

## Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE SAPONINAS A  
PARTIR DE RESIDUOS DEL ESCARIFICADO DE *Chenopodium quinoa*  
Willdenow (QUINUA) Y LA EVALUACIÓN ANTIFUNGICA *IN VITRO* DE  
HONGOS FITOPATÓGENOS DE LA MISMA**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Coila Chacón, Fátima Dafne**

Para optar el Título Profesional de

**Ingeniero Biotecnólogo**

Asesor:

**Ing. Córdova Barrios, Cinthia Carol**

**AREQUIPA – PERU**

**2019**

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 2016000050358

N° Trámite en Fac. 312-2016

Fecha Recep. Fac. 24-11-2016

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **COILA CHACON, Fátima Dafne**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE **INGENIERO BIOTECNOLOGO**

**“OPTIMIZACION DEL PROCESO DE OBTENCION DE SAPONINAS A PARTIR DE RESIDUOS DEL ESCARIFICADO DE *Chenopodium quinoa* Wild (*Quinoa*) Y LA EVALUACION ANTIFUNGICA *in vitro* DE HONGOS FITOPATOGENOS DE LA MISMA”**

DICTAMINADORES: 1) **Dr. José Villanueva Salas** 2) **Mgter Roxana Bardales Álvarez**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente  
FIRMAS: (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 21/03/2017

ASESOR: **Ing. Cinthia Córdova Barrios**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente  
FIRMA FECHA 19-07-19

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. José Villanueva Salas** 3) **Mgter. Jose Carpio Carpio**  
2) **Mgter. Roxana Bardales Álvarez**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente  
FIRMA (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 20/09/19

JURADOS: PRESIDENTE **DR. JOSE VILLANUEVA SALAS**  
VOCAL **MAG. ROXANA BARDALES ALVAREZ**  
SECRETARIO **MAG. JOSE CAPIO CAPIO**

FECHA 10/10/19 HORA 19:00 LOCAL C-402

FIRMA DEL DECANO FECHA

*A Dios y a la Virgen por ser pilares fundamentales de mi vida.*

*Él me da siempre la fortaleza y la valentía para seguir adelante a pesar de todos los  
obstáculos que se ponen en el camino.*

*A mis padres, Eduardo y Tomasa, les dedico este logro, no me alcanzará el eterno  
agradecimiento que tengo hacia ellos; por su constante motivación, por su amor  
incondicional y por ese apoyo desinteresado que siempre me brindan y por ese ejemplo  
de buenos valores que siempre me inculcan.*

*A mis hermanos, Harold y Rowena, por estar conmigo en las buenas y en las malas a  
pesar de la distancia, por sus constantes juegos y charlas cuando más necesitaba.*

*Gracias a ustedes por su amor, sus consejos, su ejemplo y su apoyo constante.*

## Agradecimientos

A mi asesora, la ingeniera Cinthia Córdova Barrios por su apoyo y los consejos brindados durante el desarrollo del trabajo de investigación.

A los auxiliares de laboratorio, la señora Janet y el señor Marco, por brindarme las facilidades para usar los laboratorios y por la ayuda necesaria para el manejo correcto de los equipos.

A mi tía Andrea por esas constantes pláticas que tuvimos y porque jamás le faltaron palabras para motivarme cuando realmente lo necesitaba.

A mi mejor amiga, Heydi, por esas conversaciones tan largas que siempre tenemos, siempre dándome ánimos y aliento en momentos de crisis; a pesar de la distancia siempre es grato conversar con ella y por esa frase tan icónica que nos gusta mencionar “You’re my person, you will always be my person”.

A Edgar; por su apoyo incondicional; por incentivar me a tener la valentía de luchar por este proyecto; por darme ese impulso de salir de mi zona de confort, por darme esos ánimos de querer siempre algo más y llegar aún más lejos de lo que yo puedo desear.

Y a mi Ramona, por acompañarme en todo momento y en especial en aquellas madrugadas en las que estaba conmigo haciéndome compañía.

*En memoria de Papá Eduardo y todos  
los familiares que ya no están conmigo.*



*"El amor y la compasión son  
necesidades, no lujos; sin ellos la  
humanidad no puede sobrevivir"*

*Dalai Lama*

# ÍNDICE

RESUMEN .....	i
ABSTRACT .....	iv
INTRODUCCIÓN .....	vii
HIPÓTESIS .....	ix
OBJETIVOS .....	x
CAPÍTULO I .....	1
1. MARCO TEÓRICO .....	1
1.1. <i>Chenopodium quinoa</i> Willd (quinua) .....	1
1.1.1. Descripción botánica.....	1
1.1.2. Origen y distribución geográfica .....	2
1.1.3. Aspectos nutricionales y químicos .....	5
1.2. SAPONINAS.....	6
1.2.1. Generalidades.....	6
1.2.2. Biosíntesis de saponinas .....	8
1.2.3. Distribución en las plantas .....	10
1.2.4. Saponinas en la planta de quinua .....	11
1.2.5. Procesamiento de la quinua para obtención de saponinas .....	16
1.2.6. Efectos biológicos de las saponinas de quinua .....	16
1.2.7. Aplicaciones comerciales .....	17
1.2.8. Actividad antifúngica.....	17
1.3. Métodos de extracción de saponinas .....	18
1.3.1. Extracción sólido - líquido.....	20
1.4. Métodos de determinación de saponinas .....	21
1.5. Hongos fitopatógenos .....	22
1.5.1. Síntomas y diagnóstico de las infecciones por hongos .....	23
1.5.2. Biocontroladores antifúngicos .....	24

CAPÍTULO II.....	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1. Materiales .....	26
2.1.1. Material biológico.....	26
2.1.1.1. Cascarilla de semillas de quinua ( <i>Chenopodium quinoa</i> Willd).....	26
2.1.1.2. Inóculo .....	26
2.1.2. Material de laboratorio.....	26
2.1.3. Reactivos.....	27
2.1.4. Equipos .....	27
2.1.5. Ambientes de trabajo .....	27
2.2. Métodos .....	28
2.2.1. Optimización del proceso de obtención de saponinas a partir de residuos del escarificado de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. ....	28
2.2.1.1. Diseño experimental de la optimización de la extracción de saponinas	28
2.2.1.1.1. Procesamiento del material vegetal .....	28
2.2.1.1.2. Preparación de los extractos hidro-etanólicos .....	29
2.2.1.1.3. Determinación de las variables para la optimización de la obtención de saponinas .....	29
2.2.1.1.4. Filtración de los extractos hidro-alcohólicos .....	31
2.2.1.1.5. Evaporación del extracto y obtención del crudo de saponinas .....	32
2.3. Determinación del contenido de saponinas .....	34
2.3.1. Método cualitativo y semi-cuantitativo: afrosimétrico .....	34
2.3.1.1. Preparación del estándar .....	34
2.3.2. Método cuantitativo: espectrofotometría UV – VIS.....	35
2.4. Determinación del rendimiento de extracción.....	36
2.5. Aislamiento, caracterización e identificación de hongos fitopatogenos de la planta de Quinua.....	37
2.5.1. Recolección de material vegetal .....	37
2.5.2. Identificación de hongos fitopatógenos a partir de cortes vegetales de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd .....	37
2.6. Actividad antifúngica de saponinas extraídas frente a cepas fungales encontradas .....	38
2.6.1. Prueba preliminar de evaluación antifúngica: Crudo de saponinas vs Extracto hidro-alcohólico con saponinas.....	38

2.6.2. Método de dilución en placa y siembra .....	39
2.7. Análisis estadístico .....	40
CAPÍTULO III .....	41
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
3.1. Diseño experimental de la optimización de la extracción de saponinas .....	41
3.2. Resultados de la optimización de la obtención de saponinas a diferentes variables.....	43
3.3. Rendimiento de extracción de saponinas.....	48
3.4. Determinación del contenido de saponinas .....	52
3.4.1. Método semi-cuantitativo afrosimétrico: obtención de la curva de calibración. ....	52
3.5. Metodo cuantitativo espectrofotométrico UV-VIS: obtención de la curva de calibración. ....	55
3.6. Comparación final de los datos obtenidos.....	58
3.7. Evaluación antifúngica del extracto de saponinas en hongos fitopatogenos.....	61
3.7.1. Aislamiento de hongos fitopatogenos de la planta de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd	61
3.7.2. Prueba preliminar de evaluación anti fúngica: Crudo de saponinas vs Extracto hidro-alcohólico con saponinas.....	64
3.8. Evaluación inhibidora de los hongos aislados con el tratamiento 2: Saponinas en extracto hidro-alcohólico al 50 %V/V, con tiempo de agitación de 72 horas a 50°C...	67
3.8.1. Evaluación antifúngica de <i>Alternaria sp.</i> ....	67
3.8.2. Evaluación antifúngica de <i>Fusarium sp.</i> .....	73
CONCLUSIONES.....	80
RECOMENDACIONES .....	81
BIBLIOGRAFÍA .....	82
ANEXOS .....	96

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Aminoácidos de semillas de quinua, cebada, soya y trigo. <sup>40</sup> .....	5
<b>Tabla 2.</b> Composición aproximada de la semilla de quinua <sup>41</sup> .....	6
<b>Tabla 3.</b> Estructuras de saponinas en <i>Chenopodium quinoa</i> Willd <sup>50</sup> .....	15
<b>Tabla 4.</b> Actividad biológica de las saponinas. <sup>39,65,72,73</sup> .....	19
<b>Tabla 5.</b> Diseño experimental multinivel parar cada muestra de escarificado de quinua en extracto hidro-alcohólico. ....	31
<b>Tabla 6.</b> Peso y concentración de saponina estandar marca SIGMA – ALDRICH® .....	35
<b>Tabla 7.</b> Parámetros de la curva de calibración: índice de espuma de saponinas.....	35
<b>Tabla 8.</b> Elaboración de los patrones de medición método UV-VIS para elaborar la curva de calibración. ....	36
<b>Tabla 9.</b> Concentración de saponinas en 200 mL de medio PDA para 10 placas, distribuyendo 20 mL por cada placa.....	39
<b>Tabla 10.</b> Tabla de interacción entre la concentración de extracto hidro-alcohólico (% V/V) y el tiempo de agitación (horas) .....	44
<b>Tabla 11.</b> Tabla de interacción entre la concentración de extracto hidro-alcohólico (% V/V) y la temperatura de extracción (°C).....	44
<b>Tabla 12.</b> Tabla de interacción entre la temperatura de extracción (°C) y el tiempo de agitación (horas) .....	45
<b>Tabla 13.</b> Datos de pesos promedio de saponinas obtenidas después de la interacción de las tres variables: concentración hidro-alcohólica, tiempo de agitación y temperatura de extracción con su respectiva desviación estándar a partir de las tres replicas que se realizó. ....	45

<b>Tabla 14.</b> Datos obtenidos del promedio de crudo de saponinas (g) y el promedio del rendimiento final de la obtención del crudo de saponinas (%).	49
<b>Tabla 15.</b> Análisis de varianza para el promedio de Rendimiento %	49
<b>Tabla 16.</b> Datos de altura en ‘cm’ obtenidos de la medición de patrones en variación de la concentración de saponinas en el disolvente etanol-agua al 50% V/V.	53
<b>Tabla 17.</b> Datos obtenidos después de la lectura de absorbancia de los estándares de saponinas en el espectrofotómetro.	56
<b>Tabla 18.</b> Comparación de pesos de saponinas obtenidos en el método semi-cuantitativo o afrosimétrico y en el método espectrofotométrico; ambos pesos de saponinas en 100 mL de extracto hidro-alcohólico.	59
<b>Tabla 19.</b> Datos finales de la obtención de la determinación de saponinas mediante el método semi-cuantitativo o afrosimétrico: índice de espuma, el método cuantitativo: espectrofotometría UV-VIS, el crudo de saponinas al resultante al final de la extracción y el rendimiento del proceso de extracción de saponinas.	60
<b>Tabla 20.</b> Descripción macroscópica y microscópica de los hongos aislados a partir de hojas y tallos seccionados de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	62
<b>Tabla 21.</b> Descripción macroscópica y microscópica de los hongos aislados a partir de hojas y tallos seccionados de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. (continuación)	63
<b>Tabla 22.</b> Volumen de la alícuota de saponinas en extracto hidro-alcohólico al 50% y el respectivo peso de saponinas dentro de la alícuota para la dilución en el medio PDA y evaluar la actividad antifúngica tanto de <i>Alternaria sp.</i> como <i>Fusarium sp.</i>	67
<b>Tabla 23.</b> Variables a manejar en base a la concentración de saponinas tanto de extracto hidro-alcohólico en medio PDA y la respectiva concentración de saponinas en medio PDA, dando así a las variables nombres como C1, C2, C3 Y C4 los cuales se manejaron para evaluar el porcentaje de inhibición de <i>Alternaria sp.</i> y <i>Fusarium sp.</i>	68

**Tabla 24.** Datos obtenidos después de la medición del halo de inhibición de *Alternaria sp.* para cada variable de concentración de saponinas en medio PDA durante los días 5, 7, 9 y 13; comparados a un grupo control positivo (C+ extracto-Mancozeb) que es el extracto con Mancozeb (antifúngico agrario) y un control negativo (C- agua) en el cual solo es extracto de saponinas y agua esteril. .... 69

**Tabla 25.** Porcentaje de Inhibición micelial (%) obtenidos a partir de la Tabla 22, tomando en cuenta que el diámetro de la placa es el 100% en *Alternaria sp.* ..... 69

**Tabla 26.** Media de porcentaje de inhibición con variables de concentración de saponinas en medio PDA en *Fusarium sp.* ..... 73

**Tabla 27.** ANOVA unidireccional para variables de concentración de saponinas en medio PDA: C1, C2, C3 y C4 en el que el valor p es menor a 0.05; lo cual significa que uno de los valores obtenidos es significativamente diferente. .... 75

**Tabla 28.** Las comparaciones multiples de Dunnett ayudan a diferenciar aquellas medias que son significativamente diferentes dentro de una muestra. .... 75

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sección longitudinal media de una semilla de quinua <sup>20</sup> .....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura general de una saponina.....	8
<b>Figura 3.</b> Biosíntesis de la diversidad estructural en agliconas de saponinas <sup>36</sup> .....	12
<b>Figura 4.</b> Estructuras de agliconas de saponinas en quinua: <b>a)</b> ácido oleanólico <b>b)</b> hederagenina.....	13
<b>Figura 5.</b> Estructuras de agliconas de saponinas en quinua: <b>c)</b> ácido 3 $\beta$ ,23,30-trihidroxi olean-12-eno-28-oico <b>d)</b> gipsogenina .....	13
<b>Figura 6.</b> Estructuras de agliconas de saponinas en quinua: <b>e)</b> ácido 3 $\beta$ -hidroxi-27-oxoolean-12-eno-28-oico; <b>f)</b> ácido espergulagénico .....	13
<b>Figura 7.</b> Estructuras de agliconas de saponinas en quinua: <b>g)</b> ácido serjanico <b>h)</b> ácido fitolacagénico.....	14
<b>Figura 8.</b> Tamizado del afrecho de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd en una malla N° 16. ....	29
<b>Figura 9.</b> Obtención de extractos del cascarillado de <i>Chenopodium quinoa</i> W. por el método de filtrado al vacío .....	32
<b>Figura 10.</b> Hojas de <i>Chenopodium quinoa</i> W. con manchas foliares. <b>a)</b> Planta de quinua donde presenta hojas con manchas foliares amarillas. <b>b)</b> y <b>c)</b> Haz de la hoja donde se observa una clorosis en la hoja. (Fotografías tomadas en los campos de cultivo del distrito de San Salvador, provincia de Calca, departamento del Cusco.) .....	38
<b>Figura 11.</b> Extractos filtrados del cascarillado de <i>Chenopodium quinoa</i> W. todos extractos hidro-alcohólicos <b>a)</b> 20% V/V, <b>b)</b> 50% V/V <b>c)</b> 80% V/V.....	42
<b>Figura 12.</b> Comparación del contenido de saponinas en el extracto entre muestras, las barras de error de desviación estándar indican que en la muestra VIII(50%:72hr:50°C) se obtuvo un mayor peso de crudo de saponinas en la extracción.....	46

- Figura 13.** Gráfica de efectos de los factores A: concentración hidro-alcohólica %V/V, factor B: tiempo de agitación y factor C: temperatura de extracción..... 50
- Figura 14.** Gráfica de interacción de todos los factores A: %V/V; B: Tiempo (t); C: Temperatura (T). Efecto de %V/V permanece constante a un volumen de 50 % el tiempo de agitación a 72 horas y la temperatura a 50 °C; demostrado por las líneas de tendencia en rojo de la gráfica. .... 51
- Figura 15.** Curva de calibración, método afrosimetrico “Índice de espuma”. Los puntos refieren a la altura de espuma producida a partir de la solución de los estándares de saponinas. La ecuación lineal de la curva se usó para la estimación de la concentración de saponinas como método estándar  $Y = 2.243 + 9.294X$ ,  $r = 0.985$ . con una desviación estándar de 2.36 y un coeficiente de error de 0.305. Donde X es la concentración en mg/mL y Y es la altura medida en centímetros..... 54
- Figura 16.** Curva de calibración: método de espectrofotometría UV-VIS; habiendo correlación lineal positiva fuerte. Los puntos refieren a la concentración de saponinas en los estándares de saponinas medidos frente a las absorbancias obtenidas después de la lectura. La ecuación lineal  $y = -0.03912 + 0.3299X$ ; sirvió para obtener la cantidad de saponinas en el extracto;  $r = 0.997$ ; con una desviación estándar de 0.266 y un coeficiente de error de 0.088. Donde Y es la absorbancia obtenida y X es la concentración en mg/mL. .... 56
- Figura 17.** Fotografías de aislamiento de hongos fitopatógenos obtenidos después de su caracterización macro y microbiológica: a) y b) *Alternaria sp.* c). *Fusarium sp.* ambos sembrados en medio PDA después de 10 días de incubación. .... 62
- Figura 18.** Vista macroscópica y microscópica del hongo *Alternaria sp.* aislado a partir de hojas de *Chenopodium quinoa* Willd. .... 63
- Figura 19.** Vista macroscópica y microscópica del hongo *Fusarium sp.* aislado a partir de hojas de *Chenopodium quinoa* Willd. .... 64

