



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y
MECÁNICA**

CARRERA DE INGENIERÍA PETROQUÍMICA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO PETROQUÍMICO**

**TEMA: ESTUDIO PARA LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE
SAPONINAS A PARTIR DEL MOJUELO DE QUINUA COMO UNA
POSIBLE ALTERNATIVA A LA DISPONIBILIDAD DE TENSOACTIVOS
DE ORIGEN NATURAL.**

AUTOR: VILLACIS SEGOVIA, CARLOS EDUARDO

DIRECTOR: Dr. Rer. Nat., Ph.D: RODRÍQUEZ MAECKER, ROMAN

LATACUNGA

2018



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA

CARRERA DE INGENIERÍA PETROQUÍMICA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“ESTUDIO PARA LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE SAPONINAS A PARTIR DEL MOJUELO DE QUINOA COMO UNA POSIBLE ALTERNATIVA A LA DISPONIBILIDAD DE TENSOACTIVOS DE ORIGEN NATURAL”** realizado por **CARLOS EDUARDO VILLACIS SEGOVIA**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a **CARLOS EDUARDO VILLACIS SEGOVIA** para que lo sustente públicamente.

Latacunga, 21 de noviembre del 2018

Dr. Rer. Nat., Ph.D Roman Rodríguez.



DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA

CARRERA DE INGENIERÍA PETROQUÍMICA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo **CARLOS EDUARDO VILLACIS SEGOVIA**, con cedula de identidad No. 0503225278 declaro que el presente proyecto de investigación, **“ESTUDIO PARA LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE SAPONINAS A PARTIR DEL MOJUELO DE QUINOA COMO UNA POSIBLE ALTERNATIVA A LA DISPONIBILIDAD DE TENSOACTIVOS DE ORIGEN NATURAL”** ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas. Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Latacunga, 21 noviembre de 2018



Villacis Segovia, Carlos Eduardo
C.C.: 0503225278



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA

CARRERA DE INGENIERÍA PETROQUÍMICA

AUTORIZACIÓN

Yo, CARLOS EDUARDO VILLACIS SEGOVIA, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la Biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación **“ESTUDIO PARA LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE SAPONINAS A PARTIR DEL MOJUELO DE QUINOA COMO UNA POSIBLE ALTERNATIVA A LA DISPONIBILIDAD DE TENSOACTIVOS DE ORIGEN NATURAL”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Latacunga, 21 noviembre de 2018

Villacis Segovia, Carlos Eduardo
C.C.: 0503225278



DEDICATORIA:

A:

Dios, por brindarme la vida y darme fuerzas para seguir siempre adelante.

Mis padres, por demostrarme que nada es imposible, y ser el pilar fundamental en el desarrollo de mi vida.

Mis abuelitos, por brindarme siempre su bendición y apoyo incondicional siempre.

AGRADECIMIENTOS

A:

Dr. Roman Rodríguez, por brindarme sus consejos, paciencia y conocimientos que me permitieron desarrollar mi investigación.

David Luna, por su apoyo incondicional y amistad en el desarrollo de mi proyecto.

Ing. Caterine Donoso, por su amistad y consejos a lo largo de mi trayectoria estudiantil.

Mis amigos, por estar siempre en las malas situaciones, brindarme su sabiduría y consejos a lo largo de mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA

CERTIFICACIÓN.....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA:.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	4
1.3. Justificación e importancia.....	5
1.4. Objetivos.....	7
1.4.1. Objetivo general.....	7
1.4.2. Objetivos específicos.....	7
1.5. Hipótesis.....	7
1.6. Variables de investigación.....	7

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. <i>La quinua</i>	8
2.1.1. Origen.....	8
2.1.2. Características.....	8
2.1.3. Semilla de quinua.....	9
2.1.4. Propiedades Nutricionales.....	10

2.1.5.	Distribución geográfica.....	11
2.2.	Saponinas	12
2.2.1.	Generalidades	12
2.2.2.	Estructura de las saponinas.....	14
2.2.3.	Importancia.....	17
2.3.	Métodos de extracción.....	18
2.3.1.	Extracción por maceración.....	19
2.3.2.	Reflujo y extracciones soxhlet	20
2.3.3.	Extracción asistida por microondas.....	21
2.3.4.	Extracción por aceleración de solvente	22
2.4.	Espectrofotometría UV-VIS.....	23
2.4.1.	Espectrofotómetro	23
2.5.	Purificación	24
2.5.1.	Filtración	25
2.5.2.	Partición de solventes.....	25
2.5.3.	Cristalización.....	27

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1.	Introducción.....	28
3.2.	Materiales, equipos y reactivos.	28
3.2.1.	Equipos:.....	28
3.2.2.	Materiales de vidrio:.....	29
3.2.3.	Reactivos:	29
3.3.	Resumen experimental	30
3.4.	Metodología.....	30
3.4.1.	Extracción por maceración.....	30
3.4.2.	Extracción asistida por microondas.....	35
3.4.3.	Purificación de saponinas	38
3.4.4.	Curva de calibración.....	43
3.4.5.	Preparación del reactivo de Lieberman Burchard	44
3.4.6.	Cuantificación de muestras	45

CAPÍTULO IV**ANÁLISIS DE RESULTADOS**

4.1.	Extracción por maceración.....	47
4.2.	Determinación de condiciones más favorables para extracción asistida por microondas	53
4.3.	Comparación de MAE con maceración.....	62
4.4.	Espectro de absorción de saponina purificada.....	63
4.5.	Espectro de absorción del patrón de saponinas	65
4.6.	Curva de calibración.....	65
4.7.	Determinación de la pureza de saponinas purificadas.....	69

CAPÍTULO V**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1.	Conclusiones.	71
5.2.	Recomendaciones.....	72

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
---	-----------

ANEXOS.....	80
--------------------	-----------

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro comparativo del valor nutritivo de la quinua	11
Tabla 2. Estructuras de saponinas identificadas en <i>Chenopodium quinua wild</i>	13
Tabla 3. Diseño experimental de Taguchi L9 para maceración.	31
Tabla 4. Diseño experimental de Taguchi L9 para microondas	35
Tabla 5. Matriz de diseño experimental	48
Tabla 6. Diseño experimental de Taguchi L9 (3^3)	49
Tabla 7. Respuesta de valores medios para maceración	50
Tabla 8. Obtención del rendimiento por predicción de Taguchi a las mejores y peores condiciones de extracción	53
Tabla 9. Matriz del diseño experimental para extracción por microondas.	55
Tabla 10. Diseño experimental de Taguchi L9 (3^4)	55
Tabla 11. Temperatura final del proceso de extracción MAE	56
Tabla 12. Matriz de medias para MAE	57
Tabla 13. Rendimientos predecidos por Taguchi	61
Tabla 14. Obtención del rendimiento del ensayo 5 por predicción de Taguchi.	61
Tabla 15. Absorbancia de saponinas a diferentes concentraciones	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sección longitudinal del grano de quinua.....	9
Figura 2. Distribución geográfica del grano de quinua.....	12
Figura 3. Estructura de la β -amiridina, esqueleto base de las saponinas identificadas en la quinua.....	15
Figura 4. Estructura general de una saponina.....	15
Figura 5. Estructura de una saponina monoglicosilada.....	16
Figura 6. Estructura de una Saponina diglicosilada.....	16
Figura 7. Estructura de una Saponina Triglicosilada.....	17
Figura 8. Representación de una extracción por soxhlet.....	21
Figura 9. Arreglo para hacer mediciones de absorción.....	24
Figura 10. Un esquema de partición típico que utiliza disolventes inmiscibles.....	26
Figura 11. Separación de quinua del mojuelo.....	31
Figura 12. Secado del mojuelo de quinua.....	32
Figura 13. Determinación del peso para la segunda réplica del segundo ensayo.....	32
Figura 14. Mezcla (masa- solvente) del ensayo dos con sus tres replicas.....	33
Figura 15. Muestras de cada extracción a temperatura ambiente.....	34
Figura 16. Filtración al vacío de muestras por maceración.....	34
Figura 17. Mezcla de solvente mojuelo para el ensayo 2.....	36
Figura 18. Muestra lista para la extracción de microondas.....	36
Figura 19. Medición de temperatura en extracto de saponinas por microondas.....	38
Figura 20. Proceso para purificar saponinas.....	39
Figura 21. Eliminación de complejos por decantación y centrifugación.....	40
Figura 22. Cambio de pH de la solución de saponinas.....	41
Figura 23. Filtración y centrifugación de la muestra para eliminar partículas de carbón activado de la filtración.....	41
Figura 24. Fase acuosa y orgánica utilizada para realizar una partición por solventes.....	42
Figura 25. Saponina al 64% de pureza.....	43
Figura 26. Reactivo de Lieberman Burchard preparado correcta e incorrectamente.....	45
Figura 27. Muestras de saponinas con el reactivo de Lieberman Burchard a diferentes concentraciones.....	46
Figura 28. Principales efectos en el rendimiento de saponinas.....	52
Figura 29. Principales efectos en el rendimiento de saponinas.....	59
Figura 30. Espectro de absorción de saponina de quinua purificada.....	64
Figura 31. Espectro de absorción del patrón de saponinas.....	65
Figura 32. Curva de calibración de saponinas a 404 nanómetros.....	66
Figura 33. Curva de calibración de saponinas a 414 nanómetros.....	68

RESUMEN

Se logró utilizar como materia prima el desecho industrial del mojuelo de quinua para obtener saponinas por medio de extracción por maceración y extracción asistida por microondas. A fin de determinar los efectos individuales de cada factor experimental y la combinación más óptima que proporcione los mejores rendimientos de extracción de saponina, se utilizó una matriz de Taguchi L9, considerando diferentes variables experimentales. Las mejores condiciones de extracción se efectuaron utilizando etanol al 40 %, 48 horas y relación de solvente: masa igual a 15 para el método de maceración, mientras que para la extracción con microondas fueron: etanol al 60 %, potencia de 630 W, 7 ciclos de extracción y relación de solvente: masa igual a 10. A las mejores condiciones se obtuvo rendimientos de extracción de saponinas de 5.1 % para la técnica de maceración y del 9.7 % para la técnica por microondas. Se encontró que el factor que presenta la mayor influencia para extraer saponinas en la técnica de maceración fue la relación solvente: masa, mientras que en la extracción con microondas fueron los ciclos de extracción. El procedimiento utilizado para purificar saponinas, consistió en la eliminación de impurezas como los azúcares, la clarificación de la muestra con carbón activado y una partición de solventes gracias al n-butanol. La purificación, permitió obtener saponina de quinua a un 64 % de pureza, evaluada espectrofotométricamente frente a un estándar de saponina de quillaja.

PALABRAS CLAVE:

- **SAPONINA DE QUINUA**
- **SAPONINA - EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN**
- **SAPONINA - EXTRACCIÓN POR MICROONDAS**
- **TAGUCHI - DISEÑO EXPERIMENTAL**

ABSTRACT

It was possible to use as industrial raw material the industrial waste of the quinoa mojuelo to obtain saponins through extraction by maceration and microwave assisted extraction. In order to determine the individual effects of each experimental factor and the most optimal combination that provides the best saponin extraction yields, a Taguchi L9 matrix was used, considering different experimental variables. The best extraction conditions were made using 40% ethanol, 48 hours and solvent ratio: mass equal to 15 for the maceration method, while for microwave extraction were: 60% ethanol, 630 W power, 7 extraction cycles and solvent ratio: mass equal to 10. At the best conditions, saponin extraction yields of 5.1% were obtained for the maceration technique and 9.7% for the microwave technique. It was found that the factor with the greatest influence to extract saponins in the maceration technique was the solvent: mass ratio, while in the extraction with microwaves were the extraction cycles. The procedure used to purify saponins, consisted in the elimination of impurities such as sugars, the clarification of the sample with activated carbon and a partition of solvents thanks to n-butanol. The purification allowed to obtain quinoa saponin at 64% purity, evaluated spectrophotometrically against a quillaja saponin standard.

KEYWORDS

- **QUINUA SAPONIN**
- **SAPONIN-EXTRACTION BY MACERATION**
- **SAPONIN-MICROWAVE EXTRACTION**
- **TAGUCHI - EXPERIMENTAL DESIGN**

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La quinua (*Chenopodium quinoa*) es una planta originaria de América del Sur y distribuida alrededor de diferentes países como Chile, Bolivia, Perú, Ecuador y la parte sur de Colombia. Su favorable adaptabilidad edafológica y climática ha permitido ampliar las zonas de cultivo en estas geografías promoviendo la diversificación de la explotación de sus propiedades nutricionales y farmacológicas (Ahumada, Ortega, Chito, & Benítez, 2016).

El principal factor antinutricional y sabor amargo presente en el grano de quinua se debe a la presencia de saponinas triterpénicas encontradas en diferentes partes de la planta como hojas, flores y fruto (Kuljanabhadgavad, Thongphasuk, Chamulitrat, & Wink, 2008; Letelier, Rodríguez-Rojas, Sánchez-Jofré, & Aracena-Parks, 2011).

Datos históricos informan que la quinua era una fuente de alimento en el periodo incaico e indicaron que los incas utilizaban agua de río para eliminar el sabor amargo contenido en los granos de quinua. Esto demostró que la eliminación de saponinas se realizó desde la antigüedad (Bojanic, 2011).

Debido a la alta demanda de quinua presentada a finales del siglo XX, se realizaron varias técnicas que permitan eliminar saponinas de forma eficiente y a escala industrial. Por tal razón se presentaron trabajos de investigación como el de Torres y Minaya (1980), que diseñaron una máquina de escarificación conformada por un sistema de paletas giratorias que golpean el grano

contra tamices estacionarios logrando el desprendimiento del espisperma del grano y así, obtener un producto final que contenía saponinas entre 0.04 % a 0.25 %.

A partir del auge de la quinua, a nivel industrial se desarrollaron otras alternativas para eliminar saponinas. Así surgen los métodos húmedos que se basan en someter el grano de quinua por un proceso de remojo, agitación, enjuague y escurrimiento en agua circulante o fija, donde la saponina se elimina por solubilización con el agua. Por ejemplo, en Bolivia en el año 1983, esta técnica, promovió al desarrollo del proyecto “Huarina”, que consistió en diseñar un tanque vertical provisto de paletas giratorias que produzcan turbulencia y así extraer saponinas en cortos periodos de tiempo sin causar daños a la semilla (Bacigalupo, A. y Tapia, 1990).

En función del avance de las investigaciones se han realizado diferentes propuestas que permiten mejorar la extracción de saponinas. Por ejemplo: un proceso de tostado y posterior extrusión del grano de quinua facilita el desprendimiento del pericarpio que contiene saponinas (Brady, Ho, Rosen, Sang, & Karwe, 2007); en el método húmedo con uso de agua ligeramente alcalina puede ayudar a mejorar los rendimientos de extracción (Nanqun Zhu, Shuqun Sheng, Shengmin Sang, Jin-Woo Jhoo, Naisheng Bai, Mukund V. Karwe, Robert T. Rosen, 2002); el método combinado entre una escarificación en seco y lavado con agua (Bacigalupo, A. y Tapia, 1990), donde un escarificado por 10 minutos con papel abrasivo y posterior lavado sistemático del grano demostró eliminar un 75 % de saponinas (Corzo Barragan, 2011).

Por otro lado, para llevar más allá la optimización del proceso y con el objetivo de buscar mejores condiciones de extracción se utilizó modelos matemáticos que describen la cinética del proceso de lixiviación de las semillas de quinua a temperaturas entre 20 °C y 60 °C, con una proporción de 1:10 semilla/agua, demostrando que la concentración de saponinas en la semilla disminuye conforme aumenta la temperatura y demostró que el modelo de Henderson-Pabis

modificado tiene la mejor calidad de ajuste que otros modelos cinéticos (Quispe-Fuentes et al., 2013).

Debido a varios estudios que indican la importancia de las saponinas en diferentes campos como farmacéutica, cosmética, agroquímica, acuicultura, se ha impulsado una búsqueda de nuevas técnicas de extracción y purificación enfocadas directamente a la extracción de saponinas con la finalidad de mejorar los rendimientos de extracción, tanto por técnicas convencionales (maceración, soxhlet, métodos subsecuentes) como tecnologías alternativas (extracción asistida por ultrasonido, microondas, aceleración de solventes), así como también la preparación de técnicas que permiten cuantificar las saponinas (cromatografía, espectrofotometría) (Cheok, Salman, & Sulaiman, 2014),

Se pueden extraer saponinas de las semillas del castaño de indias aplicando una extracción líquida presurizada (PLE) controlando diferentes factores como tiempo, presión, temperatura, y solvente, lo que reduce significativamente el tiempo de extracción, cantidad de disolventes y mejora el rendimiento de extracción. (Benthin, Danz, & Hamburger, 1999).

La extracción asistida por microondas (MAE) es una técnica utilizada para extraer saponinas de ginseng, encontrando que se necesita pequeñas cantidades de tiempo para realizar la extracción con rendimientos altos de extracción de saponina en comparación con otros métodos de extracción convencionales (Kwon, Bélanger, Paré, & Yaylayan, 2003).

