Buchi

Se obtuvo un concentrado de saponinas de un color ámbar como se puede observar en la siguiente fotografía:



Foto 20. Concentrado de saponinas sin purificar

El concentrado (Foto 20) se secó a una temperatura de 50°C en una estufa con vacío hasta masa constante y se guardó en un desecador. El contenido de saponinas en este concentrado de saponinas sin purificar fue del 82,3%. Para la cuantificación, se disolvió una masa conocida del concentrado en un volumen de metanol y se derivatizó con el reactivo de Lieberman – Burchard, procediendo de acuerdo a lo descrito en el capítulo 2, páginas 61 a 68, siendo la principal impureza los flavonoides

A continuación se dispuso de 4 tubos de centrifuga de 50 mL, pesándose en cada uno 1,500 g del concentrado. A cada tubo se le agregaron 40,0 mL de agua destilada y se agitaron hasta total disolución del concentrado. A continuación se agregó en cada tubo 10,0 mL de n-butanol de calidad reactivo analítico. Se empleó tubos de centrifuga en lugar de ampollas dada la dificultad observada para lograr romper las emulsiones formadas. A fin de separar limpiamente las fases se recurrió a un dispositivo ideado *ad hoc* que puede verse en la siguiente fotografía. Está formado por una jeringa hipodérmica de 60 mL y una aguja especial (spinal needle) que tiene 12 cm de largo y permite llegar hasta el fondo del tubo de centrifuga. Ver fotografía 21.

Se colocaron los tubos en un “shaker” orbital y se realizó la extracción a 25°C durante 1 hora. Luego se centrifugaron los tubos a 2000 g durante 45 minutos lograndose una muy buena separación de las dos fases (Foto 21).

Se hicieron extracciones de muestra como puede verse en la siguiente fotografía. Está formado por una jeringa de 60 mL y una aguja espinal (spinal needle) que tiene 12 cm de largo y permite llegar hasta el fondo del tubo de centrifuga. Ver fotografía 21.



Foto 21- Modo en que se extrae una fase

Estas muestras se utilizaron para determinar por espectrofotometría mediante la reacción de Lieberman-Burchard, las concentraciones de saponinas en la fase acuosa original, y en las fases acuosa orgánica en equilibrio. Por

balance de masa se determinó que la masa remanente en la fase acuosa más la masa ganada por la orgánica equivalen a la masa contenida en la fase acuosa original. Con estos datos se determinó la constante de reparto, como sigue: $K_D = [S]_o/[S]_w$, donde K_D es la constante de reparto o de partición; $[S]_o$ es la concentración de saponinas en la fase orgánica y $[S]_w$ es la concentración de saponinas en la fase acuosa. Por la ley de Beer las concentraciones son proporcionales a las absorbancias, la constante de reparto se puede determinar realizando el cociente de las absorbancias, por lo tanto:

$$K_D = 1.5354/2.0450 = 0.75 \pm 0.3 \quad (n=3)$$

Un método alternativo consistió en tomar 5,00 mL de cada una de las fases mencionadas y evaporar los solventes en pequeños balones (ver fotografía 22), empleando un evaporador rotativo Buchi R-215 de laboratorio, terminando de secar en estufa con vacío hasta masa constante. Conocidas las masa y los volúmenes, se calculó la concentración de saponinas. Por este método también pudo verificarse el balance de masas, mientras que la K_D dio $0,74 \pm 0.2$ ($n=3$).

Por lo cual se concluyó que el valor promedio de la constante de reparto es de $0,75 \pm 0.3$. No se encontraron datos en la bibliografía para poder compararlos con los determinados.



Foto 22. Saponinas extraídas, secadas en vacío

Por otro lado, si se realizan los cálculos teóricos correspondientes para 4

extracciones sucesivas en la fase acuosa debería permanecer el 4,5% de la concentración inicial. La medición experimental estableció que quedaba sin extraer el 5,1 %. lo cual pone de manifiesto que la constante de reparto tiene un valor aceptable.

Para la extracción y purificación de las saponinas, se procedió a una nueva extracción, esta vez empleando un recipiente con tapa (frasco) de 750 mL. Como se muestra en la siguiente fotografía



Foto 23. Frasco para la extracción con butanol (capa superior)

La capa inferior es la solución acuosa del concentrado de saponinas.

Este frasco se colocó en el shaker de escala piloto, como se puede observar en la foto 24, respetándose las mismas condiciones ya establecidas de tiempo y temperatura.

En este caso las fases se separaron por decantación dejando en la cámara fría durante un lapso de tiempo de 3 días.



Foto 24. "Shaker" con frasco para extracción

5.3. Purificación

Materiales y métodos

El extracto butanólico se concentró a sequedad en el evaporador rotativo escala laboratorio, el producto obtenido tenía un color blanco muy poco amarillento, se analizó y se determinó que la concentración en saponinas fue del 90,7%.