**Figura 20.** Comparación de crecimiento de halo fungal de crudo de saponinas obtenidas al final de la extracción (tratamiento 1) vs saponinas en extracto hidro-alcohólico (tratamiento 2) con respecto a los hongos *Alternaria sp.* y *Fusarium sp.* Se tomó en cuenta el numero de días al que se sometió a los hongos al tratamiento y el diámetro de crecimiento del hongo medido en centímetros..... 65

**Figura 21.** Prueba preliminar antifúngica en el día 9: **a)** crudo de saponinas obtenidas al final de la extracción (tratamiento 1) en *Alternaria sp.* vs **b)** saponinas en extracto hidro-alcohólico (tratamiento 2) en *Alternaria sp.*..... 66

**Figura 22.** Gráfica de la media del porcentaje de inhibición micelial de las distintas concentraciones de saponinas en el medio PDA frente al hongo *Alternaria sp.* en el cual a partir de la concentración C2 de saponinas (0.4148 mg/mL, barra anaranjada) se obtiene mayor porcentaje de inhibición. .... 70

**Figura 23.** Gráfica de intervalos de confianza de 95% de Dunnett que compara las diferencias entre las medias de cada variable de concentración obtenida frente a la media del grupo control, en esta gráfica el intervalo del control negativo (C-) no contiene 0, por lo que es significativamente diferente al resto de variables..... 71

**Figura 24.** Gráfica de intervalos de las variables de concentración de saponinas en medio PDA: C1, C2, C3 Y C4 en comparación con el grupo control (Extracto + Mancozeb) en *Alternaria sp.* Esta gráfica apoya a Figura 23 y por lo tanto a los resultados obtenidos en la Tabla 23, se observa un ligero incremento en el porcentaje de inhibición frente al grupo control positivo y negativo. .... 72

**Figura 25.** Gráfica de la media del porcentaje de inhibición micelial de las distintas concentraciones de saponinas en el medio PDA frente al hongo *Fusarium sp.* ..... 74

**Figura 26.** Gráfico de intervalos de confianza de Dunnett: est gráfica muestra que tan alejadas están las medias de 0, en este caso tanto C1 y C2 se van alejando considerablemente

de 0 lo cual aporta nuevamente que a partir de C3 y C4 (0.6518 y 0.8888 mg/mL) es cuando existe una mayor inhibición de *Fusarium sp.*..... 76

**Figura 27.** Intervalos de factor C1 (0.1778 mg/mL), C2 (0.4148 mg/mL), C3 (0.6518 mg/mL) y C4 (0.8888 mg/mL) al 95 %; los cuales tanto C3 y C4 demuestran un mayor porcentaje de inhibición frente a *Fusarium sp.* ..... 77



## RESUMEN

La optimización de procesos es la metodología por la cual se quiere lograr la mejora de una cadena de producción, para ello se persigue la eliminación o la reducción de todas aquellas actividades que no aportan valor al proceso de producción o aquellas que se repiten evitando un exceso de consumo de material biológico o insumos. También darle un valor agregado a la cadena de producción utilizando los desechos que éste produce.

En la etapa de cosecha, la actividad de trilla en cultivos de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) deja el afrecho o cascarillado, que normalmente es quemado o tirado a los ríos provocando contaminación ambiental. El presente trabajo de investigación permitió evaluar el efecto de tres variables fijadas para la optimización de la extracción de crudos de saponinas para lo cual se utilizó una primera variable como la concentración hidroetanólica %V/V como disolvente, se manejó tres diferentes concentraciones de alcohol – agua al 20, 50 y 80 %, a esta variable se le llamó Factor A; la segunda variable fue el tiempo de agitación (t), se manejaron los tiempos de 24 horas y 72 horas de agitación, se le denominó Factor B y la tercera variable fue la temperatura de extracción (T) con la que se trabajó, a 20 °C y 50 °C para la extracción del crudo de saponinas, a esta variable se le denominó Factor C. Para su optimización se hizo un diseño experimental de doce muestras en las cuales las tres variables con sus respectivos niveles (Factor A: 3 niveles; Factor B: 2 niveles; Factor C: 2 niveles) fueron conjugadas de tal manera que el factor A, B y C tengan influencia durante la extracción; para mejores resultados se realizaron las pruebas por triplicado.

Evaluando las variables o factores se obtuvo como resultado que a una concentración del 50 % etanol – agua, a un tiempo de agitación de 72 horas y una temperatura de 50 °C

existe un mayor rendimiento de extracción dando como resultado un  $47.429 \pm 0.028$  mg % de rendimiento.

Para el aislamiento de hongos fitopatógenos de la planta *Chenopodium quinoa* Willd se elaboró una cámara húmeda para el aislamiento específico de los hongos fitopatógenos que afectan tanto a las hojas como a tallos y raíces; evaluando las manchas foliares y la podredumbre de tallos y raíces, se aisló en medio PDA dos hongos característicos, según bibliografía, de la planta *Chenopodium quinoa*; estos son *Alternaria sp* y *Fusarium sp*.

Luego se analizó el efecto inhibitorio del extracto etanol – agua al 50 % a tiempo de agitación de 72 horas y una temperatura de 50 °C, para lo cual se llevó a filtración y centrifugación para su uso; se manejó variables de concentración en alícuotas del extracto alcohol-agua de 0.1778, 0.4148, 0.6518 y 0.8888 mg/mL en 100 mL de medio PDA dando como variables las concentraciones de C1: 0.1778; C2: 0.4148; C3: 0.6518 y C4: 0.8888 mg/mL de extracto hidro-alcohólico de saponinas en medio PDA.

Para evaluar el efecto inhibitorio se tomó en cuenta las variables de concentración de saponinas tanto para *Alternaria sp*. como *Fusarium sp*. frente a un control positivo extracto con Mancozeb (fungicida agrícola) y un control negativo que solo es agua en medio PDA. Los resultados obtenidos demuestran que si existe un efecto inhibitorio para ambos hongos; para *Alternaria sp*. la concentración que se necesita es 0.4148 mg/mg/mL de saponinas, es decir que a partir de 41.48 mg de saponinas en el medio PDA habrá una mayor inhibición de *Alternaria sp*. Sin embargo, para *Fusarium sp*., si bien los resultados demostraron que no hay mucha eficacia en la inhibición de este hongo, se obtuvo que a partir de una concentración de 0.6518 mg/mL de saponinas en medio PDA se obtuvo que hay inhibición y la ralentización del crecimiento del hongo *Fusarium sp*.

Por consiguiente, el objetivo principal de optimizar el proceso de extracción de saponinas dio como resultado que a una concentración de 50% de extracto hidro-etanólico a un tiempo de 72 horas de agitación y una temperatura de 50 °C de extracción se obtuvo un óptimo rendimiento y sugiere que este mismo extracto hidro-alcohólico actúa como antifúngico frente a *Alternaria sp* y *Fusarium sp.* aislados de la misma planta de *Chenopodium quinoa* Willd (quinua).

*Palabras clave:* *Chenopodium quinoa* Willd, quinua, saponinas, extracción, optimización, aislamiento, inhibición, antifúngico, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*



## ABSTRACT

Process optimization is the methodology by which the improvement of a production chain is to be achieved, for this purpose the elimination or reduction of all those activities that do not add value to the production process or those that are repeated avoiding an excess is pursued. of consumption of biological material or supplies. Also give added value to the production chain using the waste it produces.

In the harvest stage, threshing activity in quinoa crops (*Chenopodium quinoa* Willd) leaves the bran or husk, which is normally burned or thrown into the rivers causing environmental pollution. This research work allowed us to evaluate the effect of three variables set for the optimization of saponin crude oil extraction, for which a first variable was used, such as the hydro-ethanolic concentration % V/V as solvent, three different concentrations of alcohol - water at 20, 50 and 80 %, this variable was called Factor A; the second variable was the stirring time (t), the 24-hour and 72 hours of stirring times were handled, it was called Factor B and the third variable was the extraction temperature (T) with which it was worked, at 20 ° C and 50 ° C for the extraction of saponin oil, this variable was called Factor C. For its optimization an experimental design of twelve samples was made in which the three variables with their respective levels (Factor A: 3 levels ; Factor B: 2 levels; Factor C: 2 levels) were conjugated in such a way that factor A, B and C have influence during extraction; for better results the tests were carried out in triplicate.

Evaluating the variables or factors, it was obtained as a result that at a concentration of 50% ethanol - water, at a stirring time of 72 hours and a temperature of 50 ° C there is a higher extraction yield resulting in  $47,429 \pm 0,028$  mg% of performance.

For the isolation of phytopathogenic fungi of the *Chenopodium quinoa* Willd plant, a wet chamber was developed for the specific isolation of phytopathogenic fungi that affect both the leaves and stems and roots; evaluating the leaf spots and rot of stems and roots, two characteristic fungi, according to bibliography, were isolated from the *Chenopodium quinoa* Willd plant; these are *Alternaria sp.* and *Fusarium sp.*

The inhibitory effect of the 50% ethanol-water extract was then analyzed at a stirring time of 72 hours and a temperature of 50 ° C, for which purpose it was filtered and centrifuged for use; Aliquot concentration variables of the alcohol-water extract of 0.1778, 0.4148, 0.6518 and 0.8888 mg / mL in 100 mL of PDA medium were handled giving as variables the concentrations of C1: 0.1778; C2: 0.4148; C3: 0.6518 and C4: 0.8888 mg / mL of hydroponic extract of saponins in PDA medium.

To assess the inhibitory effect, the concentration variables of saponins were taken into account for both *Alternaria sp.* as *Fusarium sp.* against a positive control extract with Mancozeb (agricultural fungicide) and a negative control that is only water in PDA medium. The results obtained show that there is an inhibitory effect for both fungi; for *Alternaria sp.* the concentration that is needed is 0.4148 mg / mg / mL of saponins, that is to say that from 41.48 mg of saponins in the PDA medium there will be a greater inhibition of *Alternaria sp.* However, for *Fusarium sp.*, Although the results showed that there is not much efficacy in inhibiting this fungus, it was obtained that from a concentration of 0.6518 mg / mL of saponins in PDA medium it was obtained that there is inhibition and growth slowdown of the fungus *Fusarium sp.*

Therefore, the main objective of optimizing the saponin extraction process resulted in a 50% concentration of hydro-ethanol extract at a time of 72 hours of stirring and a temperature of 50 ° C extraction, an optimum was obtained. yield and suggests that this

same hydro-alcoholic extract acts as an antifungal against *Alternaria* sp and *Fusarium* sp. isolated from the same plant of *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa).

Keywords: *Chenopodium quinoa* Willd, quinoa, saponins, extraction, optimization, isolation, inhibition, antifungal, *Alternaria* sp., *Fusarium* sp.



# INTRODUCCIÓN

Las saponinas provenientes del griego Sapo que significa jabón, son glucosidos que se localizan en muchas especies vegetales que cumplen una función específica, como de protección de la planta; en muchos casos se le dio un uso de materia prima para producir jabones.<sup>1</sup> Son glucosidos en las que unidades de monosacáridos se enlazan mediante enlace glicosídico a un aglicón o sapogenina. El aglicón normalmente es triterpenico.<sup>2</sup>

Las saponinas en *Chenopodium quinoa* Willd son consideradas como un componente de la planta por conferirle un mal sabor al producto final de la planta<sup>3</sup>; se realizaron estudios de ingeniería genética con el fin de eliminar este problema para agilizar la cadena de producción de la quinua y evitar ese mal sabor deseado; comúnmente se lleva a cabo el proceso de desaponificación de la quinua que incluyen varias vías de extracción de saponinas y así obtener un producto final como los granos de quinua que sean agradables al gusto.<sup>3-5</sup>

Las saponinas son consideradas defensas de la planta, así como también los glucosidos cianogénicos y los ácidos hidroxámicos cíclicos lo cual no sucede con las fitoalexinas que estas son defensas inducidas. Las saponinas con cadenas de azúcares unidas al carbono -3 posee actividad antimicrobiana.<sup>6,7</sup> La actividad depende fundamentalmente de cómo se ramifica los azúcares, ya que cuando la saponina pierde un azúcar terminal pierde por completo la actividad antimicrobiana porque la cadena de azúcares queda linearizada.<sup>7,8,9</sup>

Bauman hizo un estudio al respecto, preparó membranas lipídicas artificiales y las colocó en presencia de las saponinas, las membranas mostraron grandes poros. Por lo tanto, concluyó que las saponinas alteran la permeabilidad de las membranas para luego ser lisadas.<sup>10</sup>

Normalmente los cultivos de plantas de quinua son atacados por plagas y enfermedades, los principales causantes de su marchitez y baja producción son los hongos.<sup>5</sup> El hecho que las enfermedades de las plantas no se presenten en grandes cantidades hace que se le reste la

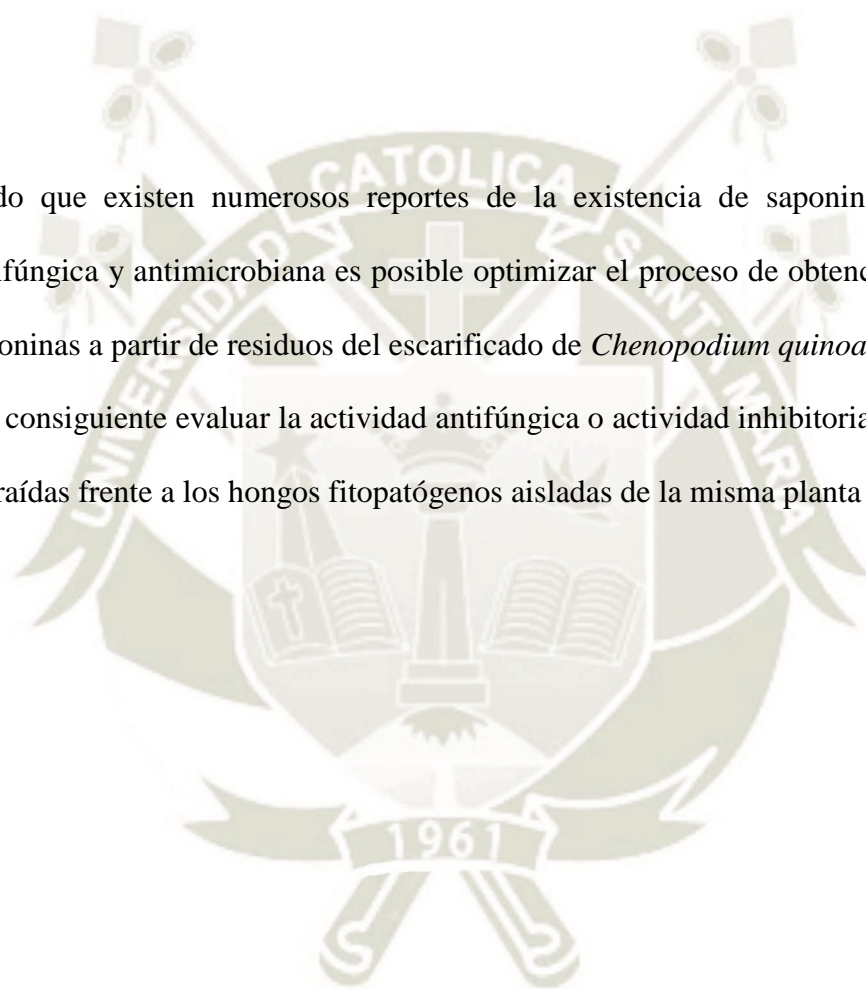
importancia que merece lo cual hace que un cultivo pierda ese potencial agronómico que se le puede conferir por el bajo rendimiento que una pequeña enfermedad puede producir.<sup>11,12</sup> Antiguamente el cultivo de quinua era rentable, sin usar muchos fertilizantes o pesticidas debido a que es una planta que se puede adaptar a diferentes pisos climáticos, además de tener un alto valor nutricional; pero hay enfermedades que comúnmente atacan a los cultivos como el mildiu (*Peronospora farinosa*), podredumbre marron del tallo (*Phoma exigua var fobeata*), mancha foliar (*achomycota hyalapospor*), mancha ojival del tallo (*Phoma sp.*), además de plagas de insectos como cortadores de plantas o gusanos de tierra o de follaje y granos.<sup>12-14</sup>

Los únicos datos recopilados de varios estudios que se tienen para combatir la principal enfermedad que ataca a la quinua “mildiu” es el mejoramiento genético de las variedades de la quinua. Actualmente se está investigando otras alternativas para el tratamiento de estas enfermedades y se quiere evitar el consumo excesivo de pesticidas, es por eso que se lleva a cabo la necesidad de elaborar biocontroladores de estas enfermedades.<sup>12,15</sup> El uso de biocontroladores para la planta de quinua es reciente, poco a poco en otros países se está llevando a cabo este tipo de control para así poder darle un mayor valor agregado al producto final y aprovechar el desecho que se tiene cuando se extrae el grano de la quinua.<sup>16</sup>

Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo investigar las variables optimas de extracción de saponinas y la actividad antifungica de ésta última con la finalidad de encontrar una alternativa más fácil y económica como biocontroladores de hongos fitopatogeno.

# HIPÓTESIS

Dado que existen numerosos reportes de la existencia de saponinas con actividad antifúngica y antimicrobiana es posible optimizar el proceso de obtención de crudos de saponinas a partir de residuos del escarificado de *Chenopodium quinoa* Willd (quinua) y por consiguiente evaluar la actividad antifúngica o actividad inhibitoria de las saponinas extraídas frente a los hongos fitopatógenos aisladas de la misma planta de quinua.



# OBJETIVOS

## 1. OBJETIVOS GENERALES

Optimización del proceso de obtención de saponinas a partir de residuos del escarificado de *Chenopodium quinoa* Willdenow (quinua) y la evaluación antifúngica *in vitro* de hongos fitopatógenos de la misma.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar el proceso de obtención de crudo de saponinas a partir de residuos del escarificado de *Chenopodium quinoa* Willd (quinua)
- Determinar el rendimiento de extracción del crudo de saponinas
- Determinar el contenido de saponinas obtenidas mediante el método cualitativo y el método cuantitativo.
- Aislar, caracterizar e identificar hongos fitopatógenos de la misma planta de *Chenopodium quinoa* Willd (quinua)
- Evaluar la actividad antifúngica o el efecto inhibitorio de las saponinas obtenidas para el control de hongos fitopatógenos aislados de *Chenopodium quinoa* Willd (quinua).