En la extracción asistida por microondas, el efecto que se produce al modificar variables como temperatura, tiempo de aplicación de microondas y composición de solvente (iso-propanol-agua) ayuda a encontrar mejores rendimientos en la extracción de las saponinas (Gianna et al., 2012).

El método de extracción asistida por microondas presenta los mejores resultados ya sea por el tiempo en el proceso de extracción y el rendimiento (Mastrogiovanni, 2012). La purificación de saponinas por cromatografía utilizando columnas Strata® C-18 en un sistema de vacío permite aislar las saponinas de los demás componentes. En una investigación comparativa de tres técnicas de extracción de saponinas: presión de agua de baja polaridad (PLPW), extracción acelerada de solventes (ASE) y extracción ultrasónica (USE), se demostró que la técnica de extracción por aceleración de solventes, utilizando etanol al 80 %, en un tiempo de extracción de 22 minutos a una temperatura de 150 °C presenta los mejores rendimientos (Güçlü-Üstündağ & Mazza, 2007, 2008).

Las técnicas convencionales como escarificación, extracción por maceración, soxhlet, entre otras, ayudan a disminuir el contenido de saponinas pero presentan falencias principalmente en el tiempo empleado para la extracción, lo que no ocurre con las técnicas verdes que han surgido como una alternativa en la extracción de saponinas ya que optimizan el tiempo para extraer saponinas y mejoran el rendimiento de extracción, considerándose como una opción eficaz en la obtención de saponinas.

1.2. Planteamiento del problema

Ecuador, Perú y Bolivia son los principales productores de quinua en el mundo y presentan una gran cantidad de industrias que utilizan métodos de escarificación y lavado para obtener semillas con bajos niveles de saponinas. El proceso de escarificación genera una gran cantidad de desecho denominado mojuelo, este residuo presenta una gran cantidad de saponinas que pueden ser utilizadas en diversos campos como: limpieza, farmacológico y cosmético.

El problema surge ya que en el Ecuador no se aprovecha el mojuelo de quinua como materia prima en la obtención de saponinas, temática que puede ser una fuente importante de ingresos para el país. Además, existen métodos convencionales poco efectivos y altamente contaminantes para los recursos de agua que forman parte del método de desaponificación del grano de quinua dentro de las industrias, generando daños al ambiente y pérdidas económicas por su falta de control.

A nivel nacional la mayoría de detergentes y productos de limpieza disponibles en el mercado se componen principalmente de agentes limpiadores sintéticos, mayoritariamente derivados del petróleo mezclados con otra serie de aditivos para mejorar su acción. Su uso indiscriminado se ha convertido en una de las causas más importantes de la contaminación de agua, ya que tras su utilización son desechados al ambiente.

La principal motivación para la presente investigación es dar un aporte a la fabricación de productos tensoactivos de origen natural que sustituyan a derivados del petróleo, contribuyendo así de una forma al cuidado y conservación del ambiente. La falta de información en los procesos de extracción y purificación de saponinas en los residuos de quinua genera dificultades para el desarrollo de nuevos estudios o tecnologías que permitan crear nuevos procesos y disminuyan la contaminación ambiental.

1.3. Justificación e importancia

El presente estudio se enfoca en la extracción y purificación de saponinas a partir del mojuelo de quinua obtenido del proceso de escarificación. Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería, el Ecuador proyectó producir alrededor de 11.200 toneladas métricas de quinua para

el año 2017, demostrando que cuenta con un gran potencial agroindustrial que suministre de materia prima para obtener saponinas.

Es necesario mencionar que las saponinas son de mucha importancia ya que presentan una alta demanda en las industrias farmacéutica, cosméticas, medicina y agricultura. Además, pueden ser utilizadas como materia prima para la fabricación de nuevos productos químicos con alto valor agregado: detergentes, pesticidas, fungicidas, dentífrico, y cosméticos. La gran aplicabilidad que presentan las saponinas podría generar nuevas fuentes de ingreso económico y empleo en el país ya que a partir de un desecho industrial se puede obtener un producto de alto valor agregado (J. TROISI et al., 2014).

Metodológicamente, el proyecto presenta información útil en técnicas de extracción, purificación y cuantificación de saponinas, las mismas que pueden impulsar el desarrollo de nuevos estudios y tecnologías en el campo de la química verde.

Debido a la implementación de leyes de gestión y control ambiental y a la disminución de las reservas petroleras mundiales, es necesario desarrollar materias primas biodegradables y seguras tanto, para el medio ambiente como para las personas. Esta investigación propone obtener saponinas y crudos ricos en saponinas del mojuelo de quinua como una alternativa verde capaz de reemplazar a los surfactantes sintéticos, ya que debido a la versatilidad química de las saponinas es posible utilizarlas en diferentes tipos de industrias, cumpliendo funciones como reducción de tensión superficial, actividad emulsionante, solubilizante, antibacteriana, detergente.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Extraer y purificar saponinas del mojuelo de quinua.

1.4.2. Objetivos específicos

- Extraer y purificar las saponinas del mojuelo de quinua utilizando extracción asistida por microondas y maceración.
- Establecer las condiciones que presentan la mayor influencia en el rendimiento de extracción de saponinas.
- Cuantificar el contenido de saponinas utilizando espectrometría UV-VIS.

1.5. Hipótesis

Es posible extraer y purificar saponinas del mojuelo de quinua

1.6. Variables de investigación

- Variables Independientes: Temperatura, tiempo, concentración del solvente, relación volumen de solvente /masa de muestra.
- Variables Dependientes: Rendimiento de extracción, pureza de saponinas.

CAPÍTULO II

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. La quinua

2.1.1. Origen

La quinua es originaria de las regiones andinas de América del sur y se ha utilizado desde el año 5000 A.C. Se cultiva como un alimenticio en Bolivia, Ecuador, Colombia, Perú, el norte de Argentina y Chile en las ubicaciones que coinciden principalmente con los límites del antiguo Imperio Inca (Kuljanabhagavad, 2009).

2.1.2. Características

La quinua (*Chenopodium quinua*), es una planta anual de 1-2 m altura con una llamativa inflorescencia. Las semillas son planas (aproximadamente 2.5 mm de largo y 1.0 mm de diámetro) de colores como amarillo, rojo, marrón y negro, mientras que las capas de las semillas tienen un color marrón (Ahumada et al., 2016).

La quinua es un cultivo que se adapta a condiciones muy variables, pudiéndose cultivar hasta los 3900 metros sobre el nivel del mar. Por otra parte y debido a que posee raíces pivotantes y fasciculadas, se adapta bien al clima frío y a la escasez de humedad, puesto que las raíces

pivotantes aprovechan el agua a mayor profundidad y las raíces fasciculadas el agua superficial (Zarate Sullca, 2016).

Las hojas presentan formas variables, de colores verdes, rojas o moradas en compactos racimos piramidales; las flores son pequeñas y carecen de pétalos; pueden ser hermafroditas o pistiladas. Su fruto está recubierto por un perigonio acrescente con un pericarpio blancuzco, blanco-ocráceo o rojo ladrillo (Gianna, Montes, Calandri, & Guzmán, 2012).

La quinua es evolutivamente muy distante de los cereales que contienen fracciones de gluten nocivas para los celíacos. En la proteína de la harina de quinua se encuentran cantidades muy bajas de prolamina (0,8 %), mientras que las albúminas (31 %) y las globulinas (37 %) son predominantes (Berti et al., 2004).

2.1.3. Semilla de quinua

La semilla de quinua puede ser observada en la figura 1, es de forma lenticular, elipsoidal, cónica o esferoidal, presenta tres partes bien definidas que son: episperma, embrión y perisperma (Gianna, 2013).

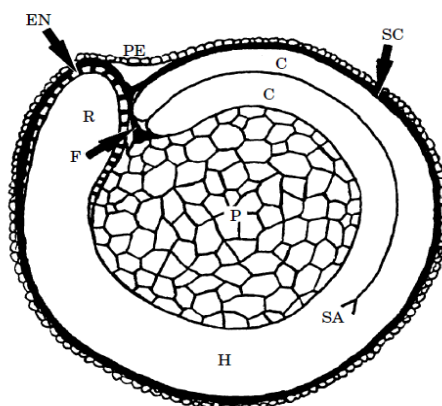


Figura 1. Sección longitudinal del grano de quinua.
Fuente: (Prego, Maldonado, & Otegui, 1998).

En la figura 1 se observan diferentes partes de la quinoa como: PE: Pericarpio, SC: Cubierta de la semilla, EN: Endosperma, C: Cotiledones, H: Hopocotilo, SA: Ápice del meristemo, R: Radícula, P: Perisperma, F: Funículo, Segmento = 500 μm . Fuente:(Prego et al., 1998).

El episperma está constituido por cuatro capas: una externa que presenta una superficie rugosa, quebradiza, la cual se desprende fácilmente al frotarla y en donde se encuentra la saponina que le da el sabor amargo al grano y cuya adherencia a la semilla es variable con los genotipos. La segunda capa es muy delgada y lisa y se observa sólo cuando la capa externa es translúcida; la tercera capa es de coloración amarillenta, delgada y opaca, y finalmente la cuarta capa es translúcida y está formada por un solo estrato de células (Gianna, 2013).

El embrión está formado por dos cotiledones y la radícula, como se ve en la Figura 1. 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 (Prego et al., 1998) .

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 (Gianna, 2013).

2.1.4. Propiedades Nutricionales

La quinua es un alimento muy completo ya que contiene una serie de proteínas y aminoácidos, entre otros nutrientes, que lo han constituido como alimento ideal para el consumo

humano en la tabla 1 se presenta un cuadro comparativo del valor nutritivo de la quinua frente a otros alimentos. La quinua presenta 10 aminoácidos esenciales para el ser humano, lo que la hace un alimento completo y de fácil digestión en el organismo. Entre los aminoácidos están la lisina que es importante para el desarrollo del cerebro y la arginina e histidina, elementales para el desarrollo humano durante la infancia (Bergesse et al., 2015).

Tabla 1.

Cuadro comparativo del valor nutritivo de la quinua.

Nombre común	Calorías (g)	Agua (g)	Proteína (g)	Grasas (g)	Calcio (mg)	Fosforo (mg)	Hierro (mg)
Quinua	351	11	14	6.1	112	286	7.5
Chocho	276	46.3	36	17.5	54	262	2.3
Trigo	330	12.5	12.3	1.8	46	354	3.4
Maíz	361	10.6	9.4	4.3	9	290	2.5

Fuente: (Peralta, 1985)

2.1.5. Distribución geográfica

En el Ecuador, la producción de quinua se da en la región sierra debido a sus condiciones agroecológicas esto se puede apreciar de mejor manera en la figura 2. La provincia del Carchi se caracteriza por ser la que produce mayor cantidad de quinua en el país, seguida de la provincia de Imbabura y de Chimborazo (Gavidia, 2015). Para agosto del año 2014, el 92 % de la producción de quinua del país se distribuía en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, y Chimborazo, y el 8 % restante entre otras provincias (Gavidia, 2015).

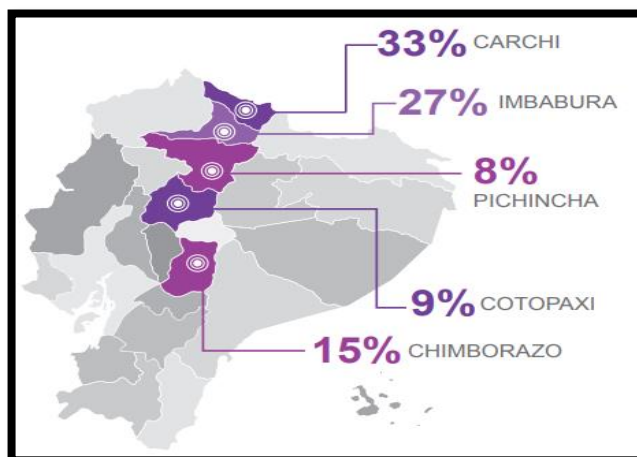


Figura 2. Distribución geográfica del grano de quinua. Fuente: (Gavidia, 2015)

2.2. Saponinas

2.2.1. Generalidades

El término saponina se deriva de la palabra griega “sapo”, que significa “jabón”, lo que refleja su disposición para formar espumas estables parecidas al jabón en soluciones acuosas. En la tabla 2 se presentan los diferentes tipos de saponinas encontrados en la quinua. El rol biológico de las saponinas no es comprendido completamente, pero generalmente son consideradas como parte del sistema de defensa de las plantas contra patógenos y herbívoros, especialmente debido a su sabor amargo (J. TROISI et al., 2014). Las saponinas son un tipo de metabolito secundario ampliamente estudiado por sus reconocidas propiedades biológicas. A la fecha, se han identificado alrededor de 30 saponinas derivadas de la hederagenina, de los ácidos oleanólico, fitolacagénico y serjanico en la planta de quinua (Ahumada et al., 2016).

Tabla 2.*Estructuras de saponinas identificadas en Chenopodium quinua wild.*

Compuesto	Localización	Aglicona	Sustituyente
1	Fl, F,S,C	I	3-Glc-(1→2)-Ara, 28-Glc
2	S	I	3-GlcA
3	Fl, F,S,C	I	3-GlcA, 28-Glc
4	Fl, F,S,C	I	3-Glc-(1→2)-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc
5	Fl, F,S,C	I	3-Xyl-(1→3)-GlcA, 28-Glc
6	S	II	3-Xyl-(1→3)-GlcA, 28-Glc
7	Fl, F,S,C	II	3-Ara
8	Fl, F,S,C	II	3-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc
9	S	II	3-Glc-(1→4)-Glc-(1→4)-Glc, 28-Glc
10	Fl, F,S,C	II	3-GlcA, 28-Glc
11	S	II	3-Gal-(1→3)-Glc, 28-Glc
12	Fl, F,S,C	II	3-Glc-(1→3)-Gal, 28-Glc
13	Fl, F,S,C	III	3-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc
14	Fl, F,S,C	IV	3-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc
15	Fl, F,S,C	V	3-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc
16	S	VI	3-Glc-(1→2)-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc
17	S	VI	3-Ara-(1→3)-GlcA, 28-Glc
18	S	VII	3-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc
19	Fl, F,S,C	VII	3-Glc-(1→2)-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc
20	S	VII	3-Ara-(1→3)-GlcA, 28-Glc
21	Fl, F,S,C	VII	3-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc
22	Fl, F,S,C	VII	3-Ara, 28-Glc
23	Fl, F,S,C	VII	3-GlcA, 28-Glc
24	Fl, F,S,C	VIII	3-Glc-(1→3)-Gal, 28-Glc
25	Fl, F,S,C	VIII	3-Ara, 28-Glc
26	S	VIII	3-Ara-(1→3)-GlcA, 28-Glc
27	Fl, F,S,C	VIII	3-Glc-(1→4)-Glc-(1→4)-Glc, 28-Glc
28	Fl, F,S,C	VIII	3-Glc-(1→2)-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc
29	Fl, F,S,C	VIII	3-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc

Fuente: (Ahumada et al., 2016).

A continuación se enumeran los tipos de agliconas: I= ácido oleanólico; II=hederagenina; III= ácido 3 β ,23,30-trihidroxi olean-12-eno-28-oico; IV= gipsogenina; V= ácido 3 β -hidroxi-27-oxoolean-12-eno-28-oico; VI= ácido espergulagénico; VII= ácido serjanico; VIII= ácido fitolacagénico

En la tabla 2 se puede observar la estructura de varias saponinas y su ubicación en la planta de quinua. En la columna de localización cada letra representa una parte de la planta. Fl: Flor, F: Fruto, S: Semilla, C: Cascara. En la columna de aglicona se enumera del uno al ocho en números romanos ya que esto nos explica que hay ocho tipos diferentes de aglicona en las saponinas de la quinua. La última columna representa las diferentes estructuras de azúcares que se encuentran unidas por un enlace glucosídico a la aglicona (Ahumada et al., 2016).

Actualmente se han presentado múltiples estudios sobre la importancia que tiene la saponina por su actividad hemolítica, citotóxica, anticancerígena y anti-proliferativa. También se conoce que la saponina está siendo investigada para el tratamiento alternativo de la “leishmaniasis”, una terrible enfermedad parasitaria que afecta a más de 12 millones de personas en el mundo (Zarate Sullca, 2016).

2.2.2. Estructura de las saponinas

Estructuralmente las saponinas son compuestos derivados de la β -amirina (Figura 3). Se forman por una mezcla compleja de glucosidos triterpénicos provenientes de diferentes ácidos como el oleanólico, fitolacagénico, serjanico, deoxifitolacagénico, entre otros, con los grupos carboxilato e hidroxilo (Kuljanabhagavad, 2008).