Finalmente se disolvió la saponina purificada por precipitación en la menor cantidad de agua destilada necesaria y esta solución se procedió a verter en un tubo de centrifuga que contenía un solvente poco polar como el éter dietílico (1 volumen de éter 10 veces mayor que el de la solución acuosa), el éter tiene una constante dieléctrica de 4,3 (el del agua es 80,1) esto produce una disminución de la solubilidad de las saponinas que son componentes polares, produciéndose un precipitado blanco que se separó por centrifugación y que está constituido por la saponina purificada por precipitación. La saponina secada se disolvió en un mínimo volumen de agua destilada a 60°C y por enfriamiento se efectuó la recristalización de la misma, separandola de la solución saturada por centrifugación y secandola. Determinada la concentración en saponinas por el método espectrofotométrico fue del $96,3 \pm 0.1\%$ ($n=3$)

Los porcentajes de pureza de saponinas (no de quinoa) que ofrece Sigma-Aldrich tienen purezas del 97 al 98%, por lo tanto considero que se alcanzó una pureza aceptable.

Para determinar si las saponinas purificadas por recristalización contienen impurezas se realizó una cromatografía en placa delgada con cromatofolios de silicagel F, se desarrollaron utilizando como solvente butanol saturado en agua

Las TLC (Foto 25), se pudieron observar perfectamente con luz UV, pero no fue factible fotografiarlas.

El yodo es un revelador general y el reactivo de Lieberman-Burchard es específico para saponinas triterpénicas (también para las esteroidales pero dan colores verdes a verdes azuladas) y como se puede observar en el revelado con este último reactivo aparecen las mismas manchas que en el revelado con yodo, lo que indica que se trata de saponinas y no de otras sustancias.

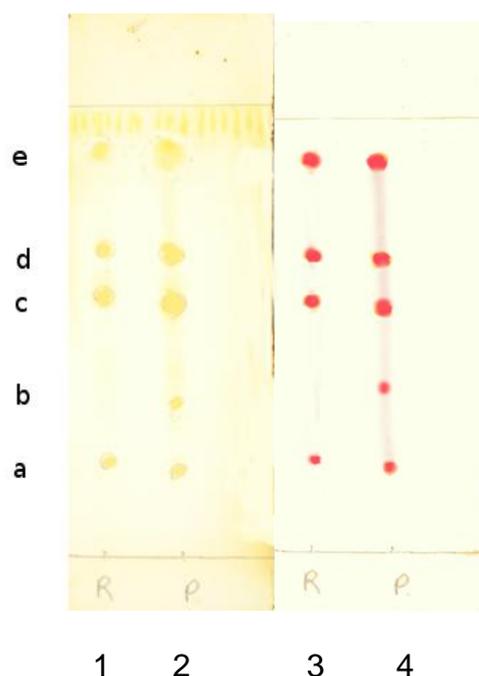


Foto 25. TLC: la de la izquierda revelada con yodo, la de la derecha con el reactivo de Lieberman-Burchard.

En "R" se sembró la saponina recristalizada y en "P" la purificada por precipitación.

Relaciones de frente:

Cromatofolio revelado con yodo:

Saponinas purificadas: 2a: 0,19; 2b: 0,35; 2c: 0,56; 2d: 0,67 y 2e: 0,9

Saponinas recristalizadas: 1a: 0,2; 1c: 0,57; 1d: 0,68 y 1e:0,91.

Cromatofolio revelado con reactivo de Lieberman-Burchard:

Saponinas purificadas: 4a: 0,19; 4b: 0,36; 4c: 0,56; 4d: 0,68 y 4e: 0,9

Saponinas recristalizadas: 3a: 0,2; 3c: 0,57; 3d: 0,68 y 3e:0,90.

Se pueden observar en las TLC para las saponinas recristalizadas 4 manchas: Además del aparente "tailing" de las manchas en P, llama la atención una mancha a $R_f = 0,35$ la cual está ausente en "R". Dado que reaccionó con el reactivo de Lieberman-Burchard, es altamente probable que se trate de una saponina la cual se perdió en la purificación por recristalización.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Del análisis de los resultados de las extracciones de las saponinas asistidas por microondas y a alta presión se pone de manifiesto que estos métodos extractivos presentan ventajas frente a los métodos clásicos como la extracción Soxhlet y reflujo habitualmente utilizados en los laboratorios.

Las ventajas que se pueden enumerar son las siguientes:

1. Reducción del volumen de solvente utilizado
2. Disminución significativa del tiempo de extracción.
3. Porcentajes cercanos al ciento por ciento en los rendimientos de extracción.
4. Reducción del gasto energético con relación a los métodos de Soxhlet y de reflujo.