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. *Chenopodium quinoa* Willd (quinua)

#### 1.1.1. Descripción botánica

La quinua al ser una planta ginomonoica tiene flores tanto masculinas como femeninas; es una especie que puede sembrarse todo el año a cualquier ambiente; la altura promedio a la que se desarrollan varía desde los 0.5 a 3 metros, dependiendo de los factores climatológicos presenta ramificaciones y la mayoría de especies debido a la coloración de hojas durante su madurez presenta pigmentos betacianicos.<sup>17,18,4</sup> Al crecer el tallo es cilíndrico cerca al suelo, se mantiene así en la etapa de la madurez; el tallo va cambiando dependiendo del ecotipo pero por lo general se vuelve angular a la altura de donde inicia las ramificaciones y también de donde salen las hojas; el diámetro varía de 1 a 9 centímetros, también dependiendo de la variedad genética que se cultiva; su corteza es maciza y compacta, al desarrollarse por completo la médula desaparece para que en el momento de la cosecha solo quede un tallo de apariencia esponjosa, el cual se puede aprovechar para la fabricación de cartón o papel debido al alto contenido de celulosa que posee.<sup>19</sup> El periodo vegetativo varía según la variedad, va desde los 80 a 200 días, además de ser la variedad un factor, también interviene el factor climático, el tipo de tierra, humedad, altura a la que crece la especie.<sup>20,21</sup>

En una planta, las hojas pueden ser grandes y pequeñas siendo las grandes muy cercanas a la base de forma triangular y las pequeñas crecen en la parte superior de la planta; presentan tres nervaduras con ápice redondeado, de un grosor considerable, la gran variedad hace que la morfología de sus hojas sean motivo de estudio debido a su

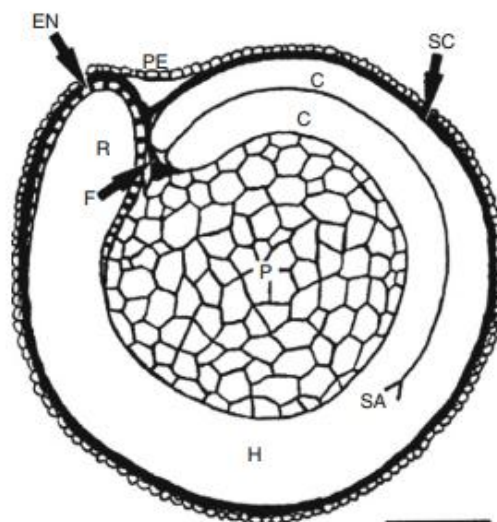
coloración pasando por verde a rojo, o amarillo a violeta.<sup>4,22</sup> En el haz posee cristales de oxalato de calcio, esto hace que la hoja sea higroscópica, es por ello que crecen en ambientes de poca humedad haciendo que la película que cubre la hoja retenga el agua y así evite su pérdida. La inflorescencia de la quinua es también una panícula o también llamada panoja, esto significa que forman racimos y estas a su vez se ramifican de nuevo siendo glomeruladas con pedicelo muy cortos, normalmente asociados al rendimiento del cultivo, según los estudios de Mujica en el 2001. El rendimiento del cultivo puede llegar hasta los 250 g de granos por panoja.<sup>4,23,24</sup> El fruto está cubierto por el perigonio con un pericarpio de color blanquecino, ocre o rojo ladrillo según la variedad y va tomando el color durante su desarrollo. Tiene forma lenticular o esferoidal, formada por la envoltura del fruto o pericarpio que envuelve a la semilla, a su vez es ahí donde se encuentra la saponina.<sup>17,23,25</sup> La semilla tiene un diámetro de hasta 4 milímetros y presenta epispermo, embrión y perisperma.<sup>23</sup>

El embrión desarrolla hasta un 30% de la semilla compuesto de dos cotiledones; como se aprecia en la Figura 1. El tejido de almacenamiento es de color blanquecino y representa al perisperma que mayormente está constituido de almidón y al mismo tiempo contiene casi el 9% de la proteína total del grano. Antes del procesamiento de la quinua, el espesor del grano puede llegar a variar desde las 20  $\mu\text{m}$  en el centro del grano y hasta los 90  $\mu\text{m}$  en el extremo.<sup>23,26,27,28</sup>

### **1.1.2. Origen y distribución geográfica**

Con antecedentes importantes que datan desde la cultura inca, la quinua es una especie nativa considerada como origen de otras especies, siendo domesticadas y cultivadas a lo largo del tiempo por diversas culturas a diferentes estratos. Como especie importante fue considerada el alimento fundamental dentro de las culturas andinas en Sudamérica,

además de la distribución de la especie en muchas zonas agroecológicas y por su valor nutritivo.<sup>4</sup>



**Figura 1.** Sección longitudinal media de una semilla de quinua<sup>20</sup>

PE: Pericarpio, SC: cubierta de la semilla, EN: endospermo; C: cotiledones, H: hipocótilo; SA: ápice del meristemo; R: radícula, P: perisperma; F: funículo

La quinua puede sembrarse y cosecharse a nivel del mar y también por encima de los tres mil metros de altura; por su capacidad adaptativa es que puede crecer en lugares muy húmedos y áridos.<sup>18</sup> Considerado pseudocereal – no gramínea – de hoja ancha, su importancia se basa por las cualidades nutricionales que presenta especialmente porque no presenta gluten, su alto índice biológico y nutricional hacen que aun sea importante en comunidades quechua.<sup>17,22,26</sup> En botánica la quinua pertenece a la clase de las dicotiledóneas, perteneciente a la familia *Chenopodium*, dentro del género *quinoa*. El nombre completo que se le da a la quinua es *Chenopodium quinoa* Willd; se debe enfatizar que incluye la abreviatura del autor Carl Ludwig Willdenow.<sup>19,23,29</sup>

Son más de 250 especies de quinua los que se cultivan alrededor del mundo.<sup>30</sup> En la antigüedad las culturas que la domesticaron obtuvieron una gran variedad para diferentes

tipos de aporte nutricional, por ejemplo, hay especies que resisten a tierras con mucha salinidad y esas especies adaptadas son las Utasaya, o aquellas que resisten la sequía son de la variedad Kancolla, en aquellas áreas con exceso de humedad es mucho mejor cultivar la especie Cheweca.<sup>17,19,23,24,26</sup> Las condiciones ambientales son muy importantes para las adaptaciones de las especies con el fin de incrementar el rendimiento de los granos durante la cosecha o aumentar el contenido de proteínas, vitaminas y minerales.<sup>25,31</sup>

La tendencia del cultivo y consumo de la quinua se extendió hasta los continentes de Asia y Europa; la importancia que se le dio a este grano por su valor nutricional hizo que dichos continentes se dedicaran a su estudio en diversas áreas, desde su germinación hasta el fruto. Se crearon bancos de germoplasma donde se atesoran las diferentes especies clasificándolas tanto por su valor nutricional y otras propiedades como cicatrizantes, desinfectantes y analgésicas. Tanto en Alemania como en Japón lideran los estudios sobre quinua y su adaptabilidad. La planta en si tiene un valor agregado ya que en diversos estudios se llegó a elaborar pienso para animales mediante la desaponificación de la cascarilla de la quinua que se produce durante su procesamiento, según esto se le da un elevado potencial económico, además de que diversos estudios en Perú afirman que las hojas de la quinua tienen alto contenido de proteínas mucho más que la espinaca.<sup>28,32,33</sup>

Cuando se habla de su variedad genética se menciona la capacidad de supervivencia de la planta. Está bastante ligada a la zona agrícola, al tipo de tierra en donde se siembra – altas, bajas, saladas, interandinas – es por esto que los bancos de germoplasma, situados en diversas partes del mundo son importantes para la conservación de la variedad genética.<sup>29,34,35</sup> Tanto en Perú como en Bolivia, Chile, Argentina y Estados Unidos, Hungría, Canadá, Japón y Kenia lideran las investigaciones sobre su variedad genética y la adaptabilidad.<sup>4,17-19,22,23,26,27</sup> A esto último agregar que pueden crecer en ambientes

donde su humedad puede llegar hasta un 90% y soportar climas extremos fríos y muy cálidos.<sup>23</sup> La capacidad de adaptarse a los ecosistemas donde se cultiva hace que pueda crecer en humedad que van desde el 30% hasta el 90% y que pueda soportar temperaturas desde los -5 °C hasta los 40 °C; es eficiente en cuanto a rendimiento, puede sobrevivir en escasez de humedad, y a la alta salinidad que puede presentar un suelo.<sup>25</sup>

### 1.1.3. Aspectos nutricionales y químicos

Las proteínas reportadas en muchos documentos para los granos de quinua varían desde el 12 al 23%.<sup>34,36,37</sup> Comparado con otros granos como se muestra en la Tabla 1, el arroz, la cebada o el maíz, los granos de quinua tienen un 16.3% de proteínas en base seca, a diferencia de la cebada que tiene un 11%; el arroz un 7.5% o el maíz un 1.4%; solo el trigo se puede comparar con la quinua ya que el trigo tiene un 15.4% de proteínas.<sup>28,37</sup>

**Tabla 1.** Aminoácidos de semillas de quinua, cebada, soja y trigo.<sup>41</sup>

	Semilla de quinua	Cebada perlada	Semilla de soja	Trigo duro
Aminoácidos	mg/g proteína			
<b>Arginina</b>	77.3	50.1	69.5	83.4
<b>Ácido aspártico</b>	80.3	62.5	136.3	94
<b>Cisteína</b>	14.4	22.1	12.1	20.5
<b>Glicina</b>	49.2	36.2	38.6	45.5
<b>Ácido glutámico</b>	132.1	261.2	151	195.1
<b>Histidina</b>	28.8	22.5	26.7	23.5
<b>Isoleucina</b>	35.7	36.5	44.5	43.2
<b>Leucina</b>	59.5	98.2	72	82.8
<b>Lisina</b>	54.2	37.2	57.8	36.2
<b>Metionina</b>	21.8	19.2	10.6	23.5
<b>Fenilalanina</b>	42	56.1	49.2	53.5
<b>Serina</b>	40.2	42.2	50	52.6
<b>Treonina</b>	29.8	34	38.6	35.8
<b>Triptófano</b>	11.8	16.6	12.2	11.5
<b>Tirosina</b>	18.9	28.7	36.2	33.4
<b>Valina</b>	42.1	49	47.6	61.1
<b>Alanina</b>	41.6	39	42.2	58

Como pseudocereal, no contiene gluten, tiene alto contenido de ácidos grasos insaturados; como se observa en la Tabla 2, posee una gran cantidad de carbohidratos y proteínas; también posee alto contenido nutricional de ácido linoleico con 50.2 a 56.1%, ácido oleico con 22.0 a 24.5% y linolénico con un porcentaje menor de 5.4 a 7%<sup>32,33,37</sup>

**Tabla 2.** Composición aproximada de la semilla de quinua<sup>42</sup>

<b>Composición química</b>		
<b>Contenido en 100 g de quinua</b>		
<b>Elemento</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidad</b>
<b>Agua</b>	12.00	%
<b>Proteínas</b>	10.70	%
<b>Grasas</b>	5.70	%
<b>Carbohidratos</b>	69.29	%
<b>Cenizas</b>	3.20	%
<b>Celulosa</b>	4.30	%

## 1.2. SAPONINAS

### 1.2.1. Generalidades

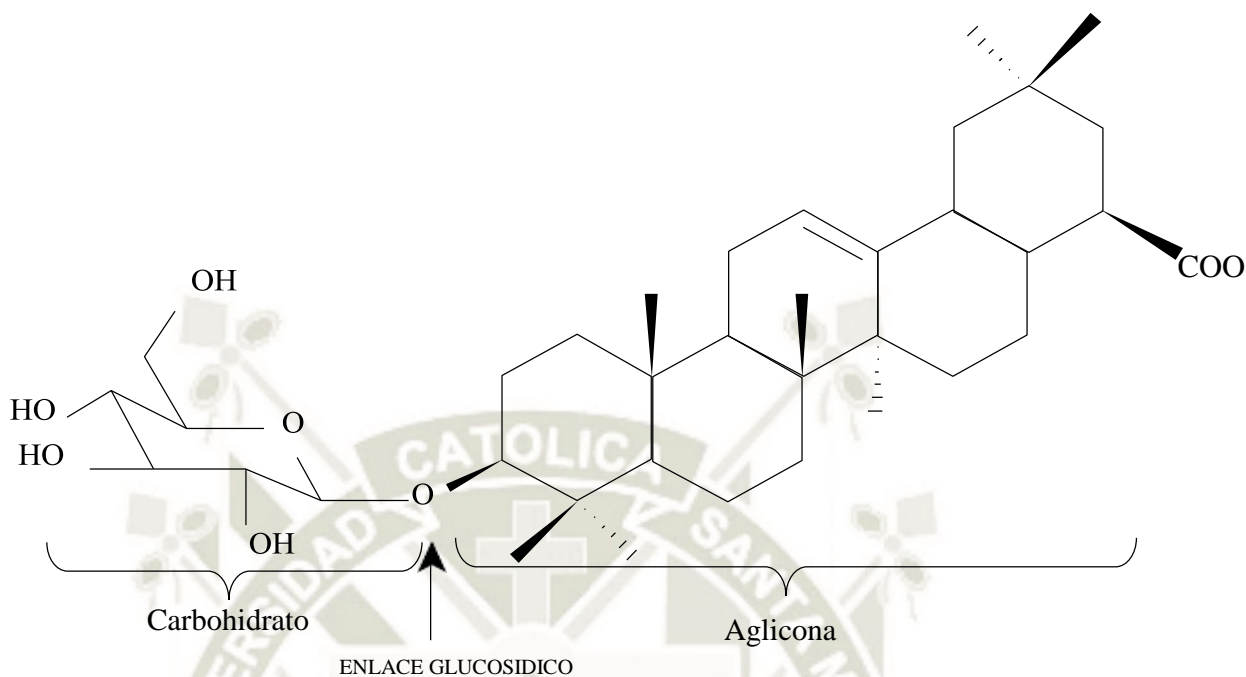
Son un tipo de metabolito secundario que está dentro de un gran grupo de heterósidos, tienen características espumantes o tensio-activas, es decir, se diluyen en agua y forman compuestos espumantes. Consiste en agliconas policíclicas que están unidas a una o

varias cadenas de azúcares como se muestra en la Figura 2.<sup>38</sup> La aglicona la cual es llamada sapogenina o genina puede derivar en grupos según su naturaleza como en esteroideas o triterpénicas y según Marston existe otra categoría en la que son heterósidos con aminos esteroídicas. La diferencia entre las geninas esteroídicas y las triterpénicas es que las primeras están formadas por un esqueleto de 27 átomos de carbono, comúnmente con 6 ciclos uno furánico (E) y otro piránico (F) lo cual significa que es consecuencia de una cetilización después de una oxidación en el carbono a partir de un precursor colestánico; en cambio, las geninas triterpénicas vienen de la ciclación a partir de la vía del escualeno, además de poseer un elevado peso molecular, se caracterizan por una oxidación de los metilos bastante común en los carbonos 28 o 30.<sup>39</sup>

La capacidad tensio-activa o de formar espuma es causada por la combinación de una genina hidrofóbica y un azúcar hidrofílico. También se caracterizan de darle un sabor amargo a los granos que lo contienen; a su vez son muy tóxicas y son llamadas sapotoxinas.<sup>40</sup> Se clasifican según el número de posiciones de sustitución de azúcares en monodesmosídicas en la que el azúcar o azúcares se unen a una única posición a la aglicona y las bidesmosídicas se unen por dos puntos a la aglicona; estas últimas son las más frecuentes y cuando se hidrolizan se vuelven monodesmosídicas.