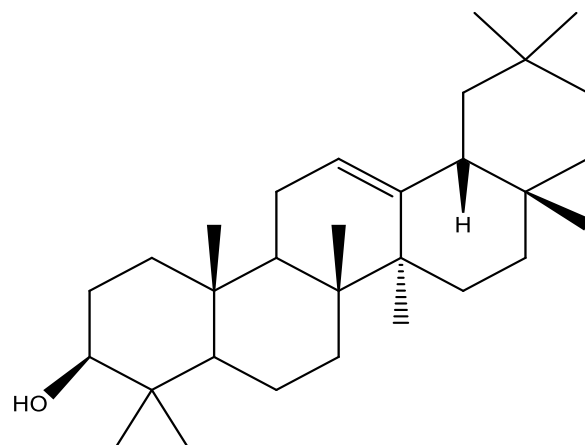


Figura 3. Estructura de la β -amiridina, esqueleto base de las saponinas identificadas en la *Chenopodium quinua Willd.* Fuente: (Ahumada et al., 2016)

Las saponinas se encuentran formadas por una aglicona y glucósidos, los mismos que son representados en la figura 4. El enlace característico de las saponinas se llama glucosídico a partir del cual se puede diferenciar la saponina y el azúcar, los mismos que le dan el carácter anfifílico a la saponina (Bojanic, 2011).

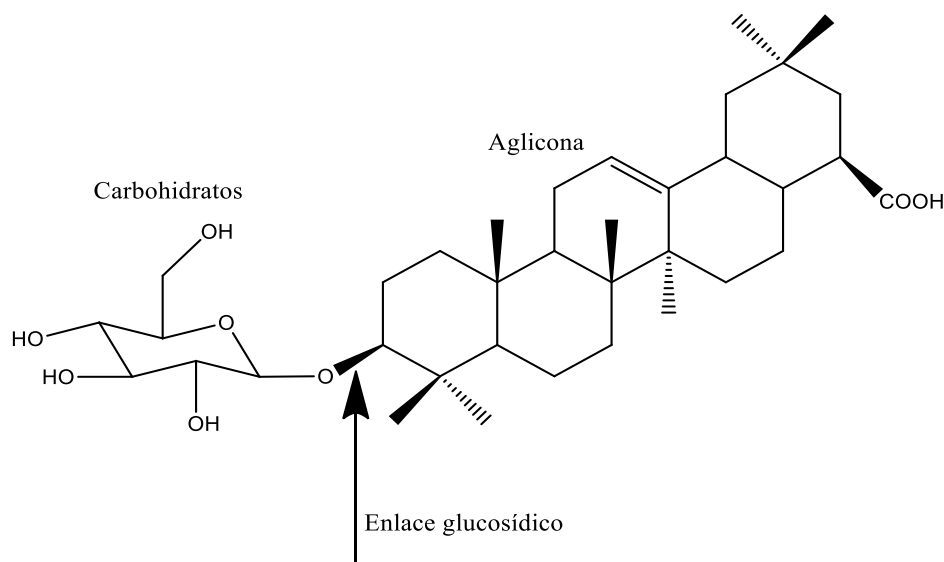


Figura 4. Estructura general de una saponina. Fuente: (Ahumada et al., 2016)

Se pueden obtener saponinas mono, di y tri-glicosidadas, en función del número de glucósidos que se encuentre enlazados a la aglicona. En las Figuras 5, 6 ,7 se puede visualizar este tipo de saponinas (Kuljanabagavad et al., 2008).

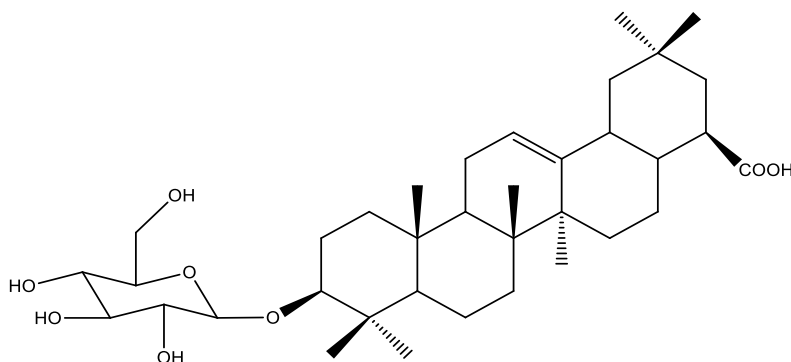


Figura 5. Estructura de una saponina monoglicosilada.

Fuente:(Ahumada et al., 2016)

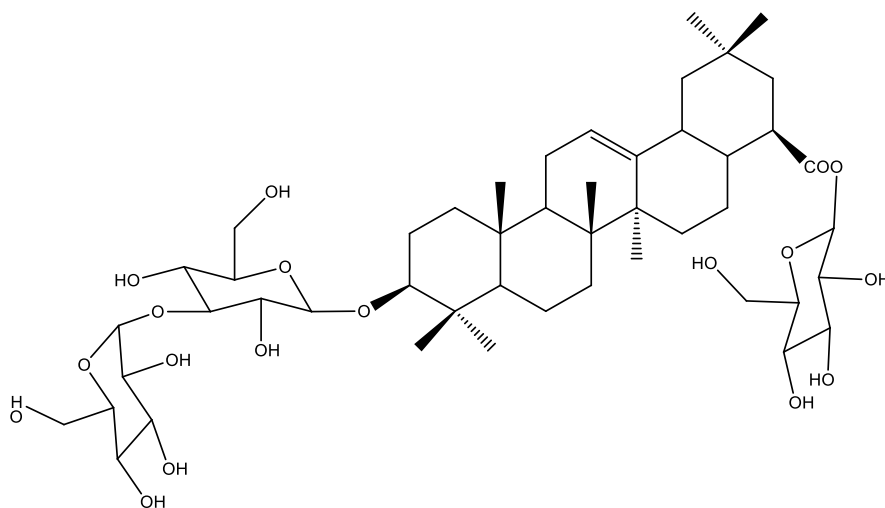


Figura 6. Estructura de una Saponina diglicosidada. Fuente:

(Ahumada et al., 2016)

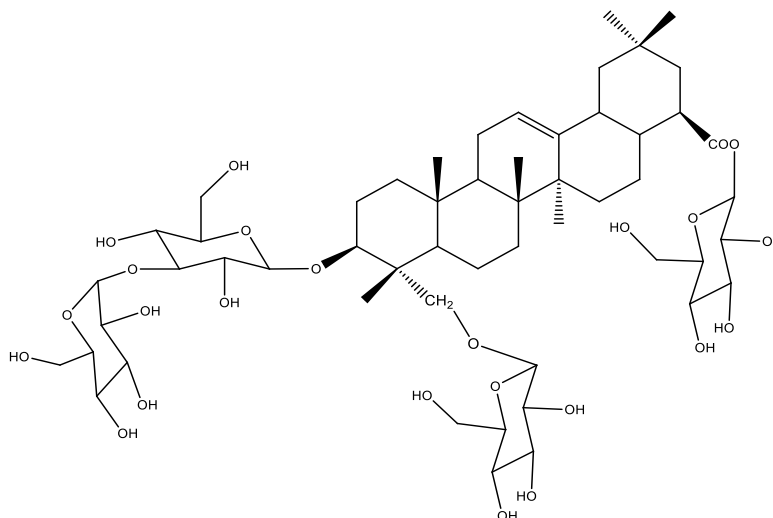


Figura 7. Estructura de una Saponina Triglicosidada.
Fuente: (Ahumada et al., 2016)

2.2.3. Importancia

Las saponinas muestran propiedad molusquicida en contra de los caracoles *Pomacea canaliculata* (conocido como GAS o caracol manzana) que afecta a los cultivos de arroz, demostrando que con un tiempo de 24 horas a 33 ppm de un producto elaborado a base de saponinas se puede eliminar el 100 % de estos caracoles (San Martín, Ndjoko, & Hostettmann, 2008).

Se identificó que las saponinas inhiben el crecimiento de *Candida albicans* y para mejorar la actividad antifúngica en la *Botrytis cinerea* hay que realizar un tratamiento alcalino a las saponinas de quinua ya que los resultados obtenidos indican que este tratamiento aumenta su actividad biológica (Stuardo, Martí, & Ricardo, 2008; Woldemichael & Wink, 2001)

El uso de saponinas ayuda a disminuir la tensión superficial, es decir son sustancias tensioactivas y además poseen propiedades emulsificantes. Algunas presentan un efecto hemolizante en los glóbulos rojos, esta propiedad la presentan las saponinas monodesmosídicas, La hemólisis se puede producir debido a interacciones de las saponinas con las membranas que

producen poros y que llevan a la rotura de la misma (P.SEEMAN, D. CHENG, 1973; Woldemichael & Wink, 2001).

En la actualidad, se ha determinado que las saponinas tienen beneficiosas propiedades para la salud, entre las cuales se pueden mencionar diversos efectos biológicos: antiviral, analgésico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante y citotóxico. Además, tiene un importante efecto sobre la absorción de minerales y vitaminas, produce un efecto inmunoestimulador, aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal, tiene acción neuroprotectora y actúa como hipolipemiente (Gianna, 2013; Güçlü-Üstündağ & Mazza, 2007).

2.3. Métodos de extracción

Los recientes avances en la extracción de compuestos bioactivos del material vegetal ha sido revisado intensamente y esto podría deberse al aumento de investigadores en la prevención de la salud que podría promoverse a través del consumo de extractos de origen vegetal (Cheok et al., 2014) .

En general, las técnicas de extracción empleadas en la extracción de saponina pueden clasificarse en dos categorías, la convencional y la verde. Las técnicas de extracción convencionales son la maceración, Soxhlet, y la extracción de reflujo, mientras que las tecnologías verdes son la extracción asistida por ultrasonido, por microondas y la aceleración de solventes (Azmir et al., 2013).

La extracción convencional se basa en aprovechar la solubilidad del soluto (material vegetal) en solvente. Por lo tanto, a menudo se utiliza una gran cantidad de solvente para extraer el soluto

deseado, aunque a veces se lo ayuda con temperatura por calentamiento y agitación o sacudidas mecánicas (Cheok et al., 2014).

Por otro parte, Azmir et al., (2013), explica que las técnicas de extracción verde involucran menos riesgos de síntesis química y permiten obtener productos químicos más seguros, ayudan a mejorar la eficiencia energética, promueven el uso de materia prima renovable y previenen la contaminación. El diseño de tecnologías de extracción verde se rige bajo estas medidas. En consecuencia, el agua se usa como disolvente de extracción y se manipulan diferentes variables como: presión del sistema de extracción y temperatura (Cheok et al., 2014).

2.3.1. Extracción por maceración

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que al ser remojados con este pueden ser extraídos. La eficacia del proceso de maceración está determinada por dos factores principales, solubilidad y difusión efectiva. La solubilidad se rige por la regla básica que lo común disuelve lo común e indica que los compuestos polares se disuelven en disolventes polares y compuestos no polares se disuelven en disolventes no polares. La velocidad de disolución de un soluto en el solvente de extracción está determinada por la tasa de transferencia de masa de un soluto del material vegetal al solvente y debido al gradiente de concentración en el sólido de la interface líquida la transferencia del soluto dentro de la planta se produce mostrando que se produce una difusión efectiva (Basu & Rastogi, 1967).

No se necesitan utensilios y equipos complicados para la configuración de un sistema de extracción de maceración, lo que lo ha convertido en una opción popular para investigadores. El

único factor primordial que se debe prestar atención en la mejora de extracción es el conocimiento de la similitud del compuesto bioactivo de interés y polaridad del solvente (Basu & Rastogi, 1967).

2.3.2. Reflujo y extracciones soxhlet

La extracción por estas dos técnicas es similar, con la única diferencia que la extracción asistida por soxhlet utiliza un dedal para alojar el material vegetal. El principio es el mismo: ambos métodos utilizan un proceso de destilación donde se calienta una solución hasta la ebullición y luego se devuelven los vapores condensados al matraz original (Bart, 2011).

El problema de estos métodos de extracción son los largos tiempos de extracción, ya que se requiere al menos una hora para una extracción. También es importante mencionar que el disolvente más utilizado en estas extracciones es el etanol debido a su facilidad de obtención y costo. En varios estudios se han encontrado un rango de duración para la extracción de reflujo de 1 a 4 horas, mientras que para Soxhlet de 24 a 72 horas (Basu & Rastogi, 1967).

En la figura 8 se presenta un equipo de extracción soxhlet con sus respectivas partes. El sistema funciona por el calentamiento del solvente en la parte inferior una vez que alcanza su punto de ebullición los vapores alcanzan el cartucho poroso, el mismo que contiene el material vegetal. En esta parte se realiza la extracción del componente de interés. El refrigerante es utilizado para condensar el solvente y mantener una fase líquida dentro del cartucho (Casillas, 2009).

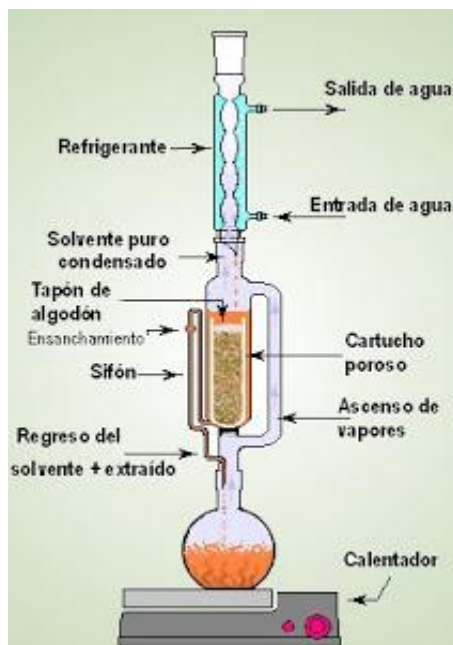


Figura 8. Representación de una extracción por soxhlet.
Fuente:(Casillas, 2009)

2.3.3. Extracción asistida por microondas

Se conoce que el uso del 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, Salgó, & Valkó, 1986). Las microondas son radiaciones electromagnéticas no ionizantes, no causan cambios en la estructura molecular pero producen movimientos, como la rotación de dipolos de moléculas, que generan colisiones moleculares permitiendo así que algunas sustancias se calienten (Gianna et al., 2012). 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. Cuanto mayor es la constante dieléctrica, mayor es la energía térmica desprendida y, por ende, más rápido es el calentamiento (Gianna et al., 2012).

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 (rotación dipolar y conductancia iónica), la calefacción con microondas es muy rápida y se produce en el seno de la muestra, dando lugar a extracciones muy rápidas (Gianna, 2013). 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 (Gianna, 2013).

2.3.4. Extracción por aceleración de solvente

Se introdujo la técnica de extracción acelerada por solvente (ASE) por Dionex Corporation en 1995. Es una técnica rápida de extracción completamente automatizada de compuestos orgánicos sólidos y semisólidos (Nahar, 2012). La extracción asistida por solventes utiliza temperatura aumentada para mejorar la solubilidad y la transferencia de masa de soluto a solvente, donde la presión elevada mantiene el solvente por debajo del punto de ebullición, ayudando a tener una mejor difusividad del solvente en el soluto y así permitiendo una extracción rápida, segura y eficiente de analitos. Un proceso de extracción generalmente se completa en 15-25 minutos usando solo 15-45 ml de consumo de solvente. Por lo tanto, se ha aplicado ampliamente en los campos de investigación medioambiental, alimentaria, de polímeros y farmacéutica (Cheok et al., 2014). El uso de la extracción acelerada con solvente es considerado como una técnica ecológica en la preparación de muestras de procedencia vegetal. Existen

diferentes formas de aplicación: extracción líquida presurizada, extracción con solvente a presión y extracción con solvente mejorada, a veces denominadas extracción a presión de agua caliente, extracción de agua subcrítica o extracción de agua sobrecalentada, cuando se usa agua como disolvente (Mustafa & Turner, 2011).

2.4. Espectrofotometría UV-VIS

En los métodos espectrofotométricos, la radiación electromagnética es absorbida por una muestra en solución, y la cantidad absorbida de radiación se relaciona con la concentración del analito en la solución (Chistian, 2009).

2.4.1. Espectrofotómetro

Es un equipo utilizado para medir la absorción de la luz. La luz de una fuente continua pasa a través de un monocromador que selecciona una banda estrecha de longitudes de onda del haz incidente. La luz monocromática atraviesa una muestra de espesor b y se mide la potencia radiante de la luz que logra atravesar la muestra (Eddy, Paz José, & Francisco, 2014). Las partes generales del espectrofotómetro son representadas en la figura 9

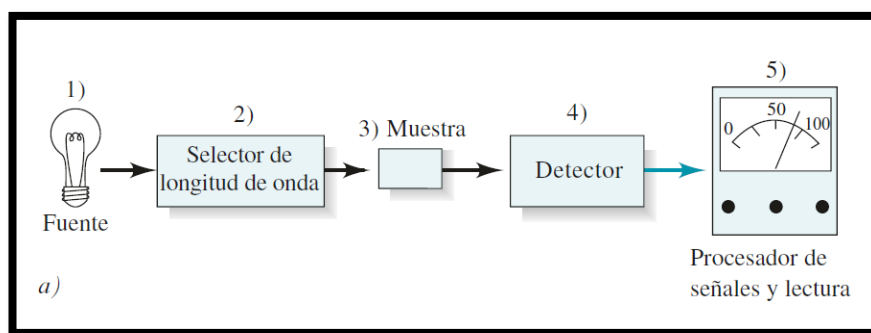


Figura 9. Arreglo para hacer mediciones de absorción.

Fuente:(Skoog, Wes, Holler, & Crouc, 2015)

Fuente de radiación: tiene intensidad constante en el rango de longitud de onda que cubre (usualmente es lámpara de tungsteno para luz visible, y deuterio para ultravioleta).