La conjugación de estas ventajas permite realizar extracciones con rendimientos óptimos en tiempos breves, lo cual no solo agiliza los resultados del análisis químico si no también contribuye a aumentar la exactitud de los mismos, ya que el rendimiento de la extracción es cercano al 100%.

Es de destacar que estos métodos investigados en esta tesis, se podrían aplicar a la extracción de productos fitoquímicos y de distintos principios activos con el fin de cuantificar los mismos, ajustando las variables para cada vegetal. También, habría que realizar una investigación similar para determinar el solvente y las condiciones óptimas de extracción para los diferentes materiales.

Por otra parte no sería necesario realizar los estudios de tendencias, ya que como se comprobó en la presente investigación las condiciones óptimas de extracción son coincidentes con las que predice el diseño experimental de Taguchi.

Por consiguiente si se obtiene la composición del solvente utilizada en los métodos clásicos de extracción, citada en la bibliografía, solamente quedarían 3 variables, si consideramos cada una de 4 niveles habría que realizar solo 9 experimentos para determinar las condiciones óptimas de extracción, se tomaría un arreglo L9, empleando para los resultados experimentales criterios para la aceptación o rechazo de datos.

De esta manera se podrá optimizar el proceso extractivo rápidamente y de manera confiable.

Es de destacar que de los dos métodos extractivos investigados, la extracción a alta presión es factible de ser escalado a Piloto o Industrial, ya que se utilizan presiones del orden de 3 a 5 bar y por consiguiente el extractor no requiere de un material costoso para su construcción. El método de extracción con microondas depende del desarrollo tecnológico de esta área.

PURIFICACIÓN

El proceso de purificación empleado requiere de una tecnología que es la tradicionalmente empleada en la purificación de sustancias orgánicas y los análisis realizados ponen de manifiesto que se logra una pureza del orden de las que se mencionan en los catálogos de productos químicos (97 a 98% de pureza) con una pérdida en saponinas menor del 5%.

Las sapogeninas, obtenidas por hidrólisis ácida de las saponinas tienen un alto valor económico, de 6 a 142 dólares por gramo de acuerdo al tipo de aglicona y a su pureza en el mercado industrial y farmacéutico (Benavides, et al, 2011), lo cual le da un valor agregado a las semillas de quinoa. Si las saponinas extraídas se procesan, se evita la contaminación de los cursos de agua lo que ya de por sí es de gran significación para la preservación del medio ambiente.

También se puede mencionar un método catalítico utilizando beta glicosidasas como la amigdalina. Habría que determinar las condiciones óptimas de las enzimas. Cabe destacar que para eliminar el glicósido malvina (diglucósido del malvidol), se ensayó con éxito la hidrólisis del citado compuesto por catálisis enzimática que se encuentra presente en los vinos tipo Frambua, producido a partir de uvas *Vitis lambruscana* que se producen en la Colonia Caroya de la provincia de Córdoba-Argentina (Guzmán y Trippi, 1970).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Abisch, E. & Reichstein, T. (1960). Orientierende chemische Untersuchung einiger Apocynaceen. *Helvetica Chimica Acta*. 43, 1844-1861.
2. Anderson, M. & Witcomb, P. (2007). *DOE Simplified: Practical Tools for Effective Experimentation*, 7th edn. New York. Productivity Press Inc.
3. Apaza, S. Recomendar una estrategia de uso de las EOS importantes en áreas prioritarias. Informe 2007 – 2008. NUS IFAD II. Fundación PROINPA. La Paz – Bolivia. pp 72 -86.
4. Augustin, J., Kozina, V., Andersen, S., Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoids saponins, *Phytochemistry*, 72, 435-457.
5. Baccou, J. C., Lambert F., and Sauvaire, Y. (1977). Spectrophotometric method for the determination of total steroidal sapogenin. *Analyst*. 102, 458-465
6. Bacigalupo, A. y Tapia, M. (1990) Potencial agroindustrial de los cultivos andinos subexplotados. En: Tapia M. (ed.). *Cultivos Andinos subexplotados y su aporte a la alimentación*. FAO. Ediciones Gegra S. A. Satiago, Chile. Pp. 136-163.
7. Bacigalupo, A. y Tapia, M. E. (2000). Tecnología para la preparación de alimentos. *Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación*. FAO. Santiago de Chile, Cap. 5: de Agroindustria.
8. Barboza, C. M.; Bertoni, V. A.; Martín, A. L. (2011). Harinas de quinoa: “Elaboración de galletas libres de gluten”. Tesis de grado de la Licenciatura en Nutrición. Escuela de Nutrición. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.
9. Benavides, O. L., Arango, O., Hurtado, A. M.; Rojas, M. C. (2012). Cuantificación de Sapogeninas del Jugo Fresco y Fermentado de Fique (*Furcraea gigantea*) mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-PDA). *Información Tecnológica*, 23(3), 67-76.
10. Bhargava, A., Shukla, S., and Ohri, D. (2003). Genetic variability and heritability of selected traits during different cuttings of vegetable *Chenopodium*. *Ind. J. Genet. Pl. Breed* 63, 359–360.