Son glucósidos como se demuestra en la Figura 2, la parte del azúcar corresponde al extremo hidrofílico y según la estructura esteroidea poseen cuatro anillos; las saponinas triterpénicas poseen cinco anillos y ambos comparten el mismo origen biosintético que es la vía del ácido mevalónico;<sup>44</sup> otra diferencia es que las esteroideas están en las monocotiledóneas y las triterpénicas en las dicotiledóneas, las más comunes de estas últimas son los ginsenósidos que derivan del ginseng a pesar de que se observa una estructura esteroidea.<sup>43</sup> La quinua es un grano que tiene agliconas como ácido oleanólico, ácido fitocalagénico y hederagenina; al mismo tiempo son consumidas en otros alimentos

como las espinacas, la soya, espárragos y otras legumbres.<sup>2,45,21</sup>



**Figura 2.** Estructura general de una saponina.

### 1.2.2. Biosíntesis de saponinas

La mayoría de saponinas vienen de plantas angiospermas. La síntesis de saponinas se encuentra en muchas plantas, las cuales la mayoría son dicotiledóneas y normalmente se biosintetizan saponinas de tipo triterpénica; sin embargo, diversos estudios confirman que muchas plantas monocotiledóneas biosintetizan saponinas de tipo esteroidea. Las saponinas antes mencionadas están basadas en el tipo de estructura del esqueleto de la aglicona y es indispensable recalcar que de ello es que deriva la molécula de saponina; las saponinas triterpenoides derivan del 2,3-oxidoescualeno el cual tiene 30 carbonos; esto se aprecia en la Figura 3.<sup>46</sup>

El precursor de 30 carbonos pierde 3 grupos metilo para quedar con 27 carbonos formando la aglicona esteroidea y la genina triterpenoide se queda con 30 carbonos. Existen otros alcaloides esteroides que también se denominan saponinas, las cuales

también tienen el mismo origen que las esteroideas y al mismo tiempo posee un nitrógeno en la aglicona.<sup>46,47</sup> En la vía del mevalonato o también llamada vía de síntesis de isoprenos o isoprenoide, como se muestra en la Figura 3 en general se basa en la producción de dos bloques de 5 carbonos cada uno, pirofosfato de isopentenilo (IPP) y otro llamado pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Comienza con la condensación de dos moléculas de acetil CoA, para formar cetoacetil CoA luego da a lugar a una segunda condensación con otro acetil CoA; en lugar de que la enzima salga de la reacción sucede todo lo contrario y forma un alcohol, da lugar a una hidrólisis para luego formar un ácido carboxílico llamado HMG-CoA o 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA, el cual es importante en el proceso de biosíntesis de los terpenos.<sup>39,46,48</sup> Dando a lugar a la tercera fase ocurre una reducción en dos pasos: en la primera parte se reduce el tioéster al hemitioacetil mediante la reducción de NADPH, siendo ésta la primera reducción y en la segunda reducción actúa la enzima hidroximetilglutaril reductasa, la cual es muy importante ya que si se bloquea impide que se forme el ácido mevalónico que produce y es intermediario en la biosíntesis del colesterol; lo que hace la enzima es reducir el hemiacetal hasta formar el aldehído y de nuevo por acción de NADPH para reducir el aldehído hasta ácido carboxílico formando el ácido mevalónico que es precursor de biosíntesis de triterpenos y colesterol.<sup>40,46,48</sup> Pasando a la cuarta etapa, ocurre dos fosforilaciones consecutivas por la adición de ATP; la primera fosforilación se da en el ácido y la segunda fosforilación se da sobre el alcohol terciario, y favorece la descarboxilación para la producción de dos intermediarios; en medio de la reacción se produce una hidrólisis de OPP la cual da lugar a isopentenil pirofosato (IPP) la cual se dimeriza para formar DMAPP.<sup>39,43</sup> Posteriormente se condensan dos unidades de isopentenil pirofosato (IPP) con una unidad de DMAPP dando como resultado pirofosfato de farnesilo (FPP) que tiene 15 carbonos el cual es imprescindible debido a que es el precursor de las saponinas. Por

último, la enzima escualeno sintasa condensa dos moléculas de pirofosfato de farnesilo y da como producto el escualeno que tiene una estructura lineal de 30 carbonos el cual se epoxida a 2,3-oxidoescualeno por una enzima escualeno epoxidasa.<sup>44,47</sup> El 2,3-oxidoescualeno se cicla a estructuras policíclicas por ciclasas y esto hace que en las plantas superiores sea el punto de partida para el metabolismo especializado del triterpeno.<sup>47</sup>

Continuando con la vía de ciclación del 2,3-oxidoescualeno da a lugar al cicloartenol el cual es precursor inmediato del colesterol y de algunas agliconas esteroideas. Los productos de ciclación del 2,3-oxidoescualeno son precursores inmediatos de triterpenos específicos en los que involucra la reorganización del carbono el cual sirve como base a la variedad estructural de agliconas de saponinas triterpénicas. En las Figuras 4, 5, 6 y 7 muestran a ocho tipos principales de estructuras triterpénicas los cuales han sido documentadas en diversos estudios por las plantas de quinua.<sup>43,44,49,50</sup> Para seguir con su variedad, las agliconas triterpénicas se oxidan por unas monooxigenasas dependientes del P450s, dando luego a otras agliconas mucho más complejas y aumenta la diversidad de la estructura de las geninas.<sup>51</sup>

### 1.2.3. Distribución en las plantas

Los oleananos son una clase de triterpenos importantes y más común para la biosíntesis de saponinas triterpenoides. La presencia de triterpenos en plantas hablan de un papel dentro de la biosíntesis de saponinas. Tanto en las membranas de las plantas, además de las funciones que pueden tener como señalización aun en estudios y pueden tener estructuras similares con esteroides.<sup>49</sup> Como anteriormente fue descrito, el contenido de saponinas en plantas está definido por diversos factores, los cuales, al acumularse en tejidos y órganos, sugieren una intervención de funciones biológicas diversas.<sup>44</sup> En

diferentes estudios se encontraron diferentes tipos de saponinas, en tallos, hojas, semillas, flores y frutos.

Al mismo tiempo también encontraron en raíces como el ginseng (*P. ginseng*), los ginsenósidos están más en el floema que en el xilema, también en la parénquima de la raíz.<sup>45</sup> Las saikosaponinas normalmente se encuentran en el floema primario y en raíces de *Bupleurum*. La avenacina A-1 comunmente se acumula en las puntas de las raíces, pero también en otros órganos de la planta como en hojas; también existen saponinas en la centella asiática, en las semillas del tomate y en la planta de quinua.<sup>51,52,53</sup>

#### 1.2.4. Saponinas en la planta de quinua

La quinua tiene una cantidad determinada de saponinas; de acuerdo a la variedad genética varía entre 0.1 y el 5%.<sup>54</sup> Existe una clasificación según la cantidad de saponinas en la planta y se divide entre dulce y amarga; es considerada un anti nutriente muy a pesar de tener bastantes beneficios farmacológicos y biológicos. En caso de las saponinas de la quinua; es un medio de defensa de la planta, tiene una actividad antimicrobiana y anti fúngica que hace daño a la membrana de los hongos al conectar esteroides de las membranas.<sup>55,56</sup> Se han usado en muchos medicamentos para tratar diversas enfermedades. Además de poseer propiedades farmacéuticas aún puede tener mucho más potencial para más medicamentos.<sup>41,43</sup>

Las saponinas tienen propiedades farmacéuticas, además, todas las demás saponinas vegetales que aún no se han descubierto, pueden ser un potencial crucial para nuevos medicamentos.<sup>17,23</sup> Para estudiar a las saponinas y su estructura se utiliza la resonancia magnética nuclear de 1D y 2D;<sup>56</sup> se obtuvo resultados de *Chenopodium quinoa* Willd a partir de raíces, hojas y frutos y compuestos como el ácido  $3\beta$ -[(*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil)oxy]-23-oxo-olean-12-en-28-oico  $\beta$ -D-

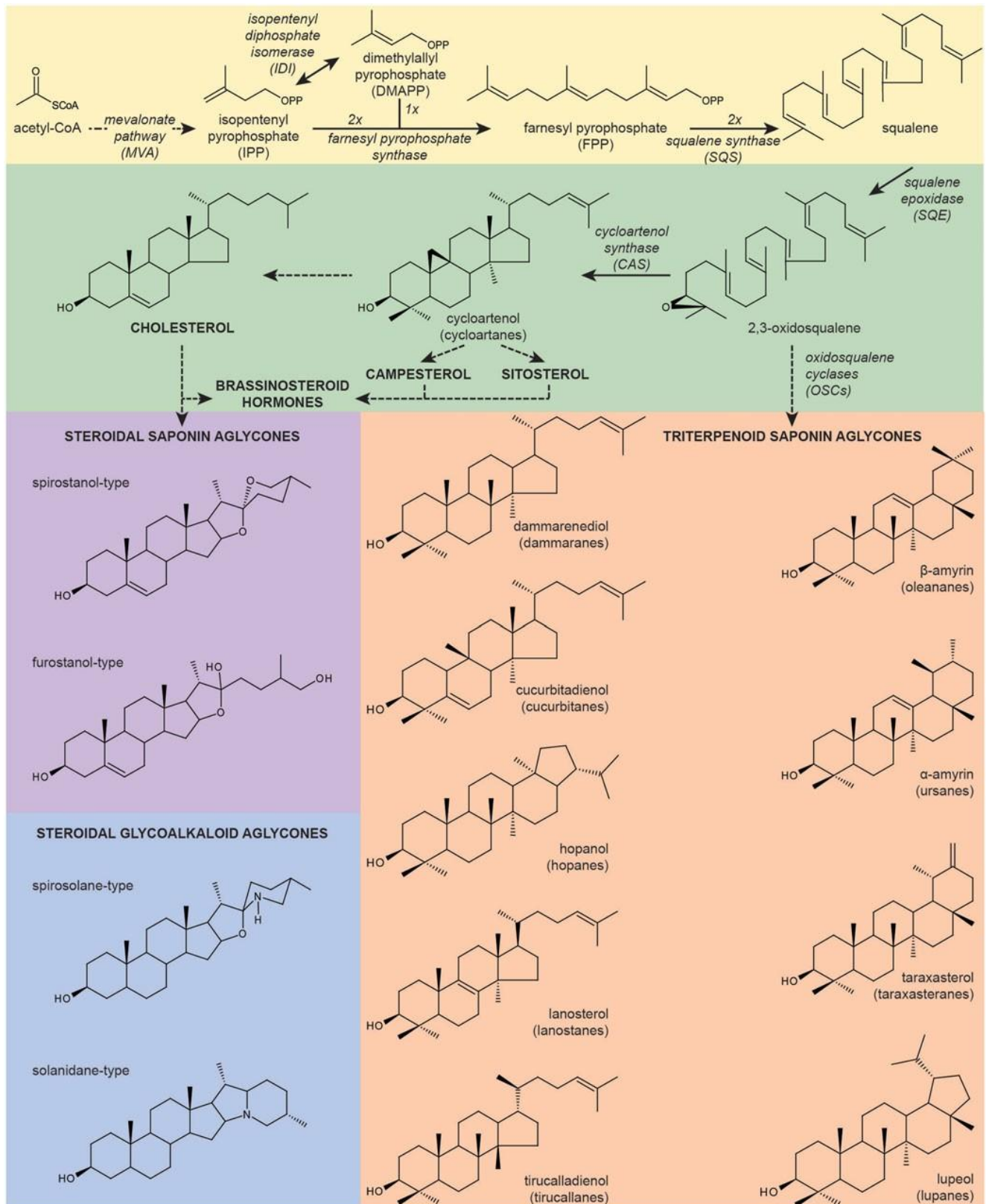
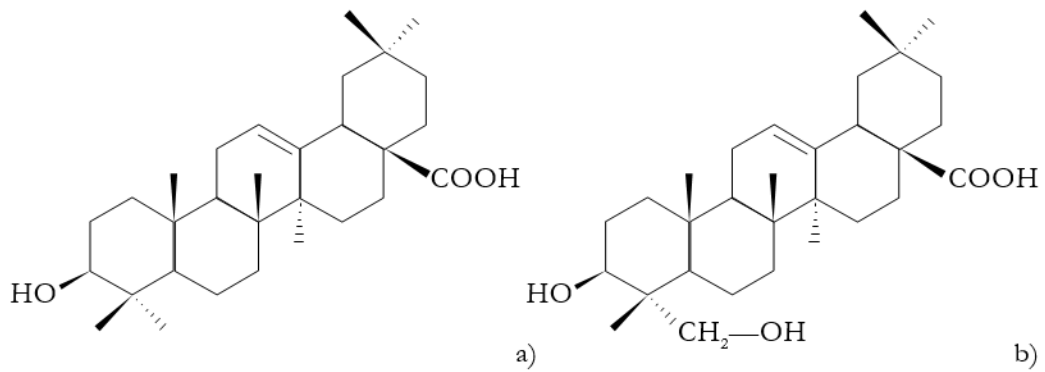
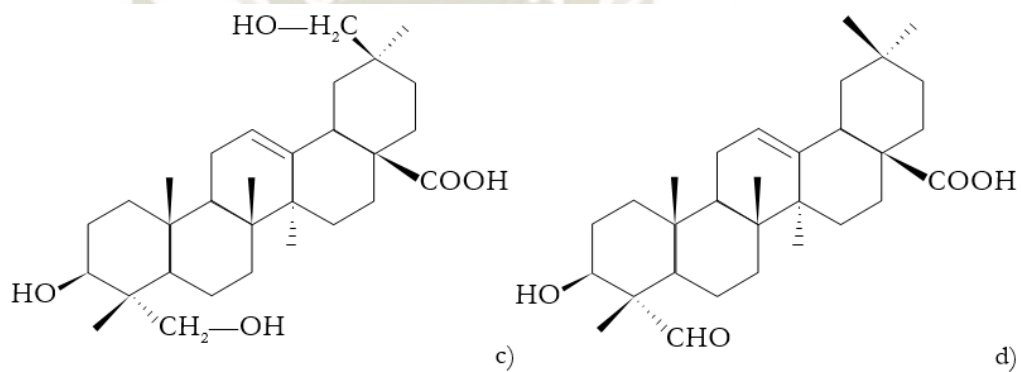


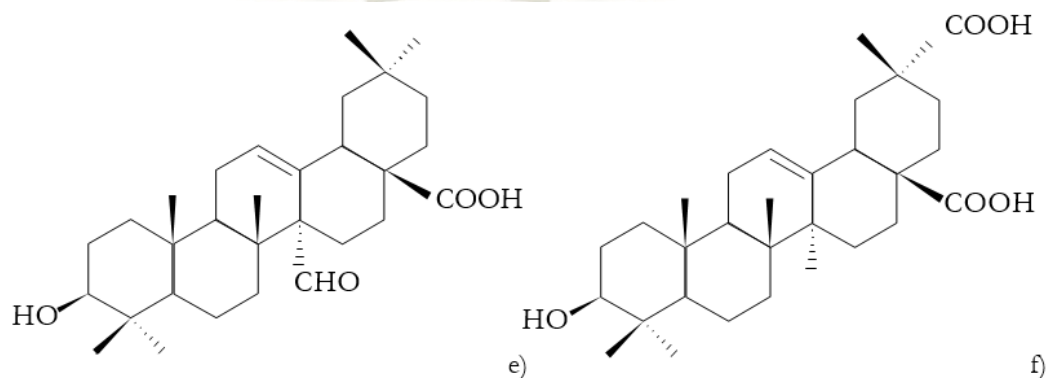
Figura 3. Biosíntesis de la diversidad estructural en agliconas de saponinas<sup>36</sup>



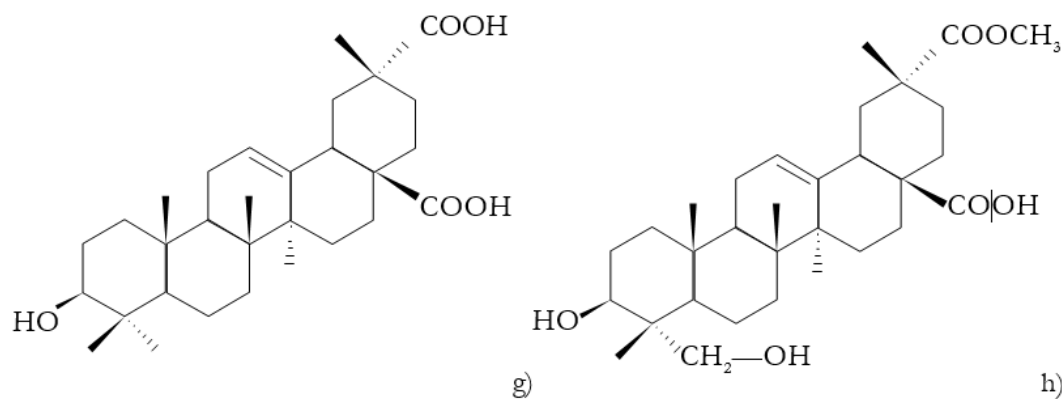
**Figura 4.** Estructuras de agliconas de saponinas en quinua: **a)** ácido oleanólico **b)** hederagenina



**Figura 5.** Estructuras de agliconas de saponinas en quinua: **c)** ácido 3 $\beta$ ,23,30-trihidroxi olean-12-eno-28-oico **d)** gipsogenina



**Figura 6.** Estructuras de agliconas de saponinas en quinua: **e)** ácido 3 $\beta$ -hidroxi-27-oxolean-12-eno-28-oico; **f)** ácido espergulagénico



**Figura 7.** Estructuras de agliconas de saponinas en quinua: **g)** ácido serjanico  
**h)** ácido fitolacagénico.

glucopiranosido, ácido  $3\beta$ -[(*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil)oxy]-27-oxo-olean-12-en-28-oico  $\alpha$ -D-glucopiranosido, ácido 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopiranosil serjanico 28-*O*- $\alpha$ -D-glucopiranosil ester, y ácido 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopiranosil serjanico 28-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil ester; estos han sido motivos de estudio por encontrarse en la mayoría de especies de quinua. También el ácido oleanólico, gipsogenina, hederagenina y ácido fitolacagénico han sido encontrados en *Chenopodium quinoa* Willd.<sup>11,25,54,57,58</sup> En la Tabla 3 se indica el tipo de saponinas; donde se encuentra en la planta de quinua y el tipo de aglicona que está presente; esto está asociado a las Figuras 4, 5, 6 y 7. Como anteriormente se ha citado, las saponinas no solo corresponden a la semilla o la cáscara, sino a la planta en general cambiando las agliconas como se aprecia en la Tabla 3.<sup>59</sup> Diversos estudios confirmaron que las saponinas empiezan a biosintetizarse desde el brote; dependiendo de su desarrollo va aumentando en la planta; las saponinas actúan como medio de defensa contra las plagas. En caso de la quinua, las semillas son las que contienen más cantidad de saponinas quizás el 70%, las hojas y el tallo son las siguientes en contener saponinas y también influencia bastante el tipo de quinua que se cultiva; en la bibliografía sugiere que la variedad dulce posee menor cantidad de saponinas.<sup>20,25,60</sup> Por ejemplo, en Argentina la variedad que

mayormente se siembra y se cosecha es la Sajama; a diferencia de la quinua Real que contiene mayor cantidad de saponinas en la cascara, en Perú la quinua Amarilla de Maranganí es la que posee mayor cantidad de saponinas. Es importante mencionar que se están haciendo diversos estudios en otros países como China y Dinamarca que están obteniendo granos con bajo contenido de saponinas en la cáscara y por sobre todo en el grano para tener un producto más limpio.<sup>41</sup>

**Tabla 3.** Estructuras de saponinas en *Chenopodium quinoa* Willd<sup>50</sup>

Compuesto	Localización	Aglicona	Sustituyente	Referencia
1	Fl, F, S, C	a	3-Glc-(1→2)-Ara, 28-Glc	44
2	S	f	3-Glc-(1→2)-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc	47
3	S	f	3-Glc-(1→2)-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc	47
4	S	g	3-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc	47
5	S	a	3-GlcA	49
6	S	h	3-Ara-(1→3)-GlcA, 28-Glc	47
7	Fl, F, S, C	a	3-GlcA, 28-Glc	44
8	S	h	3-Glc-(1→3)-Ara	43, 49
9	Fl, F, S, C	a	3-Glc-(1→2)-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc	49
10	S	h	3-Gal-(1→3)-Glc, 28-Glc	49
11	Fl, F, S, C	a	3-Xyl-(1→3)-GlcA, 28-Glc	43
12	S	b	3-Xyl-(1→3)-GlcA, 28-Glc	56
13	Fl, F, S, C	b	3-Ara	44
14	Fl, F, S, C	b	3-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc	43, 49, 61
15	S	b	3-Glc-(1→4)-Glc-(1→4)-Glc, 28-Glc	47
16	Fl, F, S, C	b	3-GlcA, 28-Glc	63
17	S	b	3-Gal-(1→3)-Glc, 28-Glc	49
15	Fl, F, S, C	e	3-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc	44
18	Fl, F, S, C	b	3-Glc-(1→3)-Gal, 28-Glc	44, 61
19	Fl, F, S, C	c	3-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc	63
20	Fl, F, S, C	d	3-Glc-(1→3)-Ara, 28-Glc	44

Fl: flor; F: fruto; S: semilla; C: cáscara

Agliconas: a) ácido oleanólico; b) hederagenina; c) ácido  $3\beta,23,30$ -trihidroxi olean-12-eno-28-oico; d) gipsogenina; e) ácido  $3\beta$ -hidroxi-27-oxoolean-12-eno-28-oico; f) ácido espergulagénico; g) ácido serjanico; h) ácido fitolacagénico.