Selector de longitud de onda: Establece la longitud de onda a la cual se desea medir la muestra.

Porta muestras: es donde se coloca la muestra que se desea medir la absorbancia..

Fotodetector: mide cuantitativamente la radiación que pasa por la muestra.

Sistema de procesamiento: procesa la lectura de la señal, que se visualice en una escala de medida

2.5. Purificación

La purificación se refiere a la separación de una sustancia de interés de otras (impurezas) que se encuentran dentro de la mezcla, a partir de diferentes técnicas y procesos.

2.5.1. Filtración

Se denomina filtración al proceso unitario de separación de sólidos en una suspensión a través de un medio mecánico poroso, también llamados tamiz, criba, cedazo o filtro. Generalmente al medio mecánico poroso usado para la separación mecánica se le llama filtro, tamiz, cedazo, criba, o popularmente e incorrectamente: malla o telas (Warren L. McCabe, Julian C. Smith, Peter Harriot, 2013).

La variedad de dispositivos de filtración o filtros es tan extensa como las variedades de materiales porosos disponibles como medios filtrantes y las condiciones particulares de cada aplicación desde sencillos dispositivos, como los filtros domésticos de café o los embudos de filtración para separaciones de laboratorio, hasta grandes sistemas complejos de elevada automatización como los empleados en las industrias petroquímicas y de refino (Warren L et al., 2013).

2.5.2. Partición de solventes

La técnica de separación que utiliza el reparto de disolventes implica principalmente el uso de dos disolventes inmiscibles en un embudo de separación, donde los compuestos se distribuyen en dos disolventes de acuerdo con sus diferentes coeficientes de partición. Este método es relativamente fácil de realizar y altamente efectivo como el primer paso de la separación a gran escala de compuestos de extractos de productos naturales brutos (Sarker, Latif, & Gray, 2006).

Los productos naturales de plantas son usualmente extraído con solventes de polaridad creciente, por ejemplo; n-hexano, dietiléter, cloroformo (CHCl_3), por nombrar algunos, seguido

de más polar: metanol (MeOH), dependiendo de la sustancia química y naturaleza física de los compuestos de interés. En la figura 10 se muestra una separación general de compuestos naturales por partición de solventes (Sarker et al., 2006).

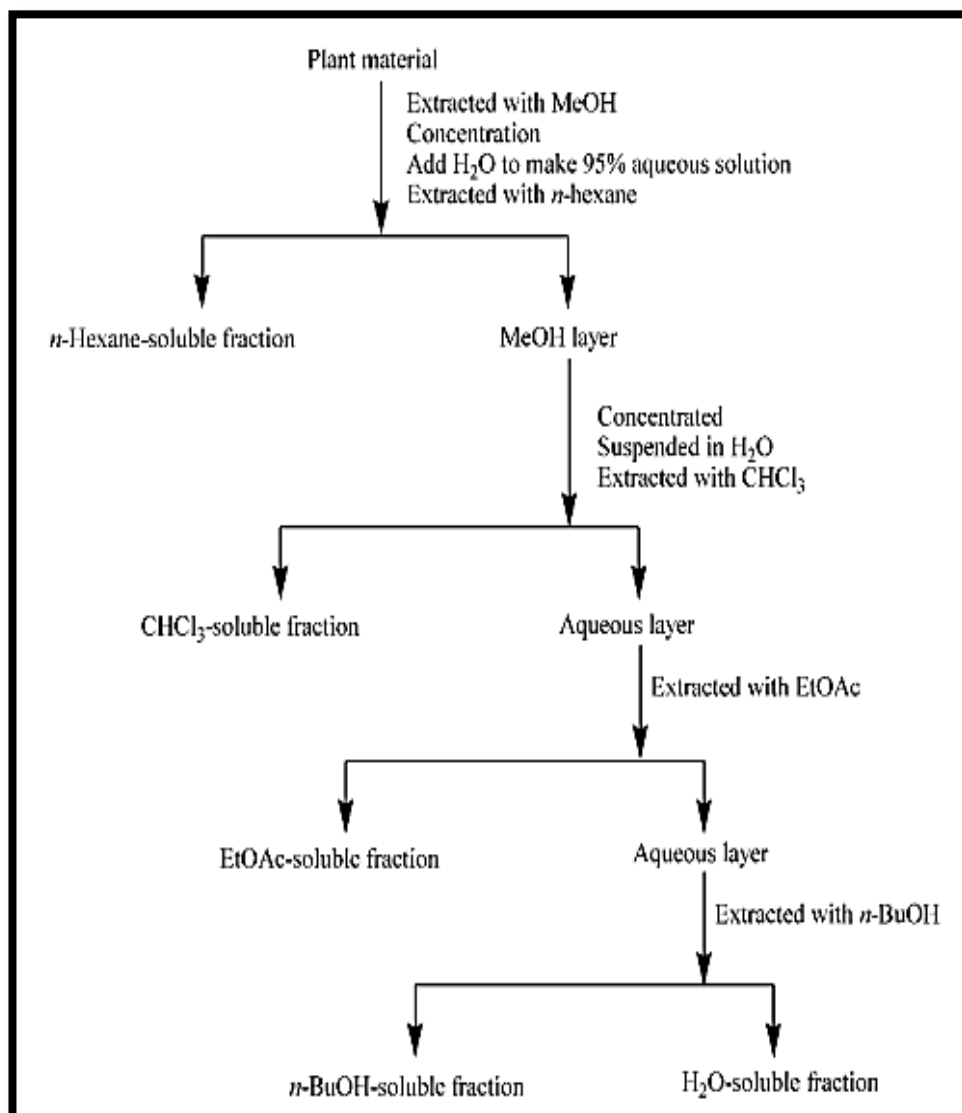


Figura 10. Un esquema de partición típico que utiliza disolventes inmiscibles.

Fuente: (Sarker et al., 2006)

Cuando las saponinas son el objetivo principal, es aconsejable que la fracción de glucósido (capa de n-BuOH) se particione con una solución al 1% de KOH para eliminar compuestos fenólicos ampliamente distribuidos, como los flavonoides y los glucósidos relacionados. Antes de concentrar el extracto, la capa de n-BuOH debe ser lavada varias veces con agua (Sarker et al., 2006).

2.5.3. Cristalización

Cristalización es la formación de partículas sólidas a partir de una base homogénea. La formación de partículas sólidas puede tener lugar a partir de un vapor, como la nieve, mediante la solidificación de un líquido fundido, como ocurre en la formación de grandes monocristales, o bien como cristalización de una solución líquida (Warren L. McCabe, Julian C. Smith, Peter Harriot, 2013).

Un compuesto orgánico cristalino está constituido por un empaquetamiento tridimensional de moléculas unidas principalmente por fuerzas de Van der Waals, que originan atracciones intermoleculares débiles. La cristalización es un proceso de purificación bastante selectivo, ya que en el crecimiento del cristal, el empaquetamiento regular de moléculas de un mismo tipo, forma y tamaño, tiende a excluir la presencia de impurezas (Huerta, 2012).

La cristalización es el método más adecuado para purificar compuestos sólidos, siempre que contenga una cantidad moderada de impurezas. Se basa en el hecho de que los sólidos orgánicos son más solubles en un disolvente caliente que en frío (Huerta, 2012).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. Introducción

Para realizar esta investigación se utilizarán los equipos, materiales y reactivos disponibles en el Laboratorio de Petroquímica de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Campus Académico Gral. Guillermo Rodríguez Lara.

3.2. Materiales, equipos y reactivos.

3.2.1. Equipos:

- Balanza analítica digital
- Rotavapor
- Agitador magnético
- Espectrofotómetro UV- VIS
- Horno de microondas
- Ph-metro de mesa
- Estufa de convección
- Vortex

- Centrífuga

3.2.2. Materiales de vidrio:

- Balones de aforo de 10,50,100 mililitros
- Tubos de ensayo
- Termómetro de mercurio.
- Vasos de precipitación de 25,50,100,150 y 250 mililitros
- Probetas de 50, 100 y 250 mililitros
- Frascos de tapa azul de 250, 500 y 1000 mililitros
- Decantador de 250, 500 y 1000 mililitros

3.2.3. Reactivos:

- 1-Butanol
- Cloruro de Calcio
- Fosfato dibasico de sodio
- Ácido clorhídrico 37%
- Anhídrido acético al 98,5%
- Ácido sulfúrico concentrado 95-97 %
- Etanol al 96% de pureza
- Estándar de saponina Y0001564

3.3. Resumen experimental

El presente trabajo consta de tres etapas que son: extracción, purificación, y cuantificación. Inicialmente se presenta un proceso para extraer las saponinas mediante la técnica convencional de maceración, posteriormente se utiliza una extracción asistida por microondas que corresponde a una técnica de extracción verde, después se realiza una técnica de purificación de saponinas y finalmente, se realiza una cuantificación para obtener los resultados de cada etapa.

En la etapa de extracción se utilizaron diferentes factores y niveles, en un diseño experimental de Taguchi L9 que nos proporciona una serie de combinaciones que permitan encontrar las condiciones más favorables de extracción y además, cual es la influencia de cada factor al momento de extraer saponinas. Para cuantificar el contenido de saponinas en cada extracción se realizó una medida en el rango visible, utilizando el reactivo de Lieberman Burchard como reactivo colorimétrico.

3.4. Metodología

3.4.1. Extracción por maceración

Para la extracción por maceración se realizaron las combinaciones indicadas en la tabla 3. La misma que fue elaborado para un diseño experimental de Taguchi

Tabla 3.

Diseño experimental de Taguchi L9 para maceración.

Ensayos	Etanol/Agua (%)	Tiempo (Horas)	Relación solvente(ml)/ masa(g)
1	40	24	10
2	40	48	15
3	40	72	20
4	50	24	15
5	50	48	20
6	50	72	10
7	60	24	20
8	60	48	10
9	60	72	15

Para iniciar con el proceso de extracción se debe seguir los pasos descritos a continuación: Tamizar el polvo del escarificado de quinua con un tamiz número 20 para retener semillas de quinua que se encuentran mezcladas con el mojuelo. Este proceso puede ser observado en la Figura 11. Es importante realizar esta etapa porque elimina un error experimental que puede obtenerse, ya que si se pesa la materia prima de manera directa se obtendrá una medida que no corresponderá al peso total de mojuelo.



Figura 11. Separación de quinua del mojuelo

Una vez separada la materia prima se llevó a una estufa por 4 horas a una temperatura de 40 °C para eliminar la humedad presente en la misma. La figura 12 nos indica el secado del componente dentro de la estufa



Figura 12. Secado del mojuelo de quinua

Una vez seco el mojuelo se procedió a pesar 5 gramos del mismo en envases plásticos de 250 ml. Es recomendable colocar con mucho cuidado la muestra en el envase, verificando que la balanza este limpia en todo momento. Esta etapa puede ser visualizada en la figura 13 donde se pesó 5 g de mojuelo de quinua para el ensayo 2.



Figura 13.
Determinación del peso para la segunda réplica del segundo ensayo.

Se preparó soluciones de etanol al 40,50 y 60 por ciento con la ayuda etanol al 96%, que fue obtenido de manera comercial y se aplicó la fórmula de dilución para preparar las diferentes concentraciones de etanol. Como se puede ver en la figura 14 se utiliza una probeta de vidrio de 100 ml para tomar el volumen de etanol especificado en la tabla 3 y se vertió en el recipiente plástico que contiene la muestra pesada con anterioridad. La muestra fue homogenizada y sellada en el envase.

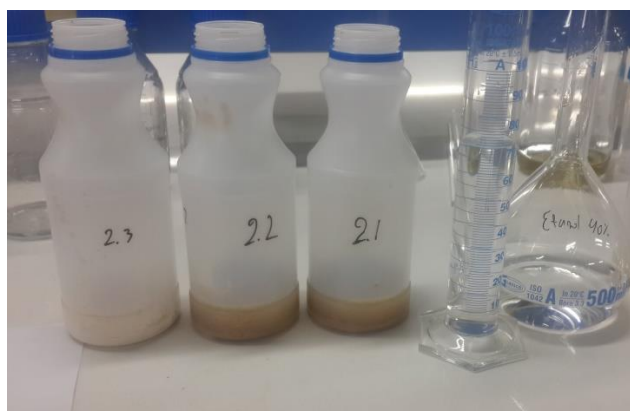


Figura 14. Mezcla (masa- solvente) del ensayo dos con sus tres replicas

En la figura 14 se puede observar las tres replicadas realizadas para el ensayo dos, donde las dos primeras repeticiones ya contienen la cantidad de solvente establecido y el ultimo envase solo contiene el polvo del escarificado. Concluido el paso anterior se colocaron todas las muestras a oscuridad durante los periodos de tiempo establecidos en la tabla 4. La figura 15 indica cómo quedan las muestras de cada ensayo al terminar de preparar todas las muestras.



Figura 15. Muestras de cada extracción a temperatura ambiente

Cuando se cumplen los tiempos de extracción se aplicó una filtración al vacío para retener la materia sólida presente en las muestras. En la figura 16 se puede observar la secuencia de pasos descritos para realizar la filtración al vacío del ensayo 2. Cuando la muestra estuvo filtrada se almacenó en frascos ámbar de 60 mililitros y se los llevó a refrigeración para mantener las muestras hasta su análisis.



Figura 16. Filtración al vacío de muestras por maceración

3.4.2. Extracción asistida por microondas

Para realizar la extracción asistida por microondas se utilizó la tabla 4 que nos indica una serie de ensayos que deben efectuarse de manera práctica y han sido obtenidos por el diseño experimental de Taguchi.

Tabla 4

Diseño experimental de Taguchi L9 para microondas

Ensayos	% Etanol	Potencia	Ciclos de radiación	Relación solvente(ml)/masa(g)
1	20	495	3	10
2	20	630	5	15
3	20	900	7	20
4	40	495	5	20
5	40	630	7	10
6	40	900	3	15
7	60	495	7	15
8	60	630	3	20
9	60	900	5	10

Para iniciar con el proceso de extracción se repitió los pasos de tamizado y secado, descritos en el proceso de maceración. Con la ayuda de una balanza se midió el peso de 5 gramos de mojuelo de quinua en un frasco de 250 ml.

Para preparar las soluciones de etanol al 20,40 y 60 por ciento se usó etanol al 96 %. Con las soluciones preparadas se tomó una probeta de vidrio para medir el volumen correspondiente a

cada extracción y se lo colocó en los frascos donde fue pesada la muestra. Este paso está representado en la figura 17



Figura 17. Mezcla de solvente mojado para el ensayo 2

A continuación, homogenizar la muestra, tapar el envase y llevarlo al horno de microondas para realizar la extracción. La muestra colocada en el horno de microondas es representada en la figura 18.



Figura 18. Muestra lista para la extracción de microondas

Para fijar los parámetros de potencia en el microondas se sigue las indicaciones a continuación: seleccionar Power, seguidamente del botón uno dos o tres que en su parte superior expresan el nivel de potencia que se desea proporcionar, después seleccionar el botón time para poner el tiempo de radiación requerido para el ensayo y finalmente cerramos el horno y procedemos con el botón Start. Todo el procedimiento se lo repite dependiendo del número de ciclos establecido para cada ensayo. Cada ciclo está comprendido por un tiempo de radiación y reposo de 15 y 45 segundos, respectivamente. Culminado el proceso de extracción en el horno de microondas y con la ayuda de un material aislante de calor se retira el frasco del horno y se lo coloca en agua fría para disminuir rápidamente su temperatura. La etapa de enfriamiento es realizada con la finalidad de obtener una fase líquida total y evitar la pérdida de vapores que pueden disminuir la cantidad de líquido presente en la muestra, causando errores al momento de cuantificar la muestra. Se realiza una filtración al vacío de la muestra y se coloca el extracto líquido filtrado en un frasco ámbar, posteriormente se lleva el frasco a refrigeración para conservar la muestra hasta su análisis.

Para poder determinar la temperatura final de extracción se realizó cada ensayo por duplicado y se procedió de la siguiente manera: el primer ensayo se lo realiza únicamente para tomar de una forma directa la temperatura sin pasar por la etapa de enfriamiento como se observa en la figura 19, mientras que el segundo ensayo sigue todo el proceso descrito en los párrafos anteriores.



Figura 19. Medición de temperatura en extracto de saponinas por microondas.

3.4.3. Purificación de saponinas

Los resultados obtenidos por la patente US 2001/0056181 A1 (2001), se utilizaron de referencia para realizar la extracción de saponinas. Esta etapa consiste en pesar 50 gramos de saponinas en un envase de vidrio de 1000 ml y agregar 500 ml de etanol al 50 %. Para mejorar la eficiencia y disminuir el tiempo de extracción se debe utilizar una plancha de calentamiento para mantener la muestra a 45 °C, con una agitación continua de 580 rpm durante 4 horas.

Una vez terminado el proceso anterior, se llevó la muestra a una filtración al vacío para eliminar las partículas sólidas presentes en el extracto líquido. Después, el líquido fue sometido a una centrifugación a 2500 rpm durante 20 minutos para cerciorar que todo el material sólido fue eliminado del concentrado.