11. Bojanic A. (2011). La Quinoa: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. FAO, p: II.
12. Borneo R. Ciencia y Tecnología de los cereales. 2009. <http://cytcereales.blogspot.com.ar/2009/06/que-son-los-pseudocereales.html>
Consultado el 8 de enero a las 10:55 horas.
13. Bowyer JR, Pleil JD (1997). Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the analysis of organic compounds from carpet samples. J. Chromatogr. 787(1-2): 171-179.
14. Brady, K., Hoa, Ch., Rosen, R., Sanga, S., and Karwe, M. (2007). Effects of processing on the nutraceutical profile of quinoa. Food Chem. 100(3), 1209–1216.
15. Brady, K., Hoa, Ch., Rosen, R., Sanga, S., and Karwe, M. (2007). Effects of processing on the nutraceutical profile of quinoa. Food Chem. 100(3), 1209–1216.
16. Camel, V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. Analyst, 126, 1182–1193
17. Cervilla, N., Mufari, R., Calandri, E., Guzmán, C. (2012). Determinación del contenido de aminoácidos en harinas de quinoa de origen argentino. Evaluación de su calidad proteica. Actualización en Nutrición. 13 (2): 107-113.
18. Cervilla, N.; Bonamino, M.; Carreño, V. (2009) Elaboración de sopas a partir de la molienda de semillas de Quinoa. INVENIO. 12(23): 119-129.
19. Cervilla, N.; Bonamino, M.; Carreño, V.; Calandri, E.; Medina Basso, M.; Conci, S.; Gianna, V.; Guzmán, A. (2008). Aplicación de la tecnología de alimentos a semillas de quinoa para la elaboración de sopas cremas e instantáneas. 2º Congreso de Salud y Gastronomía. FCEFYN, Secyt. UNC.
20. Chauhan, G., Eskin, N., and Mills, P. (1999). Effect of saponin extraction on the nutritional quality of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) proteins. J. Food Sci. Technol. 2, 123–126.
21. Chee, K. K., Wong M.K. y Lee. H.K. (1996). Optimization of microwave-assisted solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments using a microwave extraction system with high-performance

- liquid chromatography-fluorescence detection and gas chromatography-mass spectrometry J. Chromatogr. A. 723: 259.
22. Chen, Y., Xie, M. Y. & Gong, X. F. (2007). Microwave assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. Journal of Food Engineering, 81, 162-170.
23. Choi, M. P.K., Chanb, K.C., Leungb, H. W., Huie, C. W. (2003). Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions. Journal of Chromatography A, 983, 153–162.
24. COFECyT. (2008). Debilidades y desafíos tecnológicos del sector productivo. Quinoa y amaranto Jujuy. Agencia Nacional de Procción Científica y Técnica. Programa para la federalización de la ciencia, la tecnología y la innovación productiva. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Unión Industrial Argentina.
25. Design-Expert V8 Software for Design of Experiments (DOE). (2011). Stat Easy.
26. Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Gonzalez, L. A., Tablada, E. M., Diaz, M., Robledo, C. W. Balzarini, M. G. (2008) Estadística para las Ciencias Agropecuarias. Editorial Brujas. 7º Edición.
27. Dini, I., Jacobsen, S. E., Schettino, O., Tenore, G. & Dini, A. (2000) Isolation and characterization of saponins and other components in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). In, Proceedings of COST 814. Conference, Crop Development for Cool and Wet Regions of Europe, Pordenone 10-13 May, Italy, p. 46.
28. Eguizabal, A., Zuloaga, O., Etxebarria, N., Fernández, L.A., Madariaga, J.M. (1998) Comparison of microwaveassisted extraction and Soxhlet extraction for phenols in soil samples using experimental designs. Analyst, 123: 1679-1684.
29. Eskilsson, C.S. y Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. Journal of Chromatography A., 902: 227-250.
30. Estrada, A., Bing, L. & Laaverld, B. (1998). Adjuvant action of *Chenopodium quinoa* saponins on the induction of antibody responses to intragastric and