### 1.2.5. Procesamiento de la quinua para obtención de saponinas

Según Jacobsen, cuando se procesan los granos de quinua la eliminación de saponinas es importante dentro del proceso, para el cual se realizan procesos húmedos o secos; también hay empresas que cuando procesan la quinua usan ambos métodos combinados.<sup>2,28,61</sup> Tanto los campesinos como las amas de casa usan el método húmedo en lo que realizan lavado tras lavado de los granos de quinua para eliminar el epispermo por fricción y retirar las saponinas del alimento. A escala industrial se realiza el método seco, la desventaja es el alto costo del secado de la semilla y la formación de espuma.<sup>43,47,48,50,62</sup> El proceso seco es un pulido, desgastando las semillas entre si y contra paredes rugosas para quitar la capa donde se encuentra las saponinas luego al frotarlas contra los tamices se va eliminando de a poco los residuos y el polvillo de saponina.<sup>58</sup>

### 1.2.6. Efectos biológicos de las saponinas de quinua

La investigación de la bioactividad viene de la extracción y el aislamiento de las saponinas las cuales en diversos estudios que se llevaron a cabo evalúan si la estructura de la saponina tiene que ver con la actividad biológica.<sup>64,65</sup> Las saponinas tienen la capacidad de romper la membrana de los eritrocitos, a su vez causan la liberación de la hemoglobina (visto en estudios *in vitro*), es la propiedad que más investigaciones genera; pero hay un problema, aun no se relaciona correctamente con alguna saponina dentro de todo el grupo que existe en la naturaleza.<sup>56</sup> También se ha visto que las saponinas son tóxicas en insectos<sup>65</sup> y moluscos<sup>66,67</sup>, sirve como producto piscicida; su capacidad anti fúngica y antimicrobiana es notable; la actividad biológica se observa en la Tabla 4.<sup>49,15,70</sup>

Son tóxicas en animales de sangre fría y también de sangre caliente dependiendo de como se administre, de donde proviene, que contiene y cuál es su concentración.<sup>20,23,54,68</sup>

La toxicidad es menor cuando es por vía oral, en cambio cuando es por vía intravenosa es altamente tóxica.<sup>15</sup> Estas últimas conclusiones se evaluaron previamente en ratones, conejos y ratas que por vía oral son menos tóxicas ya que se hidrolizan al ser ingeridas por la acción de diversas enzimas.<sup>1,52,71</sup>

### **1.2.7. Aplicaciones comerciales**

Por sus propiedades biológicas, las saponinas se han convertido en principales ingredientes en la industria cosmética y alimentario, sobre todo en el procesamiento de pienso para animales; también en el sector farmacéutico debido a las propiedades fisicoquímicas que posee. El mercado ha estado creciendo en base a la tendencia del uso y aplicación de productos naturales y orgánicos es por eso que las saponinas han ido encajando perfectamente dentro de las aplicaciones de limpieza por su poder detergente; también como agentes emulsionantes y espumantes. En el sector farmacéutico tiene muchas aplicaciones como adyuvantes inmunológicos y por sobre todo es importante en la producción de hormonas.<sup>50</sup>

### **1.2.8. Actividad antifúngica**

Las plantas siempre desarrollan por si solos mecanismos de defensa contra patógenos, lo hicieron desde mucho antes que el hombre interviniera. Además de las saponinas, las plantas sintetizan muchos metabolitos secundarios que sirven para protegerlas de hongos y bacterias, también de insectos y demás plagas; uno de los principales problemas es que los hongos desencadenan una serie de eventos a lo largo del crecimiento de la planta como la inhibición de la germinación si es que atacan a nivel del brote; las saponinas y demás metabolitos secundarios se encargan tanto de inhibir o detener el crecimiento de los

hongos, del micelio o la esporulación en las plantas; por ejemplo se ha realizado varios estudios sobre los polifenoles que producen las plantas y se vio que estos son altamente tóxicos cuando entran en contacto con algunos microorganismos.<sup>15</sup>

Otros estudios realizados con *Candida albicans* obtuvieron resultados satisfactorios debido a que las saponinas o crudos de saponinas bloquearon su desarrollo a una velocidad de 45 µg/mL. Hay investigaciones que también estudiaron la integridad de la membrana de los hongos frente a las saponinas y como resultados obtuvieron que las membranas sufrieron una ruptura al ser tratadas con saponinas con un tipo de tratamiento alcalino, con esto se puede inferir que las saponinas hacen que exista mayor afinidad con los esteroides en las membranas de las células.

Estos estudios y otros más, ayudan a la investigación del tipo de saponinas y su respuesta frente a agentes microbianos y fungales; ya sea, monodesmosídicas o bidesmosídicas, se evalúa si tienen un gran impacto independiente o sinérgico contra los microorganismos.<sup>46</sup>

### **1.3. Métodos de extracción de saponinas**

Existen muchos métodos convencionales para la extracción de analitos, dentro de uno de ellos es la extracción por Soxhlet, el cual tiene una gran cantidad de inconvenientes; la bibliografía refiere que son los métodos más largos en tiempo de extracción además de utilizar una gran cantidad de solventes orgánicos con resultados en rendimientos muy bajos al finalizar el proceso; la sonicación también pasa por ese mismo proceso, no se obtienen buenos resultados con este método. Otra técnica que se ha estado evaluando es la de los líquidos presurizados sobre todo en el área farmacéutica y extracción de fitoquímicos. Con estos métodos se pueden utilizar soluciones de bajo peso molecular o simplemente agua; también soluciones tensioactivas no iónicas; por ejemplo, con la solución de Triton X -100 se obtuvo resultados óptimos que con agua o alcohol.<sup>9</sup>

**Tabla 4.** Actividad biológica de las saponinas.<sup>39,64,72,73</sup>

<b>Actividad Biológica<sup>1</sup></b>		
Adyuvante	Anti fúngico	Antiparasitario
Adapto génico	Antigenotóxico	Anti exudativo
Analgésico	Efecto inhibitorio antihepatotóxico sobre la absorción de etanol	Antifeidal
Antialérgico	Antiinflamatorio	Antiobesidad
Antiespasmódico	Antitrombótico	Antiprotozoario
Antitusivo	Anti úlcera	Antipirético
Antiviral quimiopreventivo citotóxico diurético	Efecto sobre la absorción de minerales y vitaminas.	Antiflogístico
Expectorante	Efecto sobre el comportamiento cognitivo	Antipsoriático
Efecto sobre la amnesia inducida por etanol.	Efecto sobre la hiperactividad inducida por morfina / nicotina	Antimicrobiano
Efectos sobre la fermentación ruminal	Efecto sobre el crecimiento animal (deterioro del crecimiento), reproducción	Antimutágeno
Hipolesterolémica	Hipolesterolémica	Sedante
Hepolesterolemiantes	Efectos inmunoestimulantes.	Reducción de las concentraciones de amoniaco ruminal
Incrementa la permeabilidad de las células de la mucosa intestinal.	Inhibe el transporte activo de nutrientes.	Reducción de las muertes fetales en cerdos
Neuroprotector molusquicida	Reducción de la absorción de grasas.	

La PLE “pressurized liquid extraction” (extracción con líquido presurizado), se subdivide en ASE “extracción acelerada de solventes” cuando se utiliza solventes orgánicos y en PLPW “extracción a presión con agua a baja polaridad” cuando el solvente es agua. En ambos se trabaja en condiciones subcríticas.<sup>75</sup>

El aumento de la temperatura aumenta la capacidad de transferencias de masa al solvente por lo que se incrementa los coeficientes de difusión y además disminuye la polaridad del agua modificando la capacidad extractante del solvente.<sup>11</sup>

En estos últimos años se ha estado evaluando más técnicas de extracción variando las temperaturas y la presión a las que se someten las muestras con los respectivos analitos a determinar según Kaufmann.<sup>76</sup> Existen aún muchos más procesos de extracción de fitoquímicos como la extracción de fluidos supercríticos, también la extracción con agua subcrítica o con fluido presurizado. La desventaja de los procedimientos anteriormente citados se debe a la desnaturalización o hidrólisis de los analitos que provocan durante sus extracciones, ya sea por las condiciones de extracción o simplemente por los altos costos como lo es la extracción con fluidos supercríticos. La extracción de saponinas mediante maceración, percolación o reflujo, según estudios, dan mejores resultados como tiempos más cortos de extracción, menores consumos de disolvente o la reutilización del solvente y también mejores rendimientos de extracción, con buenas reproducibilidades. Las altas temperaturas ayudan a mejorar la difusividad del disolvente, resultando en un aumento de la velocidad de extracción.<sup>77</sup>

### **1.3.1. Extracción sólido - líquido**

La extracción sólido – líquido es un procedimiento de partición, más específica, de desintegración de por lo menos uno de los segmentos de una mezcla sólida en un fluido soluble. En realidad, el estado físico del componente a extraer de la materia prima no

siempre es sólido. El sistema de extracción sólido – líquido implica la entrada del solvente en el sólido, la disolución del sólido a extraer, el transporte (la difusión) de los solutos; la solubilización en algunos casos incluye cambios químicos por el solvente, por ejemplo, hidrólisis de biopolímeros insolubles que dan lugar a moléculas solubles.<sup>77,78</sup>

#### 1.4. Métodos de determinación de saponinas

La cromatografía es una de las tantas técnicas que se utilizan para la separación y la identificación dentro de una mezcla. El fundamento de esta técnica es que se divide en dos fases, una móvil y la otra estacionaria. El fundamento que se pueda aislar los metabolitos o analitos a analizar en una columna tubular donde se coloca un sólido poroso que sirva como la fase estacionaria y al mismo tiempo sirva de soporte para la fase móvil durante el proceso. Existen bastantes tipos de cromatografía para cada tipo de proceso que se requiera, por ejemplo, la cromatografía en columna se divide en cromatografía gaseosa, líquida, y de intercambio iónico, también por exclusión de tamaño; todas específicamente usadas para la identificación de algún componente dentro de una mezcla de compuestos químicos.<sup>66</sup>

Otros métodos de determinación de saponinas

- Ultravioleta: Las saponinas al no tener grupos cromóforos se les tiene que hacer reaccionar con algún reactivo para que puedan cuantificarse; los reactivos pueden ser como Lieberman – Burchard, Sulkowski y cloruro de antimonio.<sup>79</sup>
- Infrarrojo: el espectro de absorción de las saponinas es característico y por lo cual se puede identificar al hacerlos pasar por este método.
- Resonancia magnética nuclear: las saponinas esteroideas y triterpénicas por su estructura pueden ser caracterizadas por esta técnica. Esta técnica es mucho más

fiable que la de infrarrojo debido a las constantes actualizaciones que existen en estos últimos años.

- Índice de hemolisis: Kobert lo propuso por la practicidad que presenta ya que se analiza la hemoglobina hemolisada por el metabolito secundario.<sup>80</sup>
- Determinación del número de espuma: esta técnica se usa una determinación cualitativa y semi-cuantitativa de saponinas en una muestra.<sup>81</sup>
- Índice de pez: se basa en el grado de toxicidad que muestra las saponinas sobre los peces.<sup>11</sup>

### 1.5. Hongos fitopatógenos

Los hongos han desarrollado una gran cantidad de estrategias para colonizar las plantas, y estas interacciones dan como resultado un amplio espectro de resultados que van desde interacciones beneficiosas hasta la muerte del huésped. Con respecto a los patógenos de plantas, los hongos representan probablemente el grupo más diverso de amenazas relevantes viéndolo desde lo ecológico y económico. La especificidad que manejan cuando atacan a la planta hace que sea un poco difícil de manejarla, ya que no ataca de la misma manera a todos los órganos de la planta, sino que la colonizan por áreas, en la parte del ápice o por debajo del suelo; los patógenos hacen todo lo posible para adherirse a la superficie de la planta. Las especies de patógenos de plantas fúngicas se encuentran principalmente en los filos *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Entre los ascomicetos, los patógenos de las plantas se encuentran en varias clases, como los Dothideomycetes (por ejemplo, *Cladosporium spp.*), Sordariomycetes (por ejemplo, *Magnaporthe spp.*), O los Leotiomycetes (por ejemplo, *Botrytis spp.*).<sup>68</sup>

Los basidiomicetos están representados por los dos grupos patógenos de plantas más grandes: las royas (*Pucciniomycetes*) y las tizones (diseminadas entre el subfilum de *Ustilaginomycotina*).<sup>55,82</sup>

La clasificación de los hongos patógenos es importante para identificar y diagnosticar enfermedades de las plantas. Cada reino, orden, género y especie tiene sus propias características de identificación. Muchos de los factores de diagnóstico para identificar diferentes hongos son muy sutiles y sin el equipo de laboratorio y la habilidad adecuados son difíciles de identificar hasta el nivel de la especie. Si se puede identificar el tipo de cuerpo fructífero o las esporas que están asociadas con un phylum en particular, se podrá reducir la búsqueda considerablemente. En la mayoría de los casos, las identificaciones de las enfermedades en muchas de las plantas dependen de los signos y síntomas a la vista del ojo humano para el diagnóstico de la enfermedad atacada por hongos.<sup>20,25,83</sup>

### **1.5.1. Síntomas y diagnóstico de las infecciones por hongos**

Los hongos pueden causar signos y/o síntomas generales o localizados. Existen muchas enfermedades en las cuales los hongos atacan tanto a las raíces como las hojas o tallos produciendo muerte de los tejidos de la planta, así como también produce retardo del crecimiento cuando se va desarrollando, distorsiones en el crecimiento del tallo y coloración diferente al desarrollo normal de las hojas.<sup>15</sup>

Es muy importante para la identificación del patógeno la observación de los síntomas de la planta en todos los órganos, los signos que se pueden identificar incluyen hifas, micelios o esporas; cabe recalcar que es fundamental la identificación para el diagnóstico adecuado de la enfermedad que ataca a la planta. También poseen varias características por las cuales se pueden reconocer y es por medio de las esporas que al ser diseminadas por el viento son capaces de adherirse rápidamente a la planta. Su infección es específica

por no tener movimiento y al alimentarse de materia orgánica se alimentan de las paredes celulares de las plantas que está formado por celulosa.<sup>84</sup>

Los cuerpos fructíferos de los hongos van desde los microscópicos hasta los macroscópicos. Vienen en muchas formas y tienen sus características individuales. Los cuerpos fructíferos, junto con las esporas y el micelio, en varios casos pueden conducir a una identificación precisa de la enfermedad. Los siguientes síntomas son comunes en las infecciones por hongos, ya sea solos o con otros patógenos fúngicos.<sup>69</sup>

### **1.5.2. Biocontroladores antifúngicos**

El uso de fungicidas sintéticos hace que se evite y controle las enfermedades que viene atacando a las plantas; las limitaciones que poseen las defensas propias de las plantas, hizo que la mano del hombre se vea obligado a proteger el rendimiento de los frutos que dan las plantas. El uso de agentes químicos produce el efecto deseado en forma de rendimiento mejorado, características de calidad e incluso un aumento en el valor nutritivo del material vegetal.<sup>69,70</sup> Desafortunadamente, el uso incorrecto y demasiado intensivo de agroquímicos hace que los alimentos como producto final sean poco confiables para la alimentación. Según la organización mundial de la salud (OMS) y la FAO, se determinó que los pesticidas son tóxicos si se usan a menudo, específicamente a aquellos organismos que no son objetivo de eliminación, además de causar resistencias a las plagas. Los pesticidas generan residuos y estos se distribuyen en el ambiente como el aire, el suelo, el agua, y aún más en los frutos de los vegetales y hortalizas.<sup>8,69,70,82,84</sup>

Una alternativa a los fungicidas sintéticos puede estar constituida por compuestos naturales presentes en extractos de plantas, que no presentan toxicidad para el medio ambiente y los seres humanos. Múltiples investigaciones confirman la alta actividad fungicida de extractos de varias especies de plantas herbales.<sup>11</sup> Se demostraron

propiedades fungicidas para los flavonoides, compuestos fenólicos, lactonas insaturadas, compuestos de azufre, glucósidos cianogénicos y saponinas contenidos en diferentes partes de la planta.<sup>41</sup> La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) es una fuente particularmente rica en saponinas y otros metabolitos secundarios.<sup>40,43,51</sup> Las semillas de esta planta inhiben activamente el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Botrytis cinerea*.<sup>15,55</sup> Suponiendo que partes particulares de *Chenopodium quinoa* se diferencian en términos de contenido de compuestos bioactivos, debe esperarse el efecto diferenciado sobre más hongos.<sup>68</sup>

Se ha estado evaluando en diferentes centros de investigación sobre los pesticidas orgánicos, o biocontroladores biológicos, tanto aquellos modificados genéticamente como los metabolitos secundarios que las propias plantas producen y se espera que éstas den excelentes resultados para continuar con la disminución del uso de pesticidas sintéticos tóxicos.

# CAPÍTULO II

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Material biológico

##### 2.1.1.1. Cascarilla de semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd)

La cascarilla de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd fueron recolectados de AUTODEMA del Centro de Recría de Vacunos del distrito de Majes localizada en la provincia de Caylloma, perteneciente al departamento de Arequipa. La recolección se desarrolló en el mes de diciembre del 2016 a una altitud de 1410 m s. n. m.