Con el extracto de saponinas libre de compuestos sólidos se siguió el proceso descrito en la figura 20

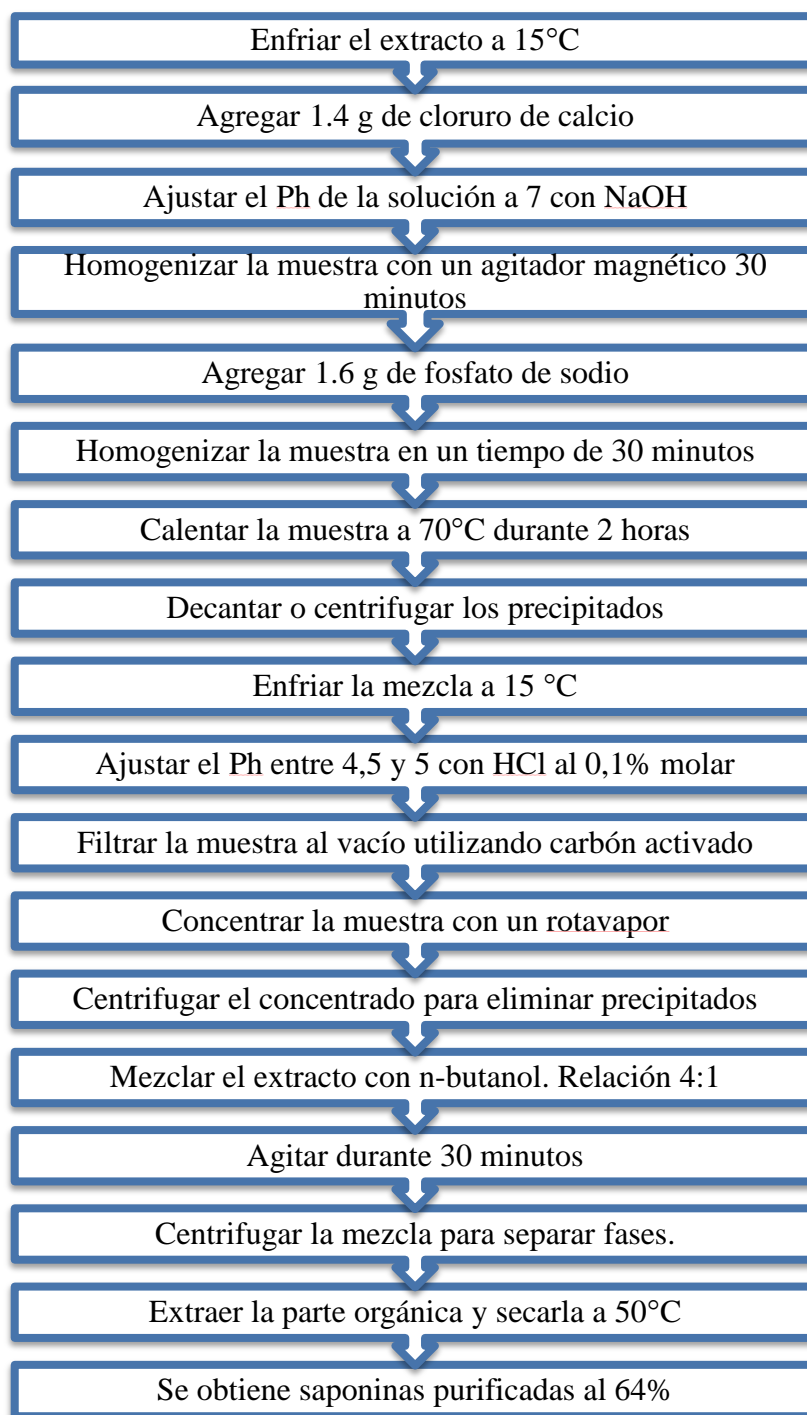


Figura 20. Proceso para purificar saponinas

El proceso descrito en la figura 20 se basa en el propuesto por la patente (WO 2017/088080 A1, 2017) para obtener saponinas a partir de plantas con modificaciones principalmente en la

etapa de filtración con membranas. El proceso inició a partir de un enfriamiento a 15 °C. Después, se agregó 1.4 g de cloruro de calcio y se utilizó hidróxido de sodio hasta ajustar el pH a 7. Se homogenizó la muestra durante un tiempo de 30 a 60 minutos, para formar complejos ión-polisacáridos. Para poder formar precipitados con los complejos de ión-polisacáridos se agregó 30 ml de una solución que contenía 1.6 g de fosfato disodico y con la ayuda de una plancha de calentamiento se sometió la muestra a una temperatura de 70 °C con agitación durante 2 horas

Terminada la etapa anterior se procede a eliminar los precipitados. Se puede realizar de dos formas, la primera es dejando la muestra en un decantador durante un día y la segunda se realiza con una centrifugación a 3000rpm durante 30 minutos. La figura 21 presenta la eliminación de precipitados por las dos formas establecidas.

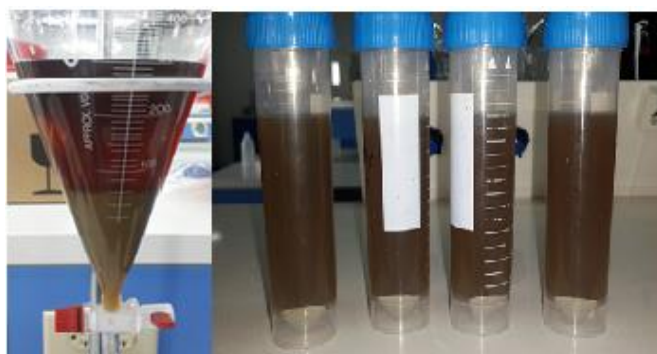


Figura 21. Eliminación de complejos por decantación y centrifugación

A continuación se enfrió el extracto a 15 °C y se utilizó una solución de ácido clorhídrico 0,1 M para disminuir el pH de la muestra entre 4 a 5 (ver figura 22). Este proceso se realizó con la finalidad de aclarar la muestra. Es recomendable agregar pequeñas alícuotas de ácido clorhídrico para ir disminuyendo el pH de una forma lenta y controlada, ya que algún error puede disminuir el nivel de pH establecido y provocar la hidrólisis de saponinas en sapogeninas.



Figura 22. Cambio de pH de la solución de saponinas.

Como se muestra en la figura 23 con la muestra aclarada se realizó una filtración al vacío utilizando carbón activado con el objetivo de clarificar la muestra y eliminar impurezas que se pueden encontrar en la misma. Se centrifugó la mezcla a 2500 rpm durante 15 minutos para eliminar partículas de carbón activado que pasaron con la muestra. Después se utilizó un rotavapor para concentrar la muestra.



Figura 23. Filtración y centrifugación de la muestra para eliminar partículas de carbón activado procedentes de la filtración.

El extracto concentrado de saponinas fue centrifugado a 2500 rpm durante 30 minutos, con la finalidad de eliminar algunos precipitados e impurezas que se formaron en el proceso de concentración y no fueron eliminados. Inmediatamente se toman 20 ml de la muestra concentrada y se mezcla con 5 ml de n-butanol en un matraz Erlenmeyer de 50 ml. Las fases orgánica y acuosa son sometidas a agitación durante 30 minutos para formar una mezcla homogénea que favorezca la difusión de saponinas en el solvente orgánico. Para obtener una separación de la fase orgánica y acuosa se vertió la muestra anterior en tubos de centrifuga y se realizó una centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos para separar las fases (ver figura 24). Esta separación se puede dar gracias a que el reactivo n-butanol no es miscible en agua y así, se puede obtener dos fases bien definidas ya sea por decantación o centrifugación.

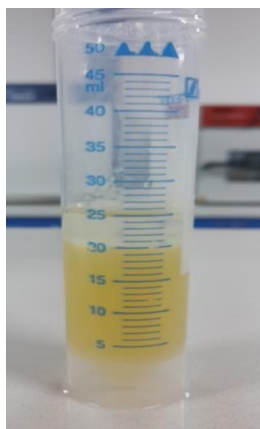


Figura 24. Fase acuosa y orgánica utilizada para realizar una partición por solventes.

Después se extrae la parte orgánica (fase superior) con la ayuda de una jeringa de 10 ml, ya que se desea absorber la parte orgánica sin la dificultad de tomar parte de la fase acuosa. La fase orgánica extraída es vertida en un vidrio reloj y se procede a un secado a 50°C en una estufa

hasta que la muestra se encuentre totalmente seca. Una vez culminada la etapa de secado con la ayuda de una espátula se debe proceder a extraer el sólido seco que corresponde a las saponinas purificadas. Como se puede apreciar en la figura 25 se obtiene un polvo de saponinas purificadas por este método.



Figura 25. Saponina al 64% de pureza

3.4.4. Curva de calibración

Para la realización de la curva de calibración se tomó un balón volumétrico de 10 ml y se pesó 0,0092 gramos de patrón de saponina. Después se aforo el balón de 10 ml con una solución de agua etanol al 50 % para evitar la formación de espuma. A partir de la solución madre se deben realizar las diluciones mostradas en la tabla 15.

A continuación de cada dilución se toma 1 ml de solución estándar y se agrega 3.5 ml del reactivo de Lieberman-Burchard para provocar la reacción de derivatización de saponinas. Para cada muestra se mide la absorbancia a una longitud de onda de 414 nanómetros en un tiempo de 50 minutos.

Es necesario medir la absorbancia del reactivo de Lieberman-Burchard solo, la muestra sin el reactivo colorimétrico y la muestra con el reactivo de color después del tiempo establecido, para encontrar la absorbancia real de la muestra que es determinada de la siguiente forma:

$$AR = AMRc - AM - ARc$$

Dónde:

AR= Absorbancia real

AMRc=Absorbancia de la muestra con el reactivo de color

AM= Absorbancia de la muestra

ARc=Absorbancia del reactivo de Lieberman-Burchard

Con el conjunto de datos se realiza una regresión lineal para obtener una ecuación que relaciona la concentración de saponinas con la absorbancia.

3.4.5. Preparación del reactivo de Lieberman Burchard

En la preparación del reactivo de Lieberman-Burchard se mezcló ácido sulfúrico con anhídrido acético en una relación de 1:5. Hay que tomar en cuenta que la reacción que se forma al mezclar los reactivos es exotérmica y por eso es recomendable realizar un enfriamiento previo de los reactivos a 4°C. Se debe considerar que el anhídrido acético debe ser agregado de forma lenta en el ácido sulfúrico para evitar la formación de un color amarillo (figura 26) que indica

que el reactivo está mal preparado. Tanto el factor de enfriamiento y el de mezcla son de mucha importancia para la preparación de un buen reactivo colorimétrico.

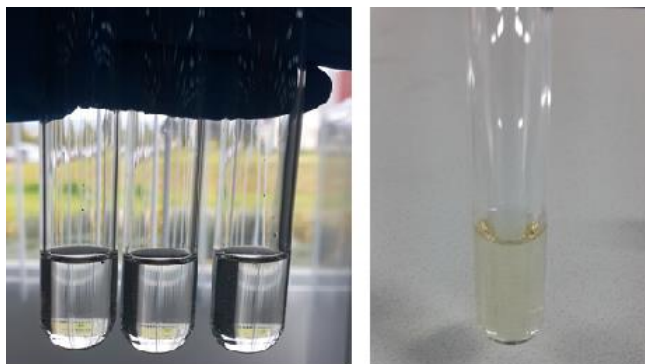


Figura 26. Reactivo de Lieberman Burchard preparado correcta e incorrectamente.

3.4.6. Cuantificación de muestras

Para cuantificar las muestras por maceración, tomar 1 ml de muestra y diluirlo en 10 ml con la ayuda de un balón volumétrico. Percatarse que la solución este bien homogenizada.

A continuación pipetiar 1 ml de solución diluida y mezclarlo con 3,5 ml del reactivo de Lieberman Burchard en un tubo de ensayo. Con ayuda de un vortex mezclar bien los reactivos y esperar el tiempo establecido para realizar la lectura de absorbancia.

Debido a que las muestras por microondas presentan un alta absorbancia se debe tomar 3 mililitros de muestra y diluirla en un balón de 50 ml. Tomar 1 mL de solución diluida y mezclarla con 3.5 mL del reactivo de color. Agitar la muestra en un vortex durante 30 segundos para homogenizar la muestra y esperar 50 minutos para medir la absorbancia.

Una vez que se mezcla la muestra con el reactivo de color se puede observar de forma instantánea un cambio de color. Así se puede conocer que la reacción entre la muestra y el

reactivo de color ha empezado. La intensidad en el color de la muestra dependerá del contenido de saponinas en cada muestra (ver figura 27).

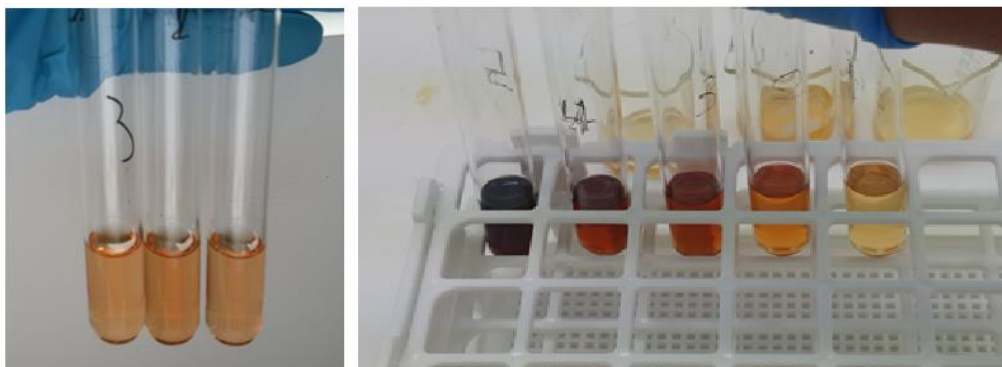


Figura 27. Muestras de saponinas con el reactivo de Lieberman Burchard a diferentes concentraciones.

CAPÍTULO IV

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Extracción por maceración

Con el fin de encontrar las condiciones más favorables de extracción, se analizaron tres variables independientes o factores, cada una con tres niveles. Para lograr este objetivo, se recurrió al diseño experimental de Taguchi (Gutiérrez Pulido & De la Vara Salazar, 2008).

Para seleccionar los factores y niveles se recurrió a información de otros estudios. Por ejemplo, para la selección de las condiciones de operación en maceración se utilizó la información proporcionada por la patente PCT/CA99/00333 (1999), la cual menciona que para extraer saponinas de quinua es recomendable utilizar etanol en un rango de (40 a 75) % y la relación de solvente-masa debe ser menor de 30, pero se recomienda mantener valores entre 10 y 15. Los tiempos de extracción fueron obtenidos de los trabajos presentados por G. Tomás Ch , J.Huamán M, R. Aguirre M (2010) y Nickel, Spanier, Botelho, Gularte, & Helbig (2016).

Gracias a la información obtenida se pudo crear la matriz de diseño experimental que nos proporciona los valores correspondientes a los tres niveles que se encuentran expresados en números romanos y cada factor se representa con letras: A, B y C correspondientes a la concentración de etanol, tiempo de extracción y la relación solvente: masa, respectivamente. Los datos reportados en la matriz son representados en la tabla 5.

Tabla 5.
Matriz de diseño experimental

NIVEL	FACTOR A	FACTOR B	FACTOR C
	Etanol/Agua (%)	Tiempo (Horas)	Relación solvente(ml)/masa(g)
I	40	24	10
II	50	48	15
III	60	72	20

En función de la información presentada en la tabla 5 se crea un arreglo ortogonal L9. Tal como se muestra en la Tabla 6, si se hubiese aplicado un diseño factorial 3^3 , 27 ensayos hubieran sido necesarios; mientras que con el método Taguchi bastan nueve experimentos para establecer la mejor condición de extracción. En la tabla 6, cada una de las filas indicadas desde la 2 a la 10 contiene los niveles (valores) en que debe encontrarse cada uno de los factores (variables) para cada experimento. Las dos últimas columnas presentan en porcentaje los rendimientos obtenidos para cada experimento y la desviación estándar obtenida en función de sus tres réplicas.

Tabla 6.*Diseño experimental de Taguchi L9 (3³)*

Ensayo N°	FACTOR A	FACTOR B	FACTOR C	Rendimiento (mg saponinas/mg mojuelo) (%)	Desviación estándar relativa (%)
1	I(40)	I(24)	I(10)	4,38	0,44
2	I	II(48)	II(15)	4,93	0,68
3	I	III(72)	III(20)	3,18	2,30
4	II(50)	I	II	3,26	0,91
5	II	II	III	3,63	0,97
6	II	III	I	2,24	0,49
7	III(60)	I	III	3,35	1,42
8	III	II	I	2,50	1,60
9	III	III	II	4,79	0,85

Cada ensayo se efectuó con factores en el correspondiente nivel, indicado en números romanos (ver Tabla 5) y siguiendo el procedimiento explicado en la metodología.