- intranasal administers antigens in mice. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 21, 225-236.
31. FAO. (2011) La Quinoa: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. 1- 39.
32. Feuillé, L. (1725). *Histoire des plantes medicinales qui sont les plus en usage aux Royaumes de Pérou e du Chily dans l'Amérique Meridionale*.
33. Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H., and Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: A review. *British J. Nutr.* 88, 587–605.
34. Fuentes, F.; Martínez, E.A.; Hinrichsen, P.; Jellen, E.; Maughan, J. (2009). Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) germplasm using multiplex fluorescent microsatellite markers. *Conservation Genetics*. 10(2): 369-377.
35. Gabriel C.; Gabriel S.; Grant B.; Halstead J.; Mingos M. (1998). “Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating”. *Chemical Society Reviews*. 27, 213-223.
36. Gallardo, M. G.; Prado, F.E. y Gonzalez, J. A. (2000). Efecto de la radiación sobre la producción de pigmentos betalámicos en quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Cultivos Andinos* FAO. Cap. 3.9.
37. Gallardo, M.; Gonzalez, A. y Ponessa, G. (1997). Morfología del fruto y semilla de *Chemopodiun quinoa* Willd (Quinoa) *Chenopodiacea*. *Lilloa* 39,1.
38. Gallardo, M.; Prado, F. y González, J. (1996). Efecto del cloruro de sodio sobre el contenido de betalainas en *Chenopodium quinoa* Willd. XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mendoza. Argentina. Actas 20-21 marzo. P, 284-285.
39. Ganzler, K., Salgó, A., & Valkó, K. (1986). Microwave extraction : A novel simple preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography*, 371, 299-306.
40. Ganzler, K., Salgo, A.y Valko, K. (1986) *J. Chromatogr.* 371: 299.
41. Gee, J., Wortley, G., Johnson, I., Price, K., Rutten, A., Houben, G., and Penninks, A. (1996). Effect of saponins and glycoalkaloids on the permeability and viability of mammalian intestinal cells and on the integrity of tissue preparations *in vitro*. *Toxic. In Vitro* 10, 117–128.
42. Gianna, V. (2013) Resultados no publicados.

43. Gianna, V., Montes, J. M., Calandri, E. L., Guzmán, C. A. (2012) Impact of several variables on the microwave extraction of *Chenopodium quinoa* Willd saponins. International Journal of Food Science and Technology. **47**, 1593-1597.
44. Gómez-Caravaca, A. M., Seguro-Carretero, A., Fernández-Gutierrez, A. and Carboni, M. F. (2011). Simultaneous Determination of Phenolic Compounds and Saponins in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) by a Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Electrospray Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry Methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 10815-10825.
45. Güçlü-Üstündag, O. and Mazza, G. (2007). Pressurized low polarity water extraction of saponins from cow cockle seeds. Journal of Food Engineering. Elsevier, 80, 2, 619-630.
46. Güçlü-Üstündag, O. and Mazza, G. (2007). Saponins: Properties, applications and processing. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 47, 231–258.
47. Güçlü-Üstündag, O. and Mazza, G. (2008) Extraction of saponins and cyclopeptides from cow cockle seed with pressurized low polarity water. LWT - Food Science and Technology. 41, 8, 1600-1606
48. Guzmán, C. A. y Trippi, V. S. (1970). Contenido y control enzimático del diglucósido del Malvidol en vinos de Córdoba, Argentina. Dirección de Asuntos Agrarios de la provincia de Córdoba (inédito) 1-4.
49. Hawthorne SB, Grabanski CB, Martin E, Miller DJ (2002). Comparison of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction, and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity, and effects on sample matrix. J. Chromatogr. 892(1-2): 421-433.
50. Hostettmann, K. y Marston, A. (1995). Chemistry and pharmacology of natural products: Saponins. Cambridge University Press. p. 2-3
51. Hunziker A. T. (1943). Revista Argentina Agronómica. 10 (4), 306-319.
52. Hunziker, A. T. (1952). Los pseudocereales de la agricultura indígena de América. Museo Botánico de la UNC. p. 44-54.
53. InfoStat. Software estadístico desarrollado por docentes-investigadores de Estadística y Biometría y de Diseño de Experimentos de la Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC).