##### 2.1.1.2. Inóculo

Para determinar el potencial de inhibición del producto final de saponinas se aisló microorganismos fitopatógenos a partir de una plantación de quinua en el distrito de San Salvador, correspondiente al distrito de Calca ubicado en el departamento de Cusco.

#### 2.1.2. Material de laboratorio

- Baguetas de vidrio
- Embudos de vidrio
- Fiolas de vidrio de 100, 500 y 1000 mL.
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL
- Probetas graduadas de 10, 50, 100 y 1000 mL
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 250 mL

- Matraz graduado de 50, 250 y 1000 mL
- Tubos de ensayo de 9 mL y 14 mL
- Matraz kitasato
- Embudo Buchner

### 2.1.3. Reactivos

- Ácido sulfúrico ACS J. T. BAKER®
- Anhídrido acético ACS FISHER CHEMICAL ®
- Ácido clorhídrico ACS J. T. BAKER®
- Agua destilada
- Etanol 96° DIPROQUIM

### 2.1.4. Equipos

- Balanza Analítica. Marca: OHAUS® PIONEER™
- Estufa. Marca: MEMMERT® Western Germany
- Bomba de Vacío. Marca: Sterlitech® 800801
- Autoclave.
- Centrífuga Marca: Hettich 2300-01 EBA 270
- Vortex Marca: Barnstead, Modelo: M37610-33
- Espectrofotómetro UV/VIS. Marca: Shimadzu, Modelo: UV 1700.
- Rotaevaporador. Marca: Buchi, Modelo: R-114.
- Incubadora J. P. Selecta
- Microscopio óptico Primo Star, ZEISS

### 2.1.5. Ambientes de trabajo

- Laboratorios H – 301, H – 302 y H – 101 de la Universidad Católica de Santa María

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Optimización del proceso de obtención de saponinas a partir de residuos del escarificado de *Chenopodium quinoa* Willd.

#### 2.2.1.1. Diseño experimental de la optimización de la extracción de saponinas

##### 2.2.1.1.1. Procesamiento del material vegetal

Las cascarillas o el afrecho de la semilla *Chenopodium quinoa* Willd se obtuvo de la trilla de la quinua a campo abierto, directamente de los sacos de recolección en los campos de cultivo de AUTODEMA - Majes. Para eliminar los residuos no deseados como las piedras, tallos secos, hojas y semillas de quinua se tuvo que tamizar primero en un tamiz de malla número 8 que tiene un tamaño de apertura media de 2.36 mm como se muestra en la Figura 8, volviendo a tamizar por una malla de número 16 con una media de 1.18 mm para excluir más restos tipo piedrillas y semillas de quinua, en una malla número 20 con una media de apertura de 850  $\mu\text{m}$  y número 25 con una media de apertura de 710  $\mu\text{m}$ , estos dos últimos para que solo quede la cascarilla de semillas de quinua como material vegetal a utilizar. Se procedió al secado en un cuarto bajo la sombra, aireado y a temperatura ambiente, (aproximadamente a 20 °C), durante 24 horas, luego se realizó el traslado del material a los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María en sobres de papel Kraft dentro de una caja de cartón. Se procedió a completar el secado para lo cual se colocó sellados los sobres de papel Kraft con la cascarilla de semillas de quinua en la estufa a 30 °C durante 24 horas. Una vez obtenida la muestra seca se guardó en un recipiente cerrado herméticamente y lejos de la luz solar para su correcto almacenamiento y conservación.



**Figura 8.** Tamizado del afrecho de *Chenopodium quinoa* Willd en una malla N° 16.

#### **2.2.1.1.2. Preparación de los extractos hidro-etanólicos**

Una vez obtenido limpio el cascarillado de *Chenopodium quinoa* Willd se pesó doce muestras de 2.5 g de cascarilla cada uno y se procedió a guardarlos en frascos de vidrio de 250 mL para su posterior uso; aparte, se procedió a preparar 100 mL de soluciones hidro-etanólicas con concentraciones de 20, 50 y 80 %. Se agregó el disolvente de 20% de concentración a cuatro frascos de vidrio; a los siguientes cuatro frascos se agregó el disolvente de 50% de concentración y a los últimos cuatro frascos se agregó el disolvente de 80%; obteniéndose así para cada frasco una mezcla de 100 mL de solución hidro-alcohólica con 2.5 g de cascarillado de *Chenopodium quinoa* Willd.

#### **2.2.1.1.3. Determinación de las variables para la optimización de la obtención de saponinas**

Los frascos de vidrio con las soluciones hidro-alcohólicas y cascarillado finalmente se dividieron en tres grupos; el grupo 1: cuatro frascos con concentración de 20% V/V etanol – agua; el grupo 2: cuatro frascos con concentración de 50% V/V etanol – agua y el grupo 3: cuatro últimos frascos con concentración de 80% V/V etanol –

agua. Se fija la primera variable para la optimización que es la concentración de la solución hidro-alcohólica para la extracción de saponinas a la cual se le llamó Factor A: concentración de disolvente % V/V. Para fijar la segunda variable se llevó todos los frascos con soluciones hidro-alcohólicas a un mixer y se programó la agitación a 200 RPM; se modificó el tiempo de agitación; seis frascos con soluciones hidro-alcohólicas se agitaron durante 24 horas y otros seis frascos durante 72 horas. A esta segunda variable se le llamó Factor B: tiempo de agitación (t).

En la tercera variable se tomó en cuenta la temperatura a la cual las soluciones hidro-alcohólicas serían agitadas. Se tomó en cuenta la temperatura ambiente que oscila a unos 20 °C y a otra temperatura de 50 °C. Esta tercera variable se llamó Factor C: temperatura de extracción (T).

La Tabla 4 muestra la matriz del diseño multinivel que se realizó donde se muestran los niveles asignados a cada variable; tomando en cuenta que para la primera variable se denominó Factor A: % V/V; la segunda variable como Factor B: tiempo de agitación (t) y la tercera variable como Factor C: temperatura de extracción (T).

**Tabla 4.** Identificación de variables de trabajo para la optimización de la extracción de saponinas a partir de cascarillado de *Chenopodium quinoa* Willd

Factores		Niveles	
A	Concentración hidro-alcohólica % V/V	20%	3
		50%	
		80%	
B	Tiempo de agitación	24 horas	2
		72 horas	
C	Temperatura de extracción	20°C	2
		50°C	

En la Tabla 5 se proporcionan las condiciones del experimento; es decir que para cada muestra se debe combinar las tres variables fijadas para identificar los efectos de las interacciones entre las tres variables. Por ejemplo, para la muestra 1: la concentración de disolvente de es 20 %V/V de etanol-agua, aplicando un tiempo de agitación de 24 horas y a una temperatura de 20 °C.

**Tabla 5.** Diseño experimental multinivel para cada muestra de escarificado de quinua en extracto hidro-alcohólico.

<b>Número de muestra de extracto hidro-alcohólico con saponinas</b>	<b>Factor A Concentración hidro-alcohólica % V/V</b>	<b>Factor B Tiempo de agitación (t)</b>	<b>Factor C Temperatura de extracción (T)</b>
<b>I</b>	20	24	20
<b>II</b>	20	24	50
<b>III</b>	20	72	20
<b>IV</b>	20	72	50
<b>V</b>	50	24	20
<b>VI</b>	50	24	50
<b>VII</b>	50	72	20
<b>VIII</b>	50	72	50
<b>IX</b>	80	24	20
<b>X</b>	80	24	50
<b>XI</b>	80	72	20
<b>XII</b>	80	72	50

#### 2.2.1.1.4. Filtración de los extractos hidro-alcohólicos

Después del periodo de agitación a diferentes temperaturas se lleva a filtración al vacío con papel filtro rápido (4 – 7  $\mu$ m) como se muestra en la Figura 9; se midió el volumen final del filtrado y se llevó a una fiola de 100 mL para ser aforada al mismo volumen con la concentración de etanol que correspondió para cada muestra. Se realizó para cada muestra el centrifugado a 3500 RPM durante 15 minutos para poder decantar los sólidos restantes en la solución extraída.

### 2.2.1.1.5. Evaporación del extracto y obtención del crudo de saponinas

Se procedió luego a llevar las muestras al rotavapor para recuperar el etanol y poder reutilizarlo; posteriormente se determinó la temperatura de ebullición de etanol con la ecuación de Sídney Young (*ecuación 1 y 2*); se recuperó el solvente quedando solo agua y las saponinas diluidas en ésta, ya que son altamente solubles en agua.



**Figura 9.** Obtención de extractos del cascarillado de *Chenopodium quinoa* W. por el método de filtrado al vacío

$$P_h = P_0 e^{-\alpha h} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\alpha = \frac{\rho_{\text{aire}} \cdot g}{P_0}$$

$$T_{eb} = \frac{T_{eb,760} - 273,15 K_{SY}(760 - P_h)}{1 + K_{SY}(760 - P_h)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Siendo:

$P_h$  = presión a altura

$\rho_{\text{aire}}$  = densidad del aire

$P_0$  = Presión a nivel del mar

$g$  = gravedad

$\alpha$  = constante

$K_{SY}$  = constante de Sydney-Young

$h$  = altura

Se llevó a la estufa en lunas de reloj a una temperatura de 60 °C para el secado de las muestras finales y se obtuvo el crudo de saponinas, se pulverizó, se pesó y luego se almacenó en frascos de color ámbar a temperatura ambiente bajo sombra con el propósito de mantener el producto final bajo condiciones adecuadas y su posterior uso; el procedimiento se realizó tres veces para cada muestra.

### **2.3. Determinación del contenido de saponinas**

#### **2.3.1. Método cualitativo y semi-cuantitativo: afrosimétrico**

##### **2.3.1.1. Preparación del estándar**

Se usó saponina de la marca SIGMA – ALDRICH<sup>®</sup>, teniendo en cuenta la hoja de especificaciones del reactivo para manipularla (anexo A), para preparar el estándar y obtener la curva de calibración; según Koziol 1991; primero se pesaron 0.8; 1.6; 3.2; y 4 mg de saponina pura para luego agregarlos a cada tubo de ensayo respectivamente, los tubos de ensayo utilizados tiene un diámetro exterior de 13 mm y una altura de 100 mm con una capacidad de 10 mL; se añadió 5 mL de agua destilada como se muestra en la Tabla 6, se selló con parafilm y se hizo el siguiente procedimiento: la primera etapa consistió en agitar vigorosamente unos 30 segundos el tubo de ensayo y terminado el tiempo se colocó el tubo en forma vertical; se esperó otros 30 segundos con el tubo vertical inmóvil y se hizo la primera medición de la altura de la espuma; se añadió unos 15 minutos al tiempo de reposo y luego se hizo la segunda medición. En la segunda etapa se volvió a agitar el tubo durante otros 30 segundos, se dejó nuevamente el tubo en reposo otros 30 segundos y se registró la tercera medición de la altura de la espuma; se volvió a añadir otros 15 minutos al tiempo de reposo y se registró la cuarta medición. Se elaboró un cuadro de resultados y por consiguiente la curva de calibración con su respectiva ecuación lineal como se

muestra en la Tabla 7. De la misma manera se midió las alturas en “cm” de cada muestra elaborada repitiendo la primera y segunda etapa anteriormente mencionada durante la preparación del estándar. El procedimiento se realizó por triplicado.

**Tabla 6.** Peso y concentración de saponina estandar marca SIGMA – ALDRICH®

<b>Peso saponina estandar (mg)</b>	0.8	1.6	2.4	3.2	4
<b>Volumen de H<sub>2</sub>O (mL)</b>	5	5	5	5	5
<b>Concentracion de saponina en agua (mg/ mL)</b>	0.16	0.32	0.48	0.64	0.80

**Tabla 7.** Parámetros de la curva de calibración: índice de espuma de saponinas

<b>Concentración de estándar de saponinas en tubo de ensayo (mg/mL)</b>	<b>Altura de la espuma de saponinas formada durante la agitación (cm)</b>
0.16	3.43
0.32	5.44
0.48	6.82
0.64	8.46
0.8	9.36

### 2.3.2. Método cuantitativo: espectrofotometría UV – VIS

Se realizó la determinación de saponinas por espectrofotometría UV – VIS, para ello se hizo la cuantificación mediante la reacción color de Lieberman – Burchard (Monje *et al.*, 2006) para formar los productos cromógenos al reaccionar con las saponinas se usó el reactivo color que es una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico en una proporción de 1:5 en baño de hielo. La proporción de la muestra con el reactivo

color fue de 1:3.5; se elaboró una curva de calibración “Absorbancia vs Concentración” usando el estándar de saponina estandar SIGMA – ALDRICH®.<sup>72</sup>

La curva de calibración se realizó usando como blanco la solución hidro-alcohólica al 50% V/V etanol – agua. Previamente se preparó una solución patrón de 2 g de saponina pura de la marca SIGMA – ALDRICH en un litro de agua-etanol al 50% V/V; seguido se coloca alícuotas en las fioas y luego se afora a 100 mL como se muestra en la Tabla 8. El reactivo se preparó inmediatamente antes de su uso.

**Tabla 8.** Elaboración de los patrones de medición método UV-VIS para elaborar la curva de calibración.

Patrones	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vol. de alícuota de estándar de saponinas (mL)	2.5	5	10	15	20	25	30	35	40
Vol. agua-etanol (mL)	7.5	5	90	85	80	75	70	65	60
Total aforado (mL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Se procedió a preparar 31.5 mL del reactivo color Liebermann – Burchard de inmediato para nueve estándares. La preparación se hizo por triplicado.

De cada una de las fioas se extrae 1 mL y se coloca en un tubo de ensayo para luego adicionarle el reactivo color 3.5 mL y como anteriormente se describió, agitarlo lentamente en baño hielo y esperar un tiempo de 30 minutos para que el color sea uniforme; luego de este tiempo se procedió a leer en el espectrofotómetro cada muestra a una longitud de onda de 518 nm.

#### 2.4. Determinación del rendimiento de extracción

El porcentaje de rendimiento de extracción (RE%), se determinó por método de gravimetría, el cual consistió en pesar el producto final como crudo de saponinas de

cada extracto elaborado. Finalmente se aplicó la Ecuación 3 para hallar el RE% de cada extracto.

$$RE\% = \frac{\text{Masa de crudo de saponinas (g)}}{\text{Masa de material estudiado (g)}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 3}$$

## 2.5. Aislamiento, caracterización e identificación de hongos fitopatogénos de la planta de Quinoa

### 2.5.1. Recolección de material vegetal

En varias plantas de quinoa se observaron durante tres meses el crecimiento de los tallos, las hojas, las inflorescencias y la raíz. Se obtuvieron muestras de tejidos de la planta que tuvieran algo fuera de lo común como manchas oscuras, negras o marrones, manchas blancas con vellosidades o manchas amarillas como se observa en la Figura 10; tallos con manchas oscuras y raíces en estado de putrefacción. Se aisló las muestras obtenidas cubriéndolas con papel Kraft, rotulándolas y almacenándolas en cajas para su conservación.

### 2.5.2. Identificación de hongos fitopatogénos a partir de cortes vegetales de

#### *Chenopodium quinoa* Willd

Los hongos aislados en la cámara húmeda, luego de su crecimiento, fueron pasados a un medio de cultivo selectivo Agar Papa Dextrosa (PDA); después de 5 a 10 días de crecimiento se realizó el examen macroscópico y microscópico de las placas. Se midió el desarrollo del micelio; en el anverso: el aspecto del frente hifal, color de la especie fúngica; en el reverso: aspecto del frente hifal, el pigmento y se procedió a aislar en medio PDA las cepas de mayor abundancia.



**Figura 10.** Hojas de *Chenopodium quinoa* W. con manchas foliares. **a)** Planta de quinua donde presenta hojas con manchas foliares amarillas. **b)** y **c)** Haz de la hoja donde se observa una clorosis en la hoja. (Fotografías tomadas en los campos de cultivo del distrito de San Salvador, provincia de Calca, departamento del Cusco.)

## 2.6. Actividad antifúngica de saponinas extraídas frente a cepas fungales encontradas

### 2.6.1. Prueba preliminar de evaluación antifúngica: Crudo de saponinas vs Extracto hidro-alcohólico con saponinas.

Se hizo una prueba preliminar para determinar si se utilizará el crudo de saponinas extraído al final del proceso de optimización o si se necesitará diluirse en alguna solución para su mejor rendimiento. Se hizo la evaluación mediante la dilución del crudo de saponinas (mg) en el medio PDA esteril antes de ponerlo en placas; a este procedimiento se llamó tratamiento 1; al mismo tiempo se hizo la dilución del crudo

de saponinas en extracto hidro-alcohólico (tratamiento 2) para hacer una comparación previa y obtener el mejor resultado. Las proporciones que se manejaron se muestran en la Tabla 9, por ejemplo, se usó 200 mL de medio PDA para diluir 200 mg de saponinas y así obtener una concentración de 1 mg/mL.

La evaluación preliminar se hizo en las dos cepas fungales encontradas. La siembra se realizó por triplicado para óptimos resultados.

**Tabla 9.** Concentración de saponinas en 200 mL de medio PDA para 10 placas, distribuyendo 20 mL por cada placa.

Número de Placas	Cantidad de medio PDA (mL)	Crudo de saponinas (mg)	Concentración de saponinas en medio PDA (mg/mL)
10	200	200	1
10	200	600	3
10	200	1000	5

### 2.6.2. Método de dilución en placa y siembra

Se volvió a preparar el medio de cultivo PDA; se esperó a que llegue a una temperatura de 40 °C aproximadamente después de la esterilización; se hizo la dilución del crudo de saponinas o del extracto hidro-alcohólico según la prueba preliminar a una concentración de 1 mg/mL en medio PDA; como control negativo se empleó agar agua y para control positivo MANCOZEB® a una concentración de 3 g/L; una vez gelificados los medios de cultivo se procedió a la siembra de los hongos encontrados por punción en el centro de cada placa de Petri; se evaluó el crecimiento hasta el día 12.

Se realizó por triplicado la siembra para cada hongo encontrado. La actividad inhibitoria se evaluó midiendo el crecimiento diametral de los hongos en cada placa de Petri obtenida durante 12 días.