En la tabla 6 se proporcionan las condiciones que deben ser utilizadas en cada ensayo. Por ejemplo, para el ensayo 1: el porcentaje de alcohol es 40%, aplicado a un tiempo de 24 horas y volumen de solvente es 10 ml/g de polvo de escarificado de quinua. El rendimiento experimentalmente medido es 4.36 %. Este valor es el promedio de tres experimentos desarrollados en las mismas condiciones.

La desviación estándar representa el error experimental obtenido al efectuar cada ensayo. Se puede ver que el ensayo 1 presenta menor error al efectuarlo, ya que presenta una desviación de

0.44%, mientras que el ensayo que presenta la mayor desviación es el 3 con un error de 2.3%. Como se puede observar no existe mucha variabilidad en las réplicas de cada ensayo y se puede considerar que los datos obtenidos presentan una mayor aproximación al valor real.

Con los resultados obtenidos en la tabla 7 se pudo crear la media de respuesta (ANOM) que es la respuesta promedio para cada combinación de niveles de parámetros de control (factores) en un método estadístico de Taguchi. El objetivo de este método es identificar qué parámetro afecta más al rendimiento y también determina la mejor combinación donde se puede obtener un máximo rendimiento de extracción. Para cada parámetro, se midió el promedio de la respuesta (rendimiento de saponinas extraídas por maceración) en cada nivel del parámetro.

El delta identifica el tamaño del efecto tomando la diferencia entre el valor más alto y el valor más bajo del promedio para un parámetro y el rango en la tabla de respuesta 7 nos ayuda a identificar qué parámetro tiene más efecto. El parámetro con el valor delta más alto recibe el rango 1, el parámetro con el segundo delta más alto recibe el rango 2, y así sucesivamente.

Tabla 7.
Respuesta de valores medios para maceración.

Nivel	Etanol/Agua (%)	Tiempo de extracción	Relación solvente/masa
1	4,162	3,663	3,039
2	3,043	3,686	4,328
3	3,547	3,404	3,386
Delta	1,119	0,281	1,289
Rango	2	3	1

La tabla 7 nos proporciona los parámetros que afectan más al rendimiento de saponina. El rango indica que el factor que presenta una mayor influencia en el mejoramiento o

empeoramiento del rendimiento al momento de extraer saponinas es la relación solvente: masa, mientras que el tiempo de extracción afecta menos al rendimiento de saponinas. Además, se puede apreciar que el tiempo de extracción no presenta una influencia considerable en el mejoramiento de la extracción y nos permite deducir que al realizar cambios dentro de sus niveles no existirá una afectación muy significativa en el rendimiento porque presenta un delta de 0.29 que es muy inferior a los obtenidos en los factores A y C. Por ende, se puede decir que el rendimiento de saponinas dependerá de la relación solvente: masa y la concentración de etanol.

Si comparamos los resultado obtenidos con los presentados por Usiña Estrada (2017), se puede notar una fuerte similitud tanto para el factor A y B. En la investigación se demuestra que el tiempo de extracción no tiene mucha influencia en la extracción de saponinas ya que, según el análisis de varianza se presenta un 19% de influencia para el tiempo de extracción el cual, es muy inferior al 81% que presenta la concentración de etanol. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestra investigación.

La mejor combinación de saponinas puede ser determinada por los números seleccionados (en negrita) en la tabla 7, pero para un entendimiento más dinámico se realizó una gráfica de los efectos de medias. La figura 28 está representada por tres gráficas correspondientes a cada factor con sus respectivos niveles. Esta grafica nos ayuda a identificar la combinación que proporcione los resultados más favorables para la extracción y evaluar el efecto de cada factor. Entre mayor sea la línea de cada factor, o bien, entre más vertical se encuentre, mayor será el efecto de este factor.

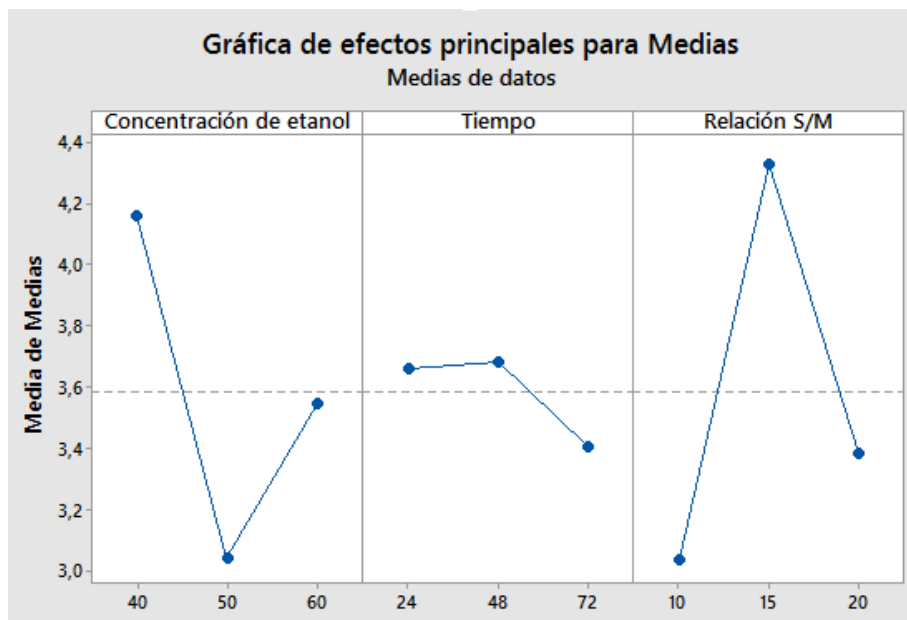


Figura 28. Principales efectos en el rendimiento de saponinas. El eje x está representado por los tres niveles correspondientes a cada factor, mientras que el eje y expresa la medida de medias obtenidas para cada nivel, según la tabla 7. Por ejemplo la media que presenta un mayor valor es en el primer nivel del factor A (concentración de etanol) y el menor valor de la media es al segundo nivel de A.

Como se puede observar en la figura 28, el comportamiento del factor B presenta una mayor tendencia a acercarse al eje horizontal. Según Gutiérrez Pulido & De la Vara Salazar (2008), las líneas que súbitamente se acuestan o se aproximan al eje horizontal presentan una menor influencia en el proceso. Por su parte, los factores A y C indican un mayor tamaño y verticalidad, demostrando que presentan una mayor influencia en el rendimiento.

Analizando la figura 28 se observa que el factor A en su primer nivel presenta la mejor media, seguido por el factor B que en su nivel 2 muestra un valor más alto. Mientras, que el Factor C indica que su segundo nivel es el más favorable para la extracción. Estos resultados son considerados como los mejores para optimizar el proceso de maceración. A continuación se presenta la tabla 8 con los valores que optimizan la técnica de maceración y el rendimiento obtenido por la predicción de Taguchi.

Tabla 8.

Obtención del rendimiento por predicción de Taguchi a las mejores y peores condiciones de extracción

Resultados	Favorables	Desfavorables
Factor A Concentración de etanol	40%	50%
Factor B Tiempo de extracción	48 h	72 h
Factor C Relación solvente/masa	15	10
Rendimiento por predicción de Taguchi	5.01	2.32
Rendimiento experimental	4.93	2.24

Las combinaciones presentadas en la tabla 8 son los mismos que los usados en los ensayos 2 y 6 de la tabla 6. Así que para corroborar la precisión en la predicción de Taguchi se compara los rendimientos experimentales y predcidos. Como se puede notar, los valores de los rendimientos predcidos por Taguchi son muy cercanos a los reales. Por tal motivo, se demuestra que el diseño tiene una buena aproximación al realizar predicciones.

4.2. Determinación de condiciones más favorables para extracción asistida por microondas

La optimización de las condiciones de MAE ha sido reportada en muchos informes (Wang et al., 2010; Xing, He, Zhu, & Wang, 2017; Zheng et al., 2009). Muchos investigadores han utilizado factores únicos, matrices factoriales y ortogonales. Además, han utilizado diseños para encontrar condiciones óptimas demostrando que los parámetros más comúnmente estudiados son

la temperatura de extracción, la duración, los ciclos de extracción, potencia de radiación, concentración de solvente y relación de solvente a material. Algunos de estos factores fueron investigados en los siguientes experimentos.

La técnica de la optimización basada en Taguchi se ha adaptado para la optimización del proceso de MAE. La técnica de optimización basada en Taguchi es una disciplina de optimización única y poderosa que permite la optimización con un mínimo número de experimentos como se pudo ver anteriormente en la técnica de maceración. Por lo tanto, mediante este método, es posible reducir el tiempo y el costo de las investigaciones experimentales y mejorar las características de rendimiento.

En el presente estudio, se definen cuatro variables independientes o factores con tres niveles cada uno, que se resumen en la Tabla 9 y que presenta la matriz del diseño experimental. Se utilizó una matriz ortogonal L9 que necesita 9 experimentos para completar el proceso de optimización. Los resultados de extracción realizados bajo condiciones del diseño ortogonal se muestran en la Tabla 10. Todos los resultados del diseño se expresan como la media de tres experimentos.

Tabla 9.

Matriz del diseño experimental para extracción por microondas.

NIVEL	FACTOR A	FACTOR B	FACTOR C	FACTOR D
	Etanol/Agua (%)	Potencia	Ciclos de extracción	Relación solvente/masa (ml/g)
I	20	Baja (495 W)	3	10
II	40	Media (630 W)	5	15
III	60	Alta (900 W)	7	20

Los factores A, B, C y D son las variables independientes, cada una con tres niveles (I a III).

A: concentración de alcohol en porcentaje; B: Potencia del microondas; C: Número de ciclos de extracción y D: Relación solvente-masa

En la tabla 10 se presentan los rendimientos obtenidos en cada ensayo en porcentaje de gramos saponina extraída/ gramo mojuelo. Además, se presenta la desviación estándar relativa obtenida de las tres réplicas realizadas. Donde F (A, B, C, D)= a los factores y E= ensayo.

Tabla 10.

Diseño experimental de Taguchi L9 (3⁴)

E	F(A)	F(B)	F(C)	F(D)	Rendimiento (mg saponinas/mg mojuelo) (%)	Desviación estándar relativa (%)
1	I(20)	I(baja)	I(3)	I(10)	4,0	1,15
2	I	II(media)	II(5)	II(15)	3,21	1,04
3	I	III(alta)	III(7)	III(20)	4,98	0,89
4	II(40)	I	II	III	4,74	1,97
5	II	II	III	I	8,92	0,62
6	II	III	I	II	2,14	2,29
7	III(60)	I	III	II	6,07	1,09
8	III	II	I	III	5,65	1,73
9	III	III	II	I	5,36	0,89

Como se puede observar, la desviación estándar de los resultados tiene un porcentaje de error pequeño, lo cual indica que los resultados obtenidos tiene una significativa aproximación al valor real porque no existe mucha variabilidad en las réplicas de cada ensayo. Un aporte adicional a la investigación es la medida de la temperatura final de ensayo, siguiendo el procedimiento establecido en la metodología.

En la tabla 11 la temperatura máxima que alcanzo nuestro proceso es 76°C. En el estudio reportado por Le, Parks, Nguyen, & Roach (2018), indica que la temperatura final a una potencia de 480W y 4 ciclos de extracción es de 75.6°C, un valor muy cercano al obtenido en nuestra investigación. Además, la investigación demuestra que el aumento de temperatura será influida principalmente por el número de ciclos ya que no pudieron encontrar una correlación con la potencia.

Tabla 11.
Temperatura final del proceso de extracción MAE

Ensayo	TR1	TR2	TR3	Media	Desviación estándar
1	42	45	44	43,7	1,65
2	58	62	61	60,3	1,63
3	65	68	71	68,0	2,08
4	65	66	65	65,3	0,42
5	76	77	75	76,0	0,62
6	66	68	65	66,3	1,09
7	76	76	76	76,0	0,00
8	69	67	66	67,3	1,07
9	76	76	76	76,0	0,00

TR (1, 2,3)=temperatura de la réplica 1,2 y 3

En el estudio presentado por (He et al., 2013), para extraer saponinas de té, se explica que el rendimiento de la extracción mejora al aumentar la temperatura. Por una parte, el movimiento molecular mejora con el aumento de temperatura, ya que las moléculas del solvente pueden

sumergirse con mayor facilidad en el interior de la matriz vegetal y por otra parte, la capacidad de disolución (solubilidad) del disolvente se mejora a temperaturas más altas. Ambos factores favorecen la extracción de saponina del té. Todo esto indica que la temperatura es un factor de gran importancia si se desea mejorar el rendimiento y debería ser considerada para futuras investigaciones.

Ahora para determinar cuál factor afecta mayoritariamente en el rendimiento al momento de extraer saponinas, se presenta una matriz ANOM (tabla 12) de respuesta para las medias según el diseño de Taguchi.

Tabla 12.

Matriz de medias para MAE

Nivel	FACTOR A	FACTOR B	FACTOR C	FACTOR D
1	4,066	4,936	3,929	6,092
2	5,263	5,927	4,437	3,806
3	5,693	4,160	6,656	5,123
Delta	1,626	1,767	2,727	2,286
Clasificar	4	3	1	2

De la segunda a la cuarta fila se presenta las medias de rendimiento obtenidos para cada nivel. La quinta fila es el delta correspondiente a los tres niveles de cada nivel y la última fila expresa la influencia de cada factor, siendo 1 el factor que presenta una mayor afectación al diseño y 4 el factor que presenta una menor influencia

En función de los resultados obtenidos en la Tabla 12 podemos considerar que el factor que presenta una mayor influencia en el aumento o disminución del rendimiento de saponinas, es el factor C: ciclos de extracción. El mismo que no difiere mucho de la relación de solvente: masa que presentaría una influencia un poco menos significativa pero igual de importante.

La influencia que presentan los ciclos de extracción puede deberse a que permite una mayor rotación de las moléculas provocando un aumento de la temperatura y permitiendo que el

solvente penetre con mayor facilidad sobre el material vegetal. Por esta razón pudo presentarse como el factor más influyente dentro del diseño experimental (Guo et al., 2001).

En el factor D se puede notar que al utilizar una menor cantidad de solvente se puede mejorar el rendimiento ya que en función de las medias obtenidas la relación de 10 ml por cada gramo, se obtiene un mejor valor. En bibliografía se encontró que en las técnicas de extracción convencionales, un mayor volumen de disolvente aumentará la recuperación, pero en el MAE, un mayor volumen de disolvente puede proporcionar menores recuperaciones (Guo et al., 2001).

También se analizó el estudio de Li, Zu, Fu, Yang, & Li, 2010, donde postula que si se utiliza el solvente en exceso disminuiría la adsorción de material por microondas, debido a que el solvente absorbe más energía. Por lo tanto, la rotura del material de la pared celular y la transmisión de masa podrían ser influidas negativamente. Y por esta razón, una proporción menor de disolvente como la obtenida de 10 concuerda con lo expuesto ya que es la menor y presenta un valor de medias superior que los otros dos niveles.

Para analizar de mejor manera los resultados se creó la gráfica de efectos de medias en función de los resultados obtenidos anteriormente. Al igual que en maceración, para encontrar las mejores condiciones de extracción se seleccionó una de las alternativas que proporciona el diseño de Taguchi que dice: Más grande es mejor: Ya que se desea obtener el mayor rendimiento de saponinas

La figura 29 contiene cuatro imágenes correspondientes a cada factor con sus respectivos niveles. Gracias a esta figura se puede identificar la combinación que proporcione los mejores resultados para la extracción y los menos adecuados para la misma.

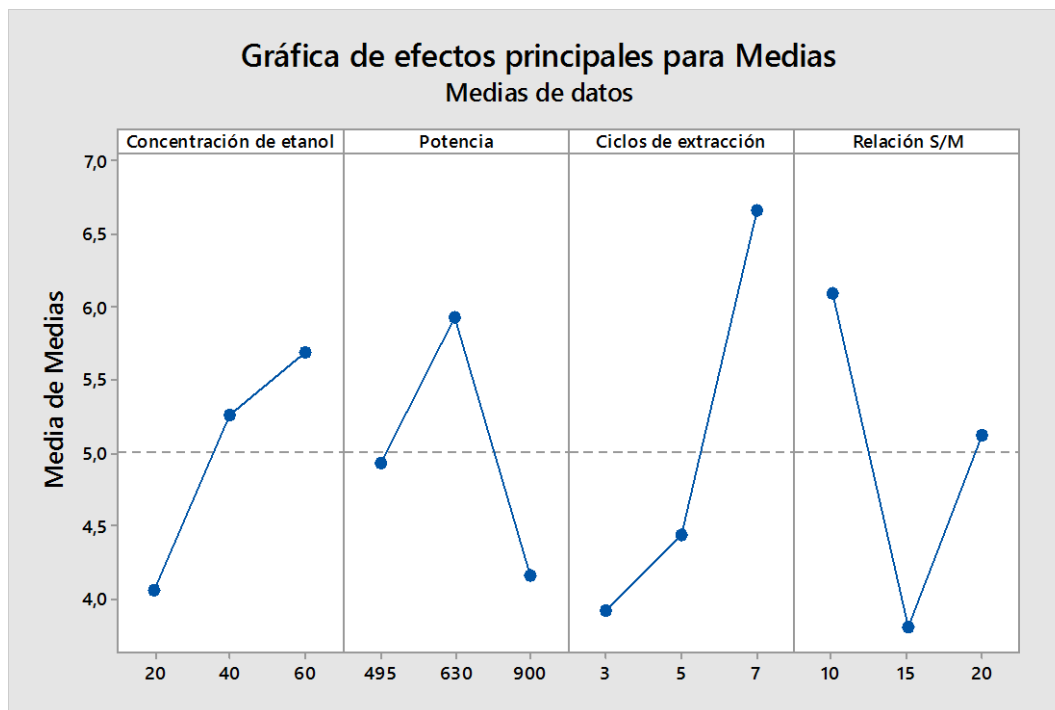


Figura 29. Principales efectos en el rendimiento de saponinas. El eje x está representado por los tres niveles correspondientes a cada factor, mientras que el eje y expresa la medida de medias obtenidas para cada nivel, según la tabla 13. Por ejemplo la media que presenta un mayor valor es en el tercer nivel del factor A y el menor valor de la media es el primer nivel de A.