54. Jacobsen, S. E. 2003. The Worldwide Potential for Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Food Reviews International. 19, 167-177.
55. Kaufmann B., Christen P. (2002). Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurized Solvent Extraction. Phytochem. Anal. **13**, 105–113
56. Kaufmann, B. y Christen, P. (2002) Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurized Solvent Extraction. Phytochem. Anal. 13, 105–113.
57. Kizu, H., Kitayama, S., Nakatani, F., Tominori, T. and Namba, T. (1985). On the saponins of *Hedera nepalensis*. Chem. Pharm. Bull., 33, 3324-3329.
58. Knowles, D.E., Richter, B.E., Rede, E., Merk, W., Precht, D., Tinunen, H. (1988). Supercritical fluid chromatography: a new technique for AOAC. Milchwissenschaft 71, 451.
59. Koziol, M. J. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). (1992). Journal of Food Composition and Analysis: an Official Publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems. 5(1):35-68.
60. Koziol, M.J., (1991). Afrosimetric estimation of threshold saponin concentration for bitterness in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). J. Sci. Food Agric. 54, 211-219.
61. Kuljanabhadgavad, T., Thongphasuk, P., Chamulitrat, W., and Wink, M. (2008). Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. Phytochemistry 69, 1919–1926.
62. Kuljanabhadgavad, T., Thongphasuk, P., Chamulitrat, W., Wink, M. (2008). Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. Phytochemistry. Vol. 9, p. 1919-1926
63. Kwon, J. K., Choi, Y. H., Chung, H. W. & Lee, G. D. (2006). The characteristic of a microwave extraction process used for saikosaponins from *Blumeurum falcatum* root. International Journal of Food Science and Technology, 41, 67-75.
64. León, A. E. y Rosell, C. M. Editores (2007). De tales harinas tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Capítulo 6: Cultivos andinos. 271-277.

65. Li, J., Guo, W. J. & Yan, Q. Y. (2002). Effects of ursolic acid and oleanolic acid in human colon carcinoma cell line HCT15. *World Journal of Gastroenterology*, 8, 493-495.
66. Lidström P.; Tierney J.; Wathey b; Westman J. (2001). "Microwave assisted Organic Synthesis- a review". *Tetrahedron*. 57, 9225-9283.
67. Luque de Castro, M. D., & Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369, 1–10.
68. Luque-Garcia, J. L., & Luque de Castro, M. D. (2004). Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A*, 1034, 237–242.
69. Madl, T., Sterk, H., Mittelbach, M., Rechberger, G. (2006) Tandem Mass Spectrometric Analysis of a Complex Triterpene Saponin Mixture of *Chenopodium quinoa*. *American Society for Mass Spectrometry. J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 17, 795-806.
70. Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Hoang, L., Lio, V. (2010). Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents, *Fitoterapia*: 81, 703-714.
71. Marie, E. L., Jacqueline, S., Steven, B., Willem, L., & Farid, C. (2007). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil, . *Journal of Food Engineering*, 79(3), 1079-1086.
72. Martini, J. M. y Storani, F. (2010). Obtención de un proceso industrial para la producción de almidón a partir de granos de *Chenopodium quinoa* Willd: mediante la utilización de métodos químicos, físicos y/o enzimáticos. Tesis de grado de Ingeniería Química. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
73. Marston, A. and Hostettmann, K. (1991). Modern separation method.s. *Nat. Prod. Rep.*, 8, 391-413.
74. Mattina, M. J. I., Berger, W. A. I., & Denson, C. L. (1997). Microwave-assisted extraction of taxanes from biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4691-4696.

75. McHugh, M. and Krukonis, V. *Supercritical Fluid Extraction*. 1994 Elsevier. 342-357.
76. Meyer, B., Heinstein, P., Burnouf-Radosevich, M., Delfel, N., and McLaughlin, J. (1990). Bioactivity-directed isolation and characterization of quinoside a: One of the toxic/bitter principles of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J. Agric. Food Chem.* 1990(38), 205–208.
77. Miralla, F. S. (2009). *Cadena Agroalimentaria de la Quínoa y la Maca peruana y su Comercialización en el Mercado Español*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
78. Mirjana Radosevich, B. and Delfel, N. E. (1984). High-Performance Liquid Chromatography of Oleanane-type Triterpenes. Elsevier Science Publishers. *Journal of Chromatography*, 292 (1984) 403-409.
79. Monje C. Yarko A, Raffailac Jean Pierre. Determinación de saponina total en quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) Memoria IV Congreso Nacional de la Asociación Boliviana de Protección Vegetal. 5 al 7 de abril de 2006. C.E.A.C. – Dpto. Fitotecnia-FCAPV-UTO. ABPV. Oruro, Bolivia.
80. Montgomery D.C. *Design and Analysis of Experiments*. Wiley, NY. (2004), 6th Ed. Chapter 12 Supplemental Text Material. S12-1. The Taguchi Approach to Robust Parameter Design.
81. Montoya Restrepo, L.; Martínez Vlanchá, L. y Peralta Ballesteros, J. (2005) Análisis de las variables estratégicas para la conformación de una cadena productiva de la quinua en Colombia. *Revista Innovar*. Edit. Unibbios: (25), p. 103-120.
82. Mufari, J. R. (2010). Tesis de grado: Determinación y cuantificación de proteínas solubles y de aminoácidos totales en harina de quinoa. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.
83. Mufari, J. R.; Cervilla, N.S.; Calandri, E. L.; Guzmán, C. A. (2012). Extracción de la fracción soluble de proteínas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) y su caracterización basada en perfiles electroforéticos. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 14 – 16 de noviembre. Córdoba.
84. Mujica, A. (1996). *Genetic Resources of Quinoa (Chenopodium quinoa Willd)*. FAO. Roma. Italia.