## 2.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron expresados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{x} \pm SEM$ ), se utilizó el software Microsoft Excel 2016 y Minitab. El error estándar de la media (SEM) es una medida de precisión para una media poblacional estimada, su cálculo está dado por la siguiente ecuación:

$$SEM = \frac{\text{Desviación estandar } (\sigma)}{\sqrt{\text{Tamaño de la muestra } (n)}}$$

Así mismo, un análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) seguido de la prueba de Tukey (comparación entre grupos) y de la prueba de Dunnett (comparación con el control), se utilizaron para evaluar las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el grupo del control negativo y los otros grupos y entre las diferentes horas de aplicado los extractos, para lo cual se utilizó el software Minitab para hallar los intervalos de confianza, y las graficas de Tukey y Dunnett.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Diseño experimental de la optimización de la extracción de saponinas

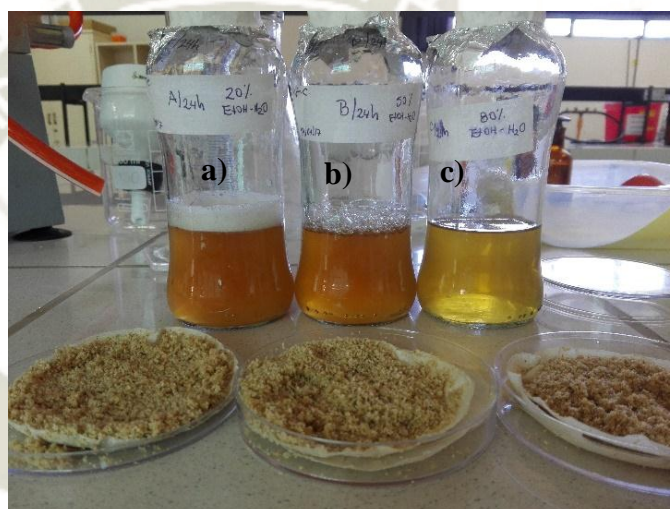
Como se indica en la parte metodológica (sección 2.2.1.1.2.), se realizó la extracción de saponinas a partir de la cascarilla de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd lo que permitió la obtención de los doce extractos hidro-alcohólicos. Existen diferentes investigaciones donde se han realizado extractos de saponinas a partir de la cascarilla de semilla de *Chenopodium quinoa* Willd de manera en la que en la sección 3.1.1.1.2. se realiza. La extracción de saponinas a partir de diversos materiales biológicos fue reportada por diferentes procedimientos, pero las naturalezas polares de estos compuestos hicieron que las investigaciones coincidieran en la extracción en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular como el metanol, etanol, butanol y mezclas de diferentes proporciones de estos alcoholes y agua.<sup>1,58</sup> En *Chenopodium quinoa* Willd se reportó la extracción con metanol y etanol.<sup>85</sup>

Según Andrade recomienda la extracción de saponina en agua, no obstante, al usar el agua como disolvente hace que presente dificultades durante el filtrado debido a la formación abundante de espuma<sup>58</sup> el cual perjudica el pipeteo y el aforado de la solución lo que conlleva a resultados con mayor porcentaje de error. Estos problemas de extracción fueron subsanados con la adición paulatina de etanol a diferentes concentraciones con la finalidad de romper la emulsión.<sup>46</sup>

Zárate determinó la mejor concentración a partir de la quinua chulpi a la que se

extrajo la saponina a diferentes concentraciones, siendo el mejor porcentaje de 50% V/V para la extracción de saponina.<sup>86</sup>

Se determinó también el porcentaje de rendimiento de extracción (RE %) mediante la obtención de los extractos finales como crudo de saponinas mediante la evaporación del solvente. Estos extractos blandos como se aprecia en la Figura 11, se pudo observar una diferencia en la coloración de los extractos etanólicos; el extracto de 20 % V/V etanol – agua presenta una coloración anaranjada oscura.



**Figura 11.** Extractos filtrados del cascarillado de *Chenopodium quinoa* W. todos extractos hidro-alcohólicos a) 20% V/V, b) 50% V/V c) 80% V/V

Asimismo, existe varios trabajos de investigación en el que se evaluó varios métodos de extracción de saponinas en donde se señaló que el tiempo de extracción, el filtrado al vacío y la evaporación fueron las técnicas más adecuadas para la extracción de saponinas de este material vegetal; en comparación a otras técnicas como la extracción por Soxhlet<sup>87</sup> y la homogenización ya que éstas tienen una variedad de inconvenientes como los tiempos de extracción que son relativamente largos, además de utilizar grandes cantidades de solventes orgánicos a cambio de un bajo rendimiento.

### 3.2. Resultados de la optimización de la obtención de saponinas a diferentes variables

Con la finalidad de optimizar el proceso de extracción, se analizó tres variables independientes como se detalla en la sección metodológica (sección 2.2.1.1.2.2.), cada una con diferente nivel, para ello se hizo el diseño experimental multinivel (anexo 1).

Para estudiar el efecto de los factores: concentración de disolvente hidro-alcohólico, tiempo de agitación y temperatura de extracción se utilizó un diseño multinivel factorial 3x2x2. Este diseño presentó tres niveles para la concentración de disolvente los cuales son de 20, 50 y 80 % V/V agua – etanol, dos niveles para el tiempo de agitación con niveles de 24 y 72 horas y dos niveles para la temperatura de extracción con un nivel mínimo de temperatura de 20 °C y uno máximo de 50°C.

Se construyó tablas de interacción entre las tres variables las cuales hallando el promedio y la desviación estándar se obtuvo los resultados más claros sobre los efectos que tenían la temperatura, la concentración y el tiempo de agitación en el rendimiento de extracción; esto se demuestra en las Tablas 10, 11 y 12 los cuales a partir de ellos se hace una tabla combinada, en el que se resalta el mayor dato por el que se obtuvo óptimos resultados. La determinación cualitativa y cuantitativa se hizo también por triplicado (n=3) aplicando el criterio de aceptación o rechazo, el valor final de la Tabla 13 es el valor medio  $\pm$  la desviación estándar que fue determinado con Minitab. Cada experimento se desarrolló con variables y el nivel que le corresponde siguiendo el procedimiento explicado en la metodología, la Figura 12 proporciona las eso quiere decir que para el volumen de solvente se necesita el 50%

de etanol – agua a un tiempo de extracción de 72 horas con una temperatura de 50 °C.

**Tabla 10.** Tabla de interacción entre la concentración de extracto hidroalcohólico (% V/V) y el tiempo de agitación (horas)

Concentración de extracto hidroalcohólico % V/V	Tiempo de agitación (t=horas)				X%v/v	σ %v/v
	24		72			
20	0.608	0.301	0.44	0.798	0.53675	0.2147
50	0.918	0.993	1.111	1.185	1.05175	0.1192
80	0.917	0.923	0.826	0.912	0.8945	0.0459
X <sub>t</sub>	0.8143	0.7390	0.7923	0.9650	0.8277	0.1166
Σ <sub>t</sub>	0.1787	0.3809	0.3368	0.1989		

\*Los promedios hallados de cada variable se generaron a partir de los promedios finales después de tres réplicas. En esta tabla de interacción se proporcionan las variables óptimas de extracción, es decir, se obtuvo un mayor resultado a una concentración de 50% V/V etanol-agua a 72 horas de agitación; los resultados se muestran en rojo. Los resultados en azul muestran las medias finales de todos los datos, dando un promedio de 0.8277 g y una desviación estándar de 0.1166.

**Tabla 11.** Tabla de interacción entre la concentración de extracto hidroalcohólico (% V/V) y la temperatura de extracción (°C)

Concentración de extracto hidroalcohólico % V/V	Temperatura de extracción (°C)			
	20	50	X%v/v	σ %v/v
20	0.608	0.301	0.455	0.217
	0.44	0.798	0.619	0.253
50	0.918	0.993	0.956	0.053
	1.111	1.185	1.148	0.052
80	0.917	0.923	0.920	0.004
	0.826	0.912	0.869	0.061
X <sub>T°</sub>	0.803	0.852	0.8277	0.1166
Σ <sub>T°</sub>	0.241	0.299		

\*Los promedios hallados de cada variable se generaron a partir de los promedios finales después de tres réplicas. En esta tabla de interacción se proporcionan las variables óptimas de extracción, es decir, se volvió a obtener un mejor resultado a una concentración de 50% etanol-agua con una temperatura de extracción de 50 °C; los resultados se muestran en rojo. Los resultados en azul muestran las medias finales de todos los datos, dando un promedio de 0.8277 g y una desviación estándar de 0.1166.

**Tabla 12.** Tabla de interacción entre la temperatura de extracción (°C) y el tiempo de agitación (horas)

Tiempo de agitación (t=horas)	Temperatura de extracción (T=°C)			
	20	50	$X_t$	$\sigma_t$
24	0.608	0.301	0.455	0.217
	0.918	0.993	0.956	0.053
	0.917	0.923	0.920	0.004
72	0.44	0.798	0.619	0.253
	1.111	1.185	1.148	0.052
	0.826	0.912	0.869	0.061
$X_{T^\circ}$	0.8033	0.8520	0.8277	0.1166
$\sigma_{T^\circ}$	0.241	0.299		

\*Los promedios hallados de cada variable se generaron a partir de los promedios finales después de tres réplicas. En esta tabla de interacción se proporcionan las variables óptimas de extracción, es decir que para tener resultados más óptimos se necesita 72 horas de agitación del extracto a una temperatura de 50 °C; los resultados se muestran en rojo. Los resultados en azul muestran las medias finales de todos los datos, dando un promedio de 0.8277 g y una desviación estándar de 0.1166.

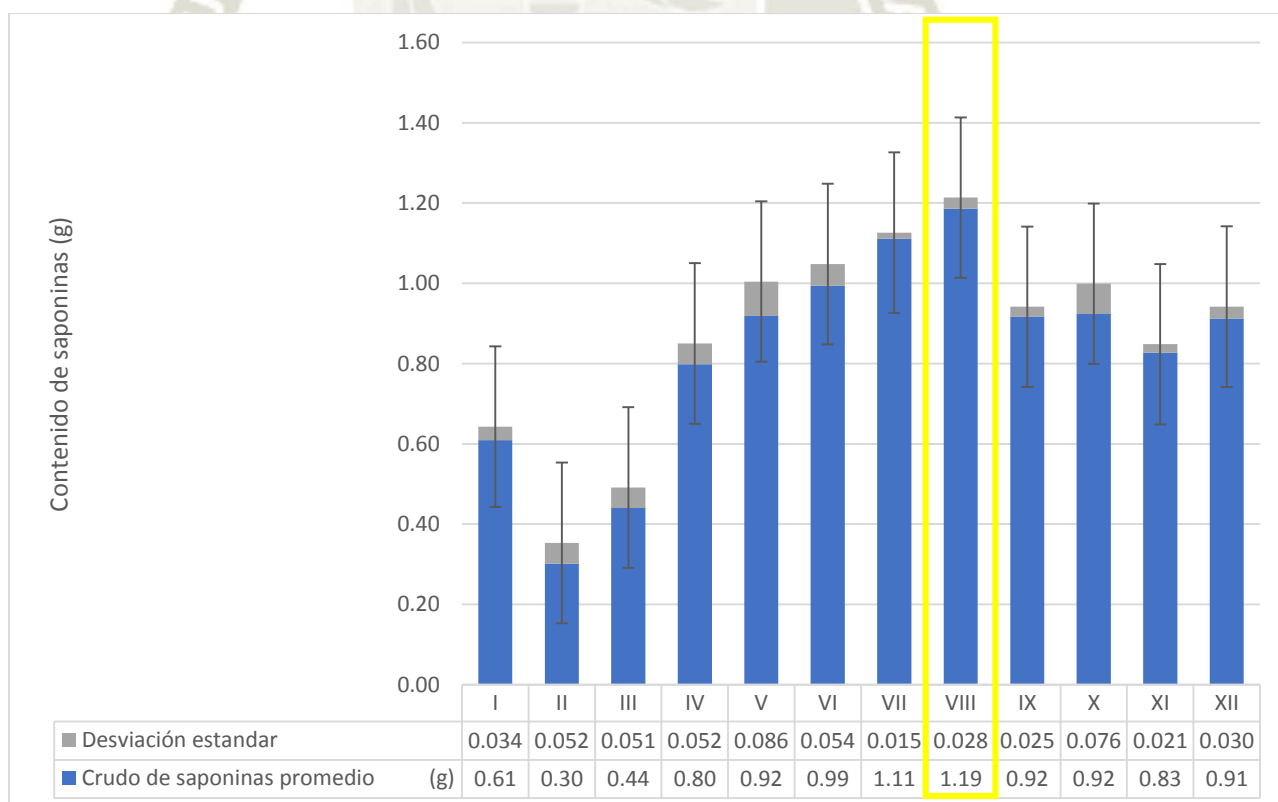
**Tabla 13.** Datos de pesos promedio de saponinas obtenidas después de la interacción de las tres variables: concentración hidro-alcohólica, tiempo de agitación y temperatura de extracción con su respectiva desviación estándar a partir de las tres replicas que se realizó.

Número de muestra de extracto hidro-alcohólico con saponinas	Crudo de saponinas obtenido: promedio (g)
<b>I</b> (20:24:20)	0.608 ± 0.03375
<b>II</b> (20:24:50)	0.301 ± 0.05206
<b>III</b> (20:72:20)	0.440 ± 0.05117
<b>IV</b> (20:72:50)	0.798 ± 0.05182
<b>V</b> (50:24:20)	0.918 ± 0.08555
<b>VI</b> (50:24:50)	0.993 ± 0.05432
<b>VII</b> (50:72:20)	1.111 ± 0.01524
<b>VIII</b> (50:72:50)	1.185 ± 0.02785
<b>IX</b> (80:24:20)	0.917 ± 0.02492
<b>X</b> (80:24:50)	0.923 ± 0.07563
<b>XI</b> (80:72:20)	0.826 ± 0.02143
<b>XII</b> (80:72:50)	0.912 ± 0.03002

\*Cada experimento se realizó con factores en el correspondiente nivel, indicado en el subíndice entre paréntesis al lado del número romano y siguiendo el procedimiento explicado en materiales y métodos (ver Tabla 5).

En esta tabla se proporcionan las siguientes condiciones en el experimento. Por ejemplo, para el experimento I: el porcentaje de alcohol es 20%, aplicado a un tiempo de 24 horas y a una temperatura de 20°C por el cual se obtuvo un crudo de saponinas medio de 0.608 g. Este valor es el promedio de 3 experimentos desarrollados en las mismas condiciones. (anexo 2)

Haciendo una prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales en la Tabla 10, 11 y 12, donde se maneja la hipótesis nula dice que no existe diferencia estadísticamente significativa y la hipótesis alternativa dice que si la hay a un nivel de significancia del 95%; comparando las medias de ambas variables dando un nivel de significancia de 0.05 se obtuvo un valor P a dos colas de 1 en todas las pruebas t realizadas a cada tabla y dieron como resultado que el valor P es mayor que el nivel de significancia ; esto significa que se rechaza la hipótesis nula y se opta por la hipótesis alternativa que indica que si existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias en cuanto al tiempo, la concentración y la temperatura que son las variables manejadas en el proceso de extracción de saponinas a partir de residuos de *Chenopodium quinoa* Willd. (anexo 3)



**Figura 12.** Comparación del contenido de saponinas en el extracto entre muestras, las barras de error de desviación estándar indican que en la muestra VIII(50%:72hr:50°C) se obtuvo un mayor peso de crudo de saponinas en la extracción.

Un estudio realizado por la universidad Mayor de San Andres, Bolivia<sup>65</sup>; al obtener extractos hidro-etanólicos de ocho empresas exportadoras de quinua encontraron que los rendimientos de extracción varían respecto al tipo de extracto y al tipo de residuo o escarificado que se utiliza; esto visto de manera cualitativa con el método de índice de espuma o afrosimétrico; según este estudio, la concentración final de saponinas en los extractos hidro-etanólicos dependen bastante del almacenamiento de los residuos así como también depende del tipo de quinua que se maneja.

Otro estudio del instituto de investigación de la universidad de Quito<sup>51</sup> halló que los rendimientos de extracción varían desde un 17.3% hasta un 56.2% también dependiendo de como se realizaba el manejo de residuos, es decir que se tenía un solo lugar destinado a todos los residuos del escarificado de *Chenopodium quinoa* Willd. A lo largo del tiempo se han desarrollado varios sistemas de desaponificación los cuales combinan métodos mecánicos abrasivos y tamices estacionarios; esto por vía seca y por vía húmeda como el tiempo de remojo para la extracción de saponinas y la temperatura del extractante. En la vía seca que combinan el calor seco con medios mecánicos abrasivos, según bibliografía, existe una mayor probabilidad que se hidrolicen las saponinas por el calor al que son sometidas las semillas de quinua. En cambio por la vía húmeda se acondiciona la entrada de agua como lavado de las semillas debido a que son solubles en disolventes de baja polaridad, esto hace que la extracción sea más eficaz; así como también otros estudios como los de Bacigalupo desarrollaron el proceso de extracción con solamente agua a distintas temperaturas y comprobaron que a mayor temperatura es mucho más eficiente la extracción pero también con varios inconvenientes ya que a temperaturas mayores de 90 °C tanto las semillas como el escarificado perdieron su naturaleza; es decir, la semilla alteró su aspecto y la saponina del escarificado se hidrolizó por completo, es por ello que

investigadores como Briceño y Scarpati toman como límite de temperatura a 70 °C para su proceso de extracción.

### 3.3. Rendimiento de extracción de saponinas

Aplicando la ecuación de rendimiento (*ecuación 3*) descrito en la metodología se obtiene el rendimiento de la extracción en 2.5 g de cascarillado de *Chenopodium quinoa* Willd. La Tabla 14 presenta el promedio del rendimiento de las 12 muestras con su respectiva desviación estándar.

Se puede observar que el rendimiento en las muestras VII y VIII son mayores a las de las demás; esto fue comparado a una prueba ANOVA de un factor seguido de la prueba de Tukey (anexo 5). Al realizar el diseño factorial multinivel (3x2x2) ya que uno de los factores tiene mas de 2 niveles, la Tabla 15 muestra los grados de libertad y el valor p que se le asignan, teniendo en cuenta que el nivel de significancia es de 0.05 para que un factor tenga más influencia que otro. Usando un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  se obtiene que para el factor A concentración %V/V el valor  $p < 0.05$ , los datos obtenidos son significativos.