Si analizamos la tendencia que presenta el factor A se puede notar claramente que el rendimiento mejora a medida que el porcentaje de etanol aumenta, obteniendo como mejor nivel una concentración de etanol al 60 %. Los resultados presentados demuestran que una mayor concentración de etanol al 60 % presenta mejores rendimientos en relación al 20 %. Esto se debe probablemente a la disminución de la polaridad del disolvente con el aumento de la concentración de etanol. Se encontró que un alto contenido de etanol disminuirá la polaridad de la mezcla en un grado favorable para la extracción (Bhadoriya, Tiwari, Mourya, & Ghule, 2011). Además He et al.(2013), presentan una gráfica de concentración de etanol en función del rendimiento de saponinas extraídas. Indicando que el rendimiento mejorará al tener la concentración de etanol en un rango de (50 a 65) %.

En la gráfica presentada para el factor B se puede observar que el valor óptimo de potencia corresponde a 630 W en relación a los valores de (950 y 270) W que disminuyen la eficiencia de extracción. Los resultados de potencia adquiridos los comparamos con los presentados en bibliografía, encontrado que la tendencia que favorece a utilizar un valor medio de potencia se asemeja a la tendencia obtenida por He et al. (2013), ya que indican que las potencias de (400-700) W presentan un aumento del rendimiento, mientras que las potencias que se encuentran en el rango de (100-400 y 700-1000) W, disminuyen el rendimiento de extracción de saponinas de té. En función de la correlación que presenta estos resultados se puede recomendar que para mejorar el rendimiento de saponinas utilizando la extracción por microondas hay que utilizar valores cercanos a los 600 W de potencia y no valores demasiado altos o bajos.

La gráfica del factor C, indica que la extracción de saponinas se verá favorecida al aumentar los ciclos de extracción. Esto puede ser corroborado por lo expuesto en la temperatura de microondas ya que, la temperatura se encuentra directamente relacionada con el número de ciclos empleados en la extracción y su aumento también favorecerá de forma positiva en la extracción.

La gráfica presentada para el factor D, demostró que a la menor cantidad de solvente la extracción se ve beneficiada, pero si observamos la tendencia de la gráfica al aumentar el solvente a una relación de 15 se produce un efecto muy negativo en la extracción, lo cual no sucede con el presentado al tener un relación de solvente masa de 20. Este cambio puede deberse a posibles efectos generados por la interacción entre factores, provocando una influencia negativa para el segundo nivel y una mejora en el tercero.

En la tabla 13 se muestra los arreglos que ayudan a disminuir o aumentar el contenido de saponinas según la figura 29. Además, se realizó una predicción de rendimientos por el diseño de Taguchi a esas condiciones.

Tabla 13.*Rendimientos predecidos por Taguchi*

Resultados	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Rendimiento por predicción de Taguchi
Favorables	60%	630 W	7	10	9,345
Desfavorables	20%	900 W	3	15	0,932

Como se puede notar el rendimiento más alto que proporciona la mejor combinación es de 9.345 %, un poco superior al valor de 8.92% del ensayo 5. Comparando las combinaciones de ambos se puede intuir que el simple hecho de cambiar la concentración de etanol de 40% al 60%, se podrá mejorar el proceso para extraer saponinas. En la tabla 14 se realiza una predicción de Taguchi del ensayo 5 con el fin de compararlo con el rendimiento experimental.

Tabla 14.*Obtención del rendimiento del ensayo 5 por predicción de Taguchi.*

Resultados	Ensayo
Factor A Concentración de etanol	40%
Factor B Potencia	630 W
Factor C Ciclos de extracción	7
Factor D Relación solvente/masa	10
Rendimiento por predicción de Taguchi	8,91 %
Rendimiento experimental	8,92%

El diseño de Taguchi presentó una buena precisión para predecir los resultados ya que el resultado obtenido tuvo una variación del 0,01% al compararlo con el rendimiento obtenido de manera experimental, demostrando tener una excelente predicción para este método.

4.3. Comparación de MAE con maceración

La selección de un método de extracción depende principalmente de las ventajas y desventajas de los procesos, como el rendimiento de extracción, la complejidad, el costo de producción, el respeto al medio ambiente y la seguridad. En general, la maceración es uno de los procedimientos de extracción más utilizados. Los inconvenientes de la maceración son las grandes cantidades de disolvente y los largos tiempos de extracción necesarios. Teniendo en cuenta el consumo excesivo de solventes y el largo período de extracción, este método de extracción no es favorable desde una perspectiva comercial. La extracción asistida por microondas (MAE) es un método relativamente nuevo, que ha recibido una atención creciente como método alternativo.

El principio de calentamiento durante el MAE se basa en el efecto directo de las microondas en las moléculas por conducción iónica y rotación de dipolo. La conducción iónica es la migración electroforética de iones cuando se aplica un campo electromagnético y la resistencia de la solución a este flujo de iones producirá fricción y, por lo tanto, calentará la solución (Mandal, Mohan, & Hemalatha, 2007).

La rotación del dipolo significa la realineación con el campo aplicado. A 2.45 GHz, que es la frecuencia utilizada en los sistemas comerciales, los dipolos se alinean, se aleatorizan y se empujan 4.9×10^9 veces / s y esto da como resultado el calentamiento (Mandal et al., 2007).

Sobre la base de este mecanismo, se requieren muestras polares o solventes de extracción polar para un calentamiento eficiente.

En el estudio actual, el MAE se comparó con la técnica de extracción convencional de maceración para la extracción de saponinas triterpénicas provenientes del mojuelo de quinua. Ambas técnicas de extracción se compararon en sus condiciones optimizadas. Las Tablas 8 y 13 muestran que, en términos de rendimiento del analito objetivo, los mejores resultados fueron obtenidos por MAE, ya que, dio un valor significativamente mayor.

En el tiempo de extracción, MAE también fue el método más rápido con solo 7 minutos de tiempo de extracción. Si el rendimiento de extracción obtenido de MAE se considerara como 100 % entonces, 48 h de maceración podrían alcanzar un 52,5 % de rendimiento (en términos de rendimiento de extracción de saponinas). Estas características, junto con una facilidad de operación e implementación, posicionarían a MAE como una tecnología valiosa y rentable adecuada para las industrias altamente competitivas de hoy en día con una creciente demanda de mayor productividad, mayor eficiencia y menor tiempo de ciclo.

En fin al comparar ambos métodos se pudo conocer que el método MAE mostró prominentes ventajas con una fuerte fuerza de penetración, alta eficiencia de extracción, menor tiempo de extracción y menos exposición a solventes orgánicos, lo que puede llevar a mejores productos a un menor costo.

4.4. Espectro de absorción de saponina purificada

Se realizó un barrido espectral entre 350 y 600 nanómetros presentado en la figura 30, para determinar la longitud de onda que produce la máxima absorbancia de la saponina de quinua.

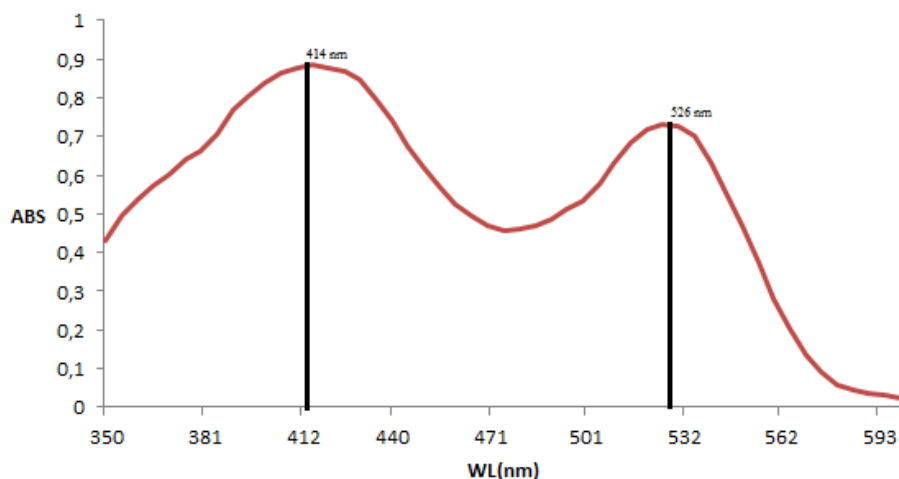


Figura 30. Espectro de absorción de saponina de quinua purificada

Como el reactivo de Lieberman Burchard ayuda a la formación de un cromóforo que absorbe en el rango visible, los picos obtenidos a ese rango son de principal interés, ya que en función de ellos se realizará la cuantificación de las muestras.

Como se puede observar en la Figura 30, los picos presentes en el rango visible son a los 414 y 526 nanómetros, longitudes de onda muy cercanas a las reportados para saponinas de quinua en la bibliografía. Por ejemplo Avalos & Ramírez (2011), cuantifican saponinas de quinua a una longitud de onda de 412 nm, un valor muy cercano al primer pico, mientras que Gianna (2013), reporta un valor de 528 nm. Debido a que el pico presente a los 414 nm presenta la mayor absorbancia, se lo toma como referencia para obtener la mayor sensibilidad.

4.5. Espectro de absorción del patrón de saponinas

Como no se pudo encontrar un patrón para saponinas de quinua se utilizó como patrón de referencia saponina de quillaja (*Quillaja saponaria*) al cual se le realizó un barrido espectral de los 350 a los 600 nanómetros, ya que como en el inciso anterior se desea conocer a que longitud de onda donde existe la mayor absorbancia.

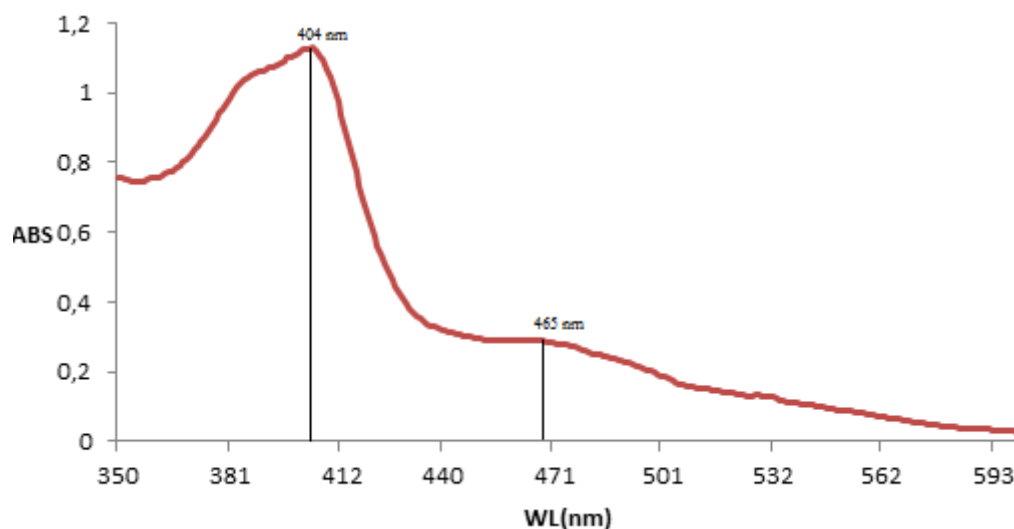


Figura 31. Espectro de absorción del patrón de saponinas.

Como se puede observar en la Figura 31, el espectro de absorción del estándar de saponina de quillaja presenta dos picos de máxima absorción a los 404 y 465 nanómetros.

4.6. Curva de calibración

Los resultados presentados en la tabla 15 corresponden a los datos obtenidos para la curva de calibración de la saponina patrón, evaluado a las longitudes de onda de 404 nm y 414 nm que

corresponde a los valores de máxima absorción de la saponina estándar de quillaja y a la saponina de quinua, respectivamente.

Tabla 15.

Absorbancia de saponinas a diferentes concentraciones

Volumen de la solución patrón (ml)	Concentración de saponinas en (mg/ml)	Absorbancia	
		404 nm	414 nm
0	0	0,028	0,016
3	0,0398	0,341	0,258
5	0,0664	0,553	0,430
10	0,1328	1,246	0,994

Con las absorbancias y concentración obtenidos se crearon las curvas de calibración a cada longitud de onda. Las curvas son presentadas en las figuras 32 y 33

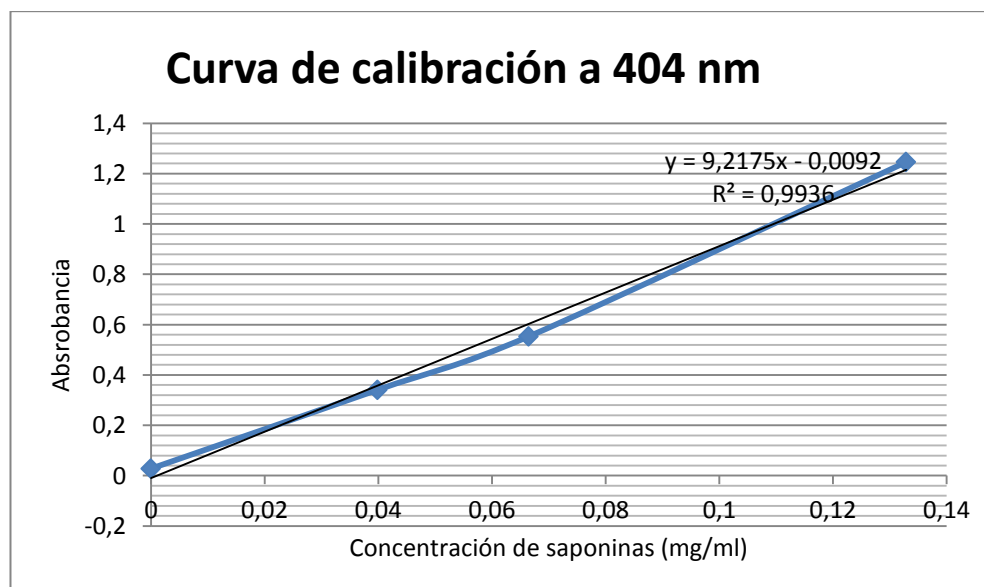


Figura 32. Curva de calibración de saponinas a 404 nanómetros

En la Figura 32 se indica la curva de calibración obtenida por un modelo lineal, el mismo que ayudó a crear la ecuación experimental para la cuantificación de saponinas:

$$Y = 9,2175X - 0,0092$$

Dónde:

X= Concentración de saponinas en miligramos/mililitros

Y= Absorbancia de la muestra a 404 nm

Se obtiene un coeficiente de correlación lineal simple (R o r) de 0,9967 que muestra una asociación lineal significativa entre la absorbancia y la concentración. Por otra parte, el coeficiente de determinación lineal (R²) fue de 0,9936 lo que enseña que la proporción de la variación lineal en la absorbancia con respecto a su media, que es explicada por el modelo de regresión lineal es menor al 0,4 %. Por tal razón se considera que el ajuste lineal ejecutado es muy bueno.

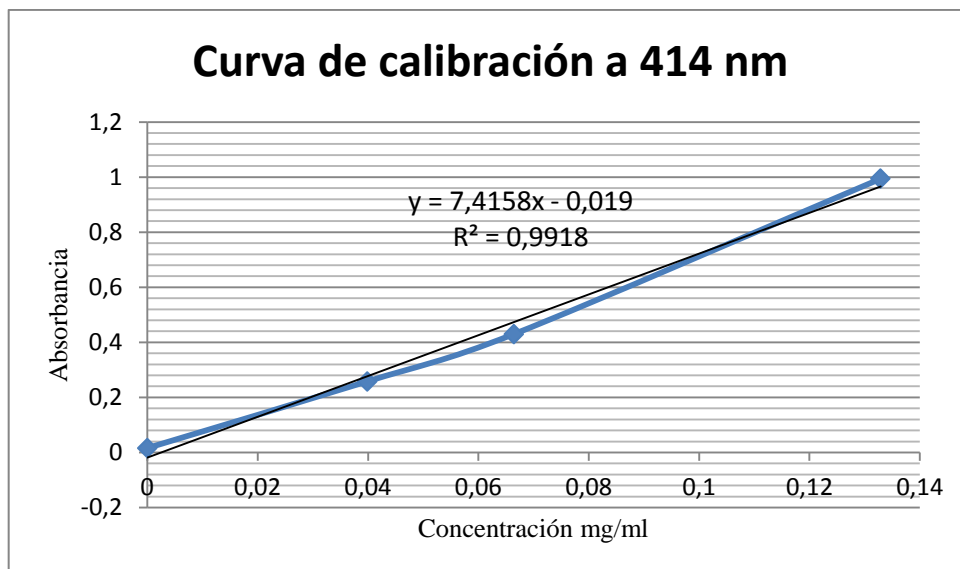


Figura 33. Curva de calibración de saponinas a 414 nanómetros

La Figura 33 muestra la curva de calibración obtenida por regresión lineal a 414 nm, la cual permitió establecer la ecuación experimental para la cuantificación de saponinas de quinua:

$$Y = 7,4158x - 0,019.$$

Dónde:

X= Concentración de saponinas en miligramos

Y= Absorbancia de la muestra a 414 nm

Se obtuvo un coeficiente de correlación lineal simple (R o r) de 0,9958 que muestra una asociación lineal significativa entre ambas variables (absorbancia “y”; concentración “x”). Por otro lado, el coeficiente de determinación lineal (R^2) fue de 0,9918 lo que indica que el ajuste lineal realizado fue muy bueno (99,18% de la variabilidad de “y” es explicada por la regresión).