85. Mujica, A.; Jacobsen, S.; Izquierdo, J.; Marathee, J. P. (2001). Quinoa: ancestral cultivo andino, alimento del presente y del futuro. FAO. Chile.
86. Nüchter M; Ondruschka B; Bonrath W; Gumb A. (2004) "Microwave assisted synthesis – a critical technology overview". Green Chem., 6, 128 –141.
87. Ocón, J. y Tojo, C. (1970). Problemas de Ingeniería Química y Operaciones Básicas. Editorial Aguilar 1ª. Edición. Tomo II, p. 208-212.
88. Olmedo, A. C. y Sicilia, I. S. (2011). Aderezo a base de quinoa con prevalencia de ácidos grasos monoinsaturados y muy bajo en sodio. Tesis de grado de la Licenciatura en Nutrición. Escuela de Nutrición. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.
89. ONUDI (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL DESARROLLO INDUSTRIAL). (2006). El futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los Andes. p. 1-16.
90. Orsini, F., Pellizoni, F. and Verotta, L. (1991). Saponins from *Albizzia lucida*. Phytochemistry, **30**, 4111-4115.
91. Peng, L., Shao-Ping, L. (2013). Pressurized Liquid Extraction in Phytochemical Analysis. Reviews in Pharmaceutical & Biomedical Analysis. Bentham Science Publishers. (19) 130-148.
92. Perreux L.; Loupy A. (2001) "A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium and mechanistic considerations". Tetrahedron., 57 9199-9223.
93. Praveen K., Chris C., Duduku K., Awang B. (2006). High hydrostatic pressure extraction of antioxidants from morinda citrifolia fruit–process parameters optimization. Journal of Engineering Science and Technology Vol. 1, No. 1 41-49.
94. Prego, I., Maldonado S., Otegui, M. (1988). Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. Annals of Botany 82:481-488.
95. Problemática de la producción y comercialización de *Chenopodium quinoa* W. (Chenopodiaceae), debida a la presencia de las saponinas. Consultada en <http://cabierta.uchile.cl/revista/21/articulos/pdf/paper6.pdf> el 14 de enero de 2013 a las 3:15 horas.
96. Repo-Carrasco, R. (2011). Andean indigenous food crops: nutritional value and bioactive compounds. Department of biochemistry and food chemistry. University of Turku. Turku. 4-19.

97. Repo-Carrasco, R. (1992). Andean Crops and Infant Nourishment. University of Helsinki. Institute of Development Studies. Finlandia. Report B25.
98. Repo-Carrasco, R., Espinoza, C. & Jacobsen, S. (2003). Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). Food Reviews International. Volume 19, Issue 1 & 2. p 179-189
99. Rojas, W., M. Pinto y JL. Soto. 2010. Distribución geográfica y variabilidad genética de los granos andinos. In: W. Rojas, M. Pinto, JL. Soto, M. Jagger y S. Padulosi (eds). Granos Andinos: Avances, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia. Bioersity International, Roma, Italia. pp 11- 23.
100. Ruales, J. and Nair, B. M. (1994). Effect of processing on in vitro digestibility of protein and starch in quinoa seeds. Int. J. Food Sci. Technol. 29, 449–456.
101. San Martín, R. y Briones, R. (1999). Industrial uses and sustainable supply of Quillaja saponaria (Rosaceae) saponins. Economic Botany, 53, 302-311.
102. Scarpati de Briceño, Z. (1979). Aislamiento y caracterización de almidón de quinoa (*Chenopodium quinoa*) y canihua (*Chenopodium pallidicaule*). Universidad Nacional Agraria. Lima. Perú. Congreso Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos. P. 30.
103. Scarpati de Briceño, Z., Briceño, O. (1980). Evaluación de la composición química (composición nutricional) de algunas entradas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) del banco de germoplasma de la Universidad Nacional Técnica del Altiplano (Perú). Anales Científicos 18: 125-134.
104. Schneíder, G.M., (1978). Physical-chemical principles of extraction with above-critical gases. Angew. Chem, 90, 762.
105. Seeman, P., Cheng, D., and Iles, G. (1973). Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. J. Cell Biol. 56, 519–527.
106. Son, S.-X., Li, Y.-M., Fang, W.-R., Cheng, P., Lio, L., Li, F. (2010). Effect and mechanism of AR-6 in experimental rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Med. 10, 113-121.

107. Sparg, S., Light, M., and van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94(2–3), 219–243.
108. Still, W. C., Kahan, M. and Mitra, A. (1978). Rapid chromatographic techniques for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.*, 43, 2923-2925.
109. Stuardo, M. & San Martín, R. (2008). Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*, 27, 296-302.
110. Szakiel, A., Paczkowsky, C., Henry, M. (2011). Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochem Rev.* 10:471–491.
111. Tapia, M. E. *Revista ambiental.* (2011). Historia, distribución geográfica, actual producción y usos: la quinua. Consultada en: <http://www.revistaambienta.es/WebAmbienta/marm/Dinamicas/secciones/articulos/quinua.htm> el día 15 de enero de 2013 a las 11:22 horas
112. Tapia, M. E. y Fries, A. M. (2007). Guía de campo de los cultivos andinos. FAO, Roma y AMPE, Lima. p. 74-88.
113. Taylor, J.R.N. & Parker, M.L. (2002). Chap. 3. Quinoa, p. 93-122. In *Pseudo Cereals and Less Common Cereals. Grain Properties and Utilization Potential* (edited by P. Belton & L. Taylor). New York: Springer Verlag.
114. Todo sobre la Quinoa consultada en: <http://laquinua.blogspot.com.ar/2008/07/plantas-de-quinua-desperdician-1200.html> el día 22 de enero de 2013 a las 1:15 horas.
115. Torres, H., Minaya, I. (1980). Escarificadora de quinua. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Publicaciones misceláneas. Nº 243. Lima. Perú.
116. Valderrama, A. (2008). *Revista Lasallista de Investigación.* Vol. 5. Nº 2: 13-19.
117. Varriano-Marston, E., DeFrancisco, A. (1984). Ultrastructure of quinoa fruit (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Microstruct.* 3, 165-173.
118. Vidueiros, S.; Fernandez, I; Bertero, D.; Roux, M. E.; Pallaro, A. (2012). XVI Congreso Latinoamericano de Nutrición. 12 al 18 de noviembre. La Habana. Cuba. Administración de dieta a base de quinua (*Chenopodium*

- quinoa* Willd): Efecto sobre la mucosa intestinal de ratas en crecimiento. Resumen 283.
119. Vidueiros, S.; Fernandez, I; Bertero, D.; Roux, M. E.; Pallaro, A. (2012). Effect of a quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) based diet on the intestinal mucosa of growing Wistar rats. 6TH International Immunonutrition Workshop. Palma de Mallorca 17 al 17 de octubre.
120. Wahli, C., (1990). Quinoa: hacia su cultivo comercial. Latinreco, Quito, 206 pp.
121. Wang, L. y Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology 17, 300–312.
122. Welty, J., Ch Wicks, C. R. Wilson, R. E. Fundamentos de transferencia de momento, calor y masa. (1991). 4ta edición, México Editorial. Limusa. P. 198, 540.
123. Wikipedia. Consultada en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Chenopodioideae> el día 7 de enero de 2013 a las 21:55 horas.
124. Willdenow C., L. (1797). Species Plantarum, 1 (2), 1301.
125. Wilson, H. (1981). Genetic variation among tetraploid *Chenopodium* populations of southern South America (Sect. *Chenopodium* subsect *Cellulata*). Syst. Bot. 6, 380-390.
126. Wilson, H. (1988). Quinoa biosystematics. I: Domesticated populations. Econ. Bot. 42, 461–477.
127. Woldemichael, G. M. y Wink, M. (2001). Identification and Biological Activities of Triterpenoid Saponins from *Chenopodium quinoa*. J. Agric. Food Chem., 49, 2327-2332.
128. Wright, B.W., Wright, C.W, Gale, R.W., Smith, R.D. (1987) Analytical Supercritical fluid extraction of adsorbent materials. Anal Chem., 59, 38.
129. Yi Chen, Ming-Yong Xie, Xiao-Feng Gong. (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. Journal of Food Engineering. 81162-170.
130. Youn, Y: S., Ming, Y. K. & Yuan, S, C. (1993). Microwave assisted extraction of ginsenosides from ginseng root. Microchemical Journal, 74, 131-139.

-
131. Zavaleta, R., Vera, C., Telleria, M., Zalazar, H. (1982). Estudio de tecnología de desamargado de quinua y análisis de saponinas. Proyecto tecnológico en el área de alimentos. Ministerio de Planeamiento y Coordinación y Junta del Acuerdo de Cartagena. La Paz-Bolivia. 185 p.
132. Zesarino, E. (2011). La quinoa como alimento etnoamericano. Antropología. Consultado en:
<http://zesarino2676.blogspot.com.ar/2011/07/la-quinoa-como-alimento-etno-americano.html> . el día 1 de abril de 2013 a las 09:30 horas.
133. Zhu, N., Sheng, S., Sang, S., Jhoo, S., Bai, S., Karwe, M., Rosen, R., and Ho, C. (2002). Triterpene saponins from debittered quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. J. Agric. Food. Chem. 50, 865–867.