Al comparar los coeficientes de determinación lineal (R^2), se puede notar que el valor del coeficiente obtenido a 404 nm es un poco mayor que el presentado a los 414 nm. Sin embargo, es posible realizar una cuantificación a los 414 nm ya que, estadísticamente presenta valores aceptables para realizar una valoración de saponinas de quinua en función del estándar de quillaja.

4.7. Determinación de la pureza de saponinas purificadas

A continuación se presenta los cálculos realizados para obtener la pureza de la saponina purificada por el método propuesto.

Absorbancia de muestra (414 nm): 0,482

$$\text{Concentracuión (mg/ml)} = \frac{\text{Abs muestra} + 0,019}{7,4158}$$

$$\text{Concentracuión (mg/ml)} = \frac{0,482 + 0,019}{7,4158}$$

$$\text{Concentracuión (mg/ml)} = 0,0675 \text{ (mg/ml)}$$

Se pesó 0,0095g de saponina purificada y fue diluida en un balón de 10 ml. A continuación 5 ml de solución madre fue diluida en un balón de 10 ml. Para la reacción de Lieberman Burchard

se tomó 1 ml de solución y se diluyó a 4,5 ml con el reactivo de color. En función de esta serie de diluciones se procedió a calcular el peso real de saponinas.

$$0,0675 \left(\frac{mg}{ml} \right) * \frac{4,5 ml}{1 ml} * \frac{10 ml}{5 ml} * 10 ml = 0,675 mg \text{ de saponinas}$$

$$Pureza(\%) = \frac{6,075 mg}{9,5 mg} * 100\%$$

$$Pureza(\%) = 63,95\%$$

Según el proceso descrito por la patente se puede obtener saponinas con una pureza del 70%, un valor muy cercano al obtenido por nuestro proceso. La variación de purezas puede ser debido a que no se aplicaron ciertas etapas como el uso de bentónica y polivinilpirrolidina. Además, la filtración de membranas no fue posible realizarla porque no se dispuso de los equipos. Para sustituir estas etapas se realizó una filtración con carbón activado para retener algunas impurezas y se aplicó una partición con n-butanol con el objetivo de mejorar la pureza del producto.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

Las condiciones más favorables de extracción que permitieron obtener el mejor rendimiento con la técnica de maceración fueron a una concentración de etanol al 40%, 48 horas de tiempo de extracción y una relación solvente masa de 15. El mejor rendimiento de saponinas en una extracción asistida por microondas se logra con etanol al 60 %, un nivel de potencia de 630W, 7 ciclos de extracción y una relación solvente masa de 10. Estos resultados pueden considerarse útiles para desarrollar una extracción eficiente a gran escala de saponinas triterpenoides del polvo de escarificado de quinua en Ecuador.

Al comparar las técnicas de MAE y maceración se encontró que MAE era el método más eficiente para la extracción de saponinas triterpenoides del mojuelo de quinua, lo cual fue verificado por los resultados experimentales presentados en este estudio. El método MAE empleado proporciona una alta eficiencia de extracción en poco tiempo, y menos uso de solvente. La relación masa solvente es la variable independiente que afecta mayoritariamente a la extracción de saponinas por maceración, mientras que los ciclos de extracción presentan la mayor influencia en la extracción asistida por microondas.

En función de la metodología desarrollada dentro de esta investigación se pueden extraer saponinas procedentes del polvo de escarificado de quinua y purificarlas hasta un grado de pureza del 63%, considerando como referencia un estándar comercial de saponina de quillaja debido a la no disponibilidad de una estándar de saponina de quinua

El presente estudio permitió concluir que a partir del mojuelo de quinua, un residuo industrial infrautilizado, utilizando etanol y agua es posible extraer saponinas triterpénicas con la ayuda de técnicas simples como maceración y técnicas avanzadas como la extracción asistida por microondas.

5.2. Recomendaciones.

Se recomienda desarrollar un estudio que permita mejorar la extracción y purificación de saponinas utilizando técnicas como filtración por membranas, cristalización, precipitación, fluidos supercríticos. El desarrollo de estudios que permitan obtener productos derivados de la saponina de quinua es un tema importante a ser considerado a futuro, ya que sus aplicaciones son muy amplias.

Realizar un estudio que demuestre si existe una factibilidad económica en la extracción y purificación de saponinas de quinua a nivel industrial en Ecuador.

5.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D., & Benítez, R. (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 45(3), 438–469.
<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n3.62043>
- Avalos, S., & Ramírez, E. (2011). CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS DE LAS SAPONINAS CONTENIDAS EN EL EPISPERMA DE LA ESPECIE *Chenopodium quinoa willd* “QUINUA” PROCEDENTE DE LA PROVINCIA DE SANTIAGO DE CHUCO - LA LIBERTAD. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO FACULTAD.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bacigalupo, A. y Tapia, M. (1990). *Cultivos Andinos FAO*. Recuperado de [file:///C:/Users/windows/Desktop/Tesis/marco teorico/CULTIVOS ANDINOS _ FAO - VERSION 1.0_files/reconoc.html](file:///C:/Users/windows/Desktop/Tesis/marco%20teorico/CULTIVOS%20ANDINOS_%20FAO%20VERSION%201.0_files/reconoc.html).
- Benthin, B., Danz, H., & Hamburger, M. (1999). Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *Journal of Chromatography. A*, 837(1–2), 211–219. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00071-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00071-0)
- Berti, C., Ballabio, C., Restani, P., Porrini, M., Bonomi, F., & Iametti, S. (2004). Immunochemical and Molecular Properties of Proteins in *Chenopodium quinoa*, 81(2), 275–277. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.2.275>
- Bhadoriya, U., Tiwari, S., Mourya, M., & Ghule, S. (2011). MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF FLAVONOIDS FROM *ZANTHOXYLUM BUDRUNGA* W. OPTIMIZATION OF EXTRACTION PROCESS Introduction. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*, 1(11), 81–86.

- Bojanic, A. (2011). La quinua : Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. *Proinpa*, 58.
https://doi.org/http://www.fao.org/fileadmin/templates/aiq2013/res/es/cultivo_quinua_es.pdf
- Brady, K., Ho, C. T., Rosen, R. T., Sang, S., & Karwe, M. V. (2007). Effects of processing on the nutraceutical profile of quinoa. *Food Chemistry*, 100(3), 1209–1216.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.001>
- Casillas, A. (2009). Ayuda para trabajos de quimica_ EQUIPO SOXHLET. Recuperado de <http://kimikohuaxtla.blogspot.com/2009/06/equipo-soxhlet.html>
- Cheok, C. Y., Salman, H. A. K., & Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16–40.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.057>
- Chistian, G. D. (2009). *Química Analítica*. Sexta edición. University of Washington
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Corzo Barragan, D. (2011). Análisis y selección de diferentes métodos para eliminar las saponinas en dos variedades de *Chenopodium quinoa* Willd. *Pérez Arbelaezia*, (357), 153–162.
- Eddy, R., Paz José, & Francisco, S. G. (2014). *Hierro, Saponinas y Porfirinas en cassia grandis L, UNAN-León 2014*. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA UNAN-LEON.
- Fernando, P., & Valencia, A. (2017). *WO 2017/088080 A1*.
- Ganzler, K., Salgó, A., & Valkó, K. (1986). Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A*, 371(C), 299–306.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94714-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94714-4)
- Gavidia, E. (2015). *ANALISIS SECTORIAL.QUINUA.2015. PRO ECUADOR*
- Gianna, V. (2013). “EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE SAPONINAS DE SEMILLAS DE *Chenopodium quinoa* Willd PROVENIENTES DEL NOROESTE

ARGENTINO.” Universidad Nacional de Córdoba Facultad.

- 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(8), 1593–1597. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03008.x>
- Güçlü-Üstündağ, Ö., & Mazza, G. (2007). Pressurized low polarity water extraction of saponins from cow cockle seed. *LWT - Food Science and Technology*, 80(9), 619–630. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.10.019>
- Güçlü-Üstündağ, Ö., & Mazza, G. (2008). Extraction of saponins and cyclopeptides from cow cockle seed with pressurized low polarity water. *LWT - Food Science and Technology*, 41(9), 1600–1606. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.10.019>
- Guo, Z., Jin, Q., Fan, G., Duan, Y., Qin, C., & Wen, M. (2001). Microwave-assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine *Radix puerariae*, 436, 41–47. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)00900-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)00900-X)
- Gutiérrez Pulido, H., & De la Vara Salazar, R. (2008). *Diseño de experimentos con mezclas* (Segunda edición). (P. E. R. Vázquez & L. C. Rojas, Eds.), *Análisis y diseño de experimentos*.
- He, J., Wu, Z., Zhang, S., Zhou, Y., Zhao, F., Peng, Z., & Hu, Z. (2013). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Tea Saponin and Its Application on Cleaning of Historic Silks. <https://doi.org/10.1007/s11743-013-1523-8>
- Huerta, S. (2012). *Cristalización. Planta Piloto de Fermentaciones Departamento de Fermentaciones*. Recuperado de <file:///C:/Users/Administrador/Downloads/Cristalizacion.pdf>
- J. TROISI, R. D. F., PULVENTO, C., D’ANDRIA, R., VEGA-GÁLVEZ, A., MIRANDA, MARTÍNEZ, E. A., & LAVINI, A. (2014). *ESTADO DEL ARTE DE LA QUINUA en el mundo en 2013*. <https://doi.org/10.13140/2.1.1568.5129>

- Kuljanabhadgavad, T., Thongphasuk, P., Chamulitrat, W., & Wink, M. (2008). Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry*, *69*(9), 1919–1926. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.03.001>
- Kwon, J. H., Bélanger, J. M. R., Paré, J. R. J., & Yaylayan, V. A. (2003). Application of the microwave-assisted process (MAPTM) to the fast extraction of ginseng saponins. *Food Research International*, *36*(5), 491–498. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00197-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00197-7)
- Le, A. V., Parks, S. E., Nguyen, M. H., & Roach, P. D. (2018). Optimisation of the Microwave-Assisted Ethanol Extraction of Saponins from Gac, 13. <https://doi.org/10.3390/medicines5030070>
- Letelier, M. E., Rodríguez-Rojas, C., Sánchez-Jofré, S., & Aracena-Parks, P. (2011). Surfactant and antioxidant properties of an extract from *Chenopodium quinoa* Willd seed coats. *Journal of Cereal Science*, *53*(2), 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.12.006>
- Li, J., Zu, Y., Fu, Y., Yang, Y., & Li, S. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge .) kernel and evaluation of its antioxidant activity, *11*, 637–643. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.06.004>
- Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction-an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, *1*(1), 7–18. Recuperado de <http://www.phcogrev.com/article.asp?issn=0973-7847;year=2007;volume=1;issue=1;spage=7;epage=18;aulast=Mandal;type=0>
- Mastrogiovanni, B. M. (2012). *EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRIMARIA DE SAPONINAS DE Quillaja brasiliensis*. Universidad de la República Montevideo.
- Muir, A. ., Paton, D., Ballantyne, K., & Aubi, A. (1999). *PCT/CA99/00333*. Estados Unidos.
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and

herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8–18.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>

Nahar, S. D. S. and L. (2012). Natural Products Isolation. *Methods in Molecular Biology*, 864, 75–87. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1>

NANQUN ZHU, SHUQUN SHENG, SHENGMIN SANG, JIN-WOO JHOO, NAISHENG BAI, MUKUND V. KARWE, ROBERT T. ROSEN, A. C.-T. H. (2002). Triterpene Saponins from Debittered Quinoa (*Chenopodium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 865–867.

Nickel, J., Spanier, L. P., Botelho, F. T., Gularte, M. A., & Helbig, E. (2016). Effect of different types of processing on the total phenolic compound content, antioxidant capacity, and saponin content of *Chenopodium quinoa* Willd grains. *Food Chemistry*, 209, 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.031>

P.SEEMAN, D. CHENG, and G. H. I. (1973). STRUCTURE OF MEMBRANE HOLES IN OSMOTIC AND SAPONIN HEMOLYSIS. *Filtration & Separation*, 56(1), 519–527. <https://doi.org/10.1083/jcb.56.2.519>

Peralta, E. (1985). *La Quinoa Un Gran Alimento Y Su Utilizacion*. Agosto. Recuperado de [http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/LA QUINUA...UN GRAN ALIMENTO \(1\).pdf](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/LA_QUINUA...UN_GRAN_ALIMENTO(1).pdf)

Prego, I., Maldonado, S., & Otegui, M. (1998). Seed Structure and Localization of Reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*, 82, 481–488. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0704>

Quispe-Fuentes, I., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Lemus-Mondaca, R., Lozano, M., & Ah-Hen, K. (2013). A Kinetic approach to saponin extraction during washing of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds. *Journal of Food Process Engineering*, 36(2), 202–210. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2012.00673.x>

San Martín, R., Ndjoko, K., & Hostettmann, K. (2008). Novel molluscicide against *Pomacea canaliculata* based on quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins. *Crop Protection*, 27(3–5),

310–319. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.03.015>

Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (2006). *Products Natural Isolation*. Segunda edición.

SASKATOON, A., SASKATOON, D., SASKATOON, A., & SASKATOON, K. (2001). *US 2001/0056181 A1*. UNITED STATES.

Skoog, D. A., Wes, D. M., Holler, F. J., & Crouc, S. R. (2015). *FUNDAMENTOS DE QUÍMICA ANALÍTICA* (Vol. 14).

Stuardo, M., Martí, S., & Ricardo, N. (2008). Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*, 27(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.11.003>

Tomás, G., Huamán, M., Aguirre, M., & Barrera, T. (2010). Extracción Y Clasificación De La Saponina Del, *13*, 36–39.

Usiña Estrada, K. M. (2017). ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES SURFACTANTES DE SAPONINAS OBTENIDAS DE LOS FRUTOS DE *Sapindus saponaria* L. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.

Wang, J., Zhang, J., Zhao, B., Wang, X., Wu, Y., & Yao, J. (2010). A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina* L. polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. *Carbohydrate Polymers*, 80(1), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.073>

Warren L. McCabe, Julian C. Smith, Peter Harriot, R. H. C. (2013). *Operaciones unitarias en ingeniería química. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Woldemichael, G. M., & Wink, M. (2001). Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2327–2332. <https://doi.org/10.1021/jf0013499>

Xing, S., He, Y., Zhu, H., & Wang, X. (2017). An approach to sample selection from big data for classification. *2016 IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics*,

SMC 2016 - Conference Proceedings, 902, 2928–2935.

<https://doi.org/10.1109/SMC.2016.7844685>

Zarate Sullca, S. E. (2016). *Evaluación del método de extracción sólido – líquido de la saponina de 5 cultivares de quinua (Chenopodium Quinoa Willd), su encapsulamiento y utilización en la alimentación*. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO PUNO. Recuperado de http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/RNAP_5253312709817e6ab7abbbf691752876

Zheng, X., Wang, X., Lan, Y., Shi, J., Xue, S. J., & Liu, C. (2009). Application of response surface methodology to optimize microwave-assisted extraction of silymarin from milk thistle seeds. *Separation and Purification Technology*, 70(1), 34–40.

<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.08.008>

ANEXOS



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA

CARRERA DE INGENIERÍA PETROQUÍMICA

CERTIFICACIÓN

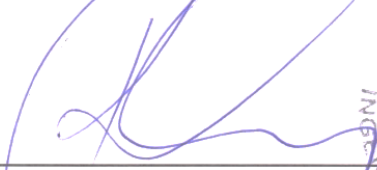
Se certifica que el siguiente trabajo fue desarrollado por el señor: **CARLOS EDUARDO VILLACIS SEGOVIA**

En la ciudad de Latacunga, a los 28 días del mes de noviembre del 2018

Aprobado por:



Dr. Rer. Nat., Ph.D Roman Rodríguez.
DIRECTOR DE PROYECTO



Dr. Rer. Nat., Ph.D Roman Rodríguez.
DIRECTOR DE CARRERA



Abg. Darwin Albán
SECRETARIO ACADEMICO