El valor p del factor C Temperatura de extracción ( $p = 0,581$ ) está muy lejos del valor p asignado lo cual esto significa que los datos son poco significativos; y el valor p del factor B Tiempo de agitación se acerca al valor  $p = 0.05$ , esto quiere decir que, si bien estadísticamente no es significativo, tiene algo que ver con el rendimiento de la extracción y esto se demuestra en la Figura 13.

Por lo tanto, se podría decir que el extracto que presentó un mejor rendimiento fue el extracto de la muestra VIII con un  $47,429 \pm 0.028$  mg %. Esto podría deberse a que a igual concentración de etanol y agua hay una mayor retención de saponinas, este efecto combinado con la temperatura y el tiempo de agitación lo vuelven mucho más eficiente.

**Tabla 14.** Datos obtenidos del promedio de crudo de saponinas (g) y el promedio del rendimiento final de la obtención del crudo de saponinas (%).

Número de muestra de extracto hidroalcohólico con saponinas	Promedio de crudo de saponina obtenido (g)	Promedio del rendimiento de la obtención de crudo de saponina (%)
<b>I</b> (20:24:20)	0.61	24.356 ± 0.034
<b>II</b> (20:24:50)	0.30	12.052 ± 0.052
<b>III</b> (20:72:20)	0.44	17.601 ± 0.051
<b>IV</b> (20:72:50)	0.80	31.939 ± 0.052
<b>V</b> (50:24:20)	0.92	36.751 ± 0.086
<b>VI</b> (50:24:50)	0.99	39.741 ± 0.054
<b>VII</b> (50:72:20)	1.11	44.432 ± 0.015
<b>VIII</b> (50:72:50)	<b>1.19</b>	<b>47.429 ± 0.028</b>
<b>IX</b> (80:24:20)	0.92	36.664 ± 0.025
<b>X</b> (80:24:50)	0.92	36.933 ± 0.076
<b>XI</b> (80:72:20)	0.83	33.076 ± 0.021
<b>XII</b> (80:72:50)	0.91	36.481 ± 0.030

\*Cada experimento se realizó con factores en el correspondiente nivel, indicado en el subíndice entre paréntesis al lado del número romano y siguiendo el procedimiento explicado en materiales y métodos (ver Tabla 5).

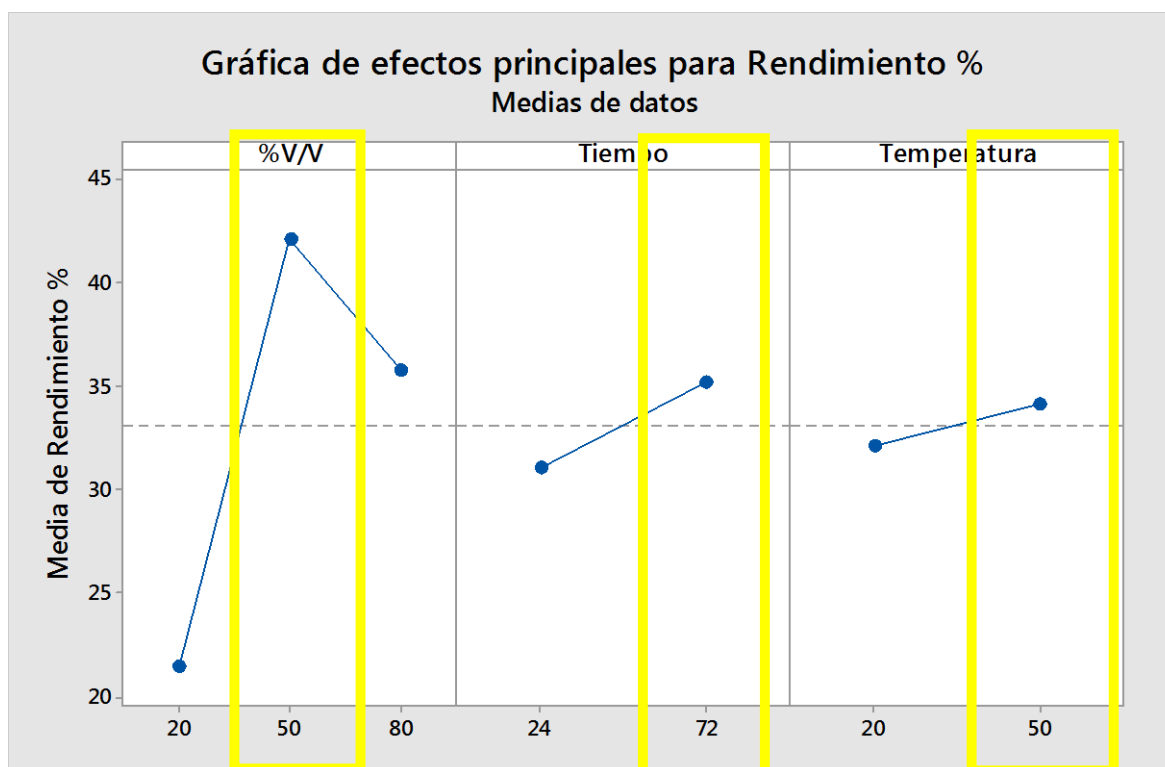
En esta tabla se proporcionan las siguientes condiciones en el experimento. Por ejemplo, para el experimento I: el porcentaje de alcohol es 20%, aplicado a un tiempo de 24 horas y a una temperatura de 20°C. El contenido de crudo de saponinas medio obtenido es de 0.608 g y el rendimiento de extracción es 24.356 %. Este valor es el promedio de 3 experimentos desarrollados en las mismas condiciones.

**Tabla 15.** Análisis de varianza para el promedio de Rendimiento %

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
<b>Factor A % V/V</b>	2	891.52	445.76	13.10	0.004
<b>Factor B Tiempo de agitación</b>	1	49.86	49.86	1.46	0.265
<b>Factor C Temperatura de extracción</b>	1	11.40	11.40	0.33	0.581
<b>Error</b>	7	238.26	34.04		
<b>Total</b>	11	1191.04			

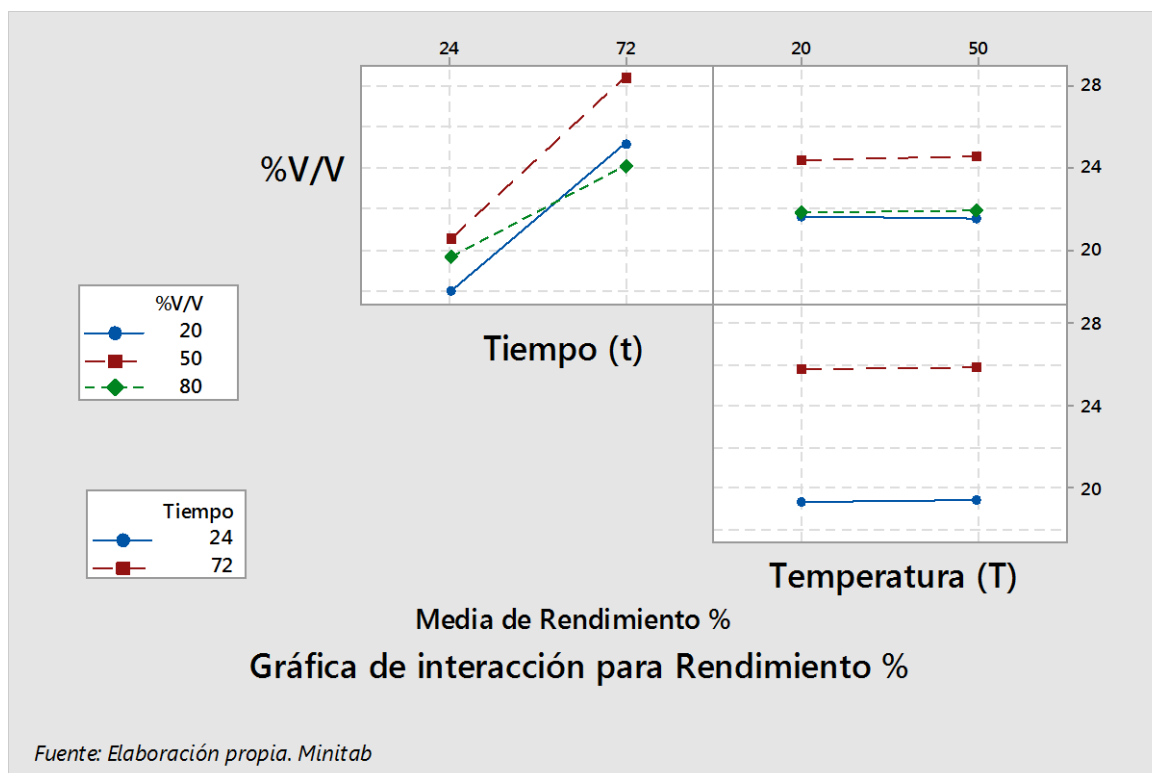
$$R^2 = 80,00 \% \quad R^2 (\text{predictor}) = 41,21 \%$$

$$R^2 (\text{ajustada por g.l.}) = 68,56 \%$$



**Figura 13.** Gráfica de efectos de los factores A: concentración hidro-alcohólica % V/V, factor B: tiempo de agitación y factor C: temperatura de extracción.

Un estudio realizado por Mujica<sup>86</sup> obtuvo el 40,54 mg% de rendimiento al hacer la extracción de saponinas, comparando con la investigación realizada, se obtuvo una eficiencia mayor, sin embargo, se debe tomar en cuenta las variedades de quinua que se manejan durante el proceso de extracción ya que influye bastante si es un tipo de quinua dulce o amarga; para esta investigación se utilizó quinua blanca Real que es amarga. Como se observa en las gráficas de interacción de la Figura 14, existe un notorio efecto en la media del rendimiento con una concentración de 50 % V/V y a 72 horas, lo cual no ocurre con la temperatura que tiene una ligera inclinación. Confirma los valores obtenidos por la prueba ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Se realizó una nueva replica con los valores obtenidos y se volvió a tener casi los mismos resultados con ligeras variaciones, dándonos la misma interacción entre todos los factores o variables. El resultado se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Gráfica de interacción de todos los factores A: %V/V; B: Tiempo (t); C: Temperatura (T). Efecto de %V/V permanece constante a un volumen de 50 % el tiempo de agitación a 72 horas y la temperatura a 50 °C; demostrado por las líneas de tendencia en rojo de la gráfica.

Los resultados indican que el tiempo óptimo de extracción se da a una concentración de 50% V/V de etanol, a un tiempo de extracción de 72 horas y una temperatura de 50 °C, aunque hay una ligera diferencia con la temperatura de 20 °C; esto puede estar relacionado a algunas de las características particulares que pueden contener la variedad de la quinua que se utilizó; los resultados podrían generar otro tipo de investigaciones. Respecto al efecto de la concentración del disolvente puede deberse a la polaridad; los estudios preliminares de Mujica<sup>86</sup> y Güclü-Üstundaga O.<sup>46</sup> indican que las saponinas son altamente solubles en compuestos de baja polaridad como el agua, el etanol y n-butanol ya que la polaridad determina el tipo de fuerza de atracción intermolecular entre la sustancia y el disolvente.<sup>87</sup> Al ser las saponinas altamente solubles en agua y etanol hace fácil su extracción, sin embargo cuando las saponinas

se disuelven en agua pura, si bien la solubilidad es inmediata, el proceso de extracción se vuelve difícil debido a que esa alta solubilidad y las propiedades espumantes de las saponinas evitan la facilidad de la extracción haciendo que se genere una gran cantidad de espuma habiendo errores en la cuantificación; en cambio, con el etanol, que es un poco menos soluble que con el agua, no genera gran cantidad de espuma, por ello, es que se recomienda una mezcla de proporciones iguales en agua y etanol para la extracción de saponinas, quedando las saponinas en el agua al momento de recuperar el etanol.

La poca significancia del efecto de la temperatura puede deberse a que las saponinas son termolábiles, según Estrada<sup>88</sup> las saponinas pierden sus propiedades surfactantes a una temperatura mayor de 70 °C es por eso que en la metodología de extracción no se superó la temperatura de los 60 °C.

### **3.4. Determinación del contenido de saponinas**

#### **3.4.1. Método semi-cuantitativo afrosimétrico: obtención de la curva de calibración.**

De acuerdo a la sección metodológica 2.3.1. anteriormente descrita, se halló la curva de calibración para la determinación cualitativa y semi-cuantitativa o afrosimétrica mediante el índice de espuma; esta característica que tiene la saponina de formar espuma ayuda a predecir si alguna solución contiene este compuesto para su posterior tratamiento. Según Bhargava la capacidad que tiene las saponinas para formar espuma al agitarlas de manera violenta se fundamenta en la propiedad físico – química que tienen las soluciones con saponinas, disminuyen la tensión superficial de las soluciones provocando una altura de espuma por agitación en los tubos de ensayo.<sup>89</sup> La formación de espuma se da en concentraciones bajas es por eso que mediante este método se deduce la presencia o no presencia de saponinas<sup>38</sup> y como

método semi-cuantitativo mediante la medición de la altura que forma la espuma luego de una agitación violenta, como se observa en la Tabla 16, para obtener así una curva de calibración como se ve en la Figura 15 y por lo tanto hallar la concentración aproximada de saponinas en el extracto.

**Tabla 16.** Datos de altura en ‘cm’ obtenidos de la medición de patrones en variación de la concentración de saponinas en el disolvente etanol-agua al 50% V/V.

Concentración de saponinas en solución patrón (mg/mL)	Altura promedio de espuma de saponinas (cm)
0.16	3.43
0.32	5.44
0.48	6.82
0.64	8.46
0.8	9.36

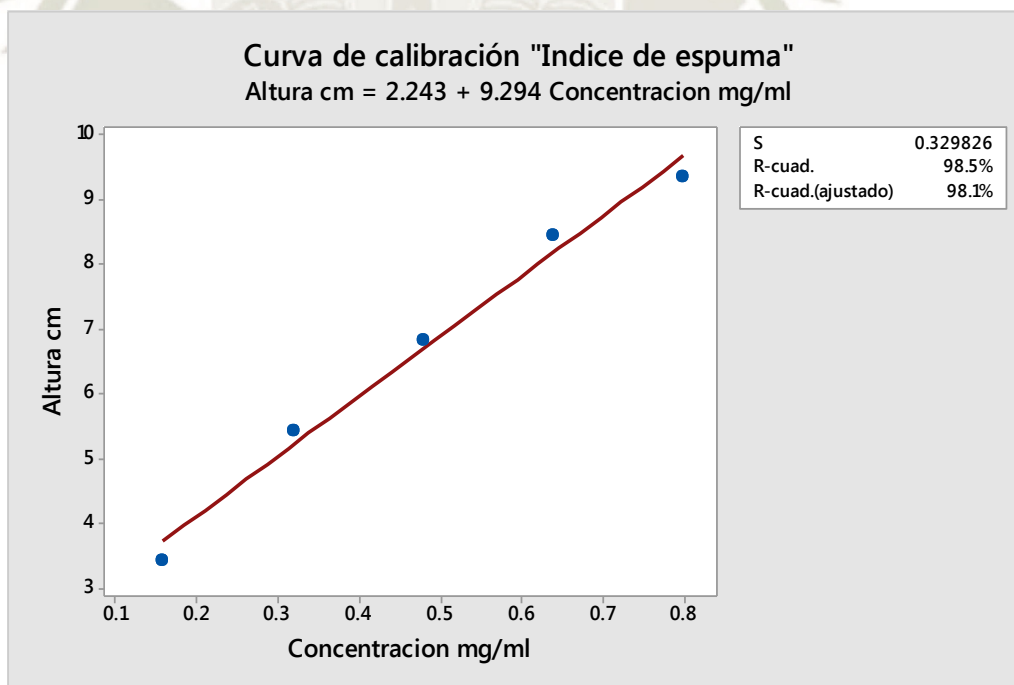
\*La altura promedio de espuma se halló después de la agitación según materiales y métodos (sección 2.3.1.1). Los valores obtenidos son el promedio de tres experimentos bajo las mismas condiciones.

Se obtiene un  $R^2$  de 98.5 % donde se afirma que los estándares preparados no se encuentran dispersos y cumplen con la relación proporcional que existe entre la formación de espuma, representada por la altura medida en centímetros con la concentración de saponinas en el medio acuoso expresada en mg/mL.

La simplicidad del método afrosimétrico hace que tenga problemas al momento de realizarla e interpretar sus resultados. Según German y Rossi la producción y la estabilidad de la espuma depende de la estructura química y su actividad surfactante, también del pH la presencia de sales y el método de agitación.<sup>90</sup> Las condiciones dadas para llevar a cabo el método afrosimétrico fue óptimo porque se produjo una espuma estable y compacta para su medición. Todavía no hay información detallada y específica que compare los perfiles de saponinas entre las variedades de quinua, por lo que la calibración se llevó a cabo a partir de saponinas de la marca SIGMA

obteniendo así resultados más verídicos, descartando las posibles diferencias en los estándares medidos. La curva de calibración de la Figura 15 muestra la nivelación de las alturas a concentraciones superiores a 0.7 mg/mL probablemente se deba a una agitación suficientemente vigorosa para producir mayores alturas de espuma. Es probable que la formación de espuma mejore y aumente si se le agrega mayor cantidad de saponinas; Koziol realizó este estudio con granos de quinua dulce y amarga, obteniendo curvas de calibración óptimas para los granos amargos, pero con varios inconvenientes debido a las variedades de quinua con las que trabajó obteniendo en uno de sus estudios, alturas de espuma altas pero concentraciones bajas.<sup>91</sup>

Este método afrosimétrico estándar fue hecho para medir las saponinas extraídas. El procedimiento dura aproximadamente unos 50 minutos en realizarse por el que se



**Figura 15.** Curva de calibración, método afrosimétrico “Índice de espuma”. Los puntos refieren a la altura de espuma producida a partir de la solución de los estándares de saponinas. La ecuación lineal de la curva se usó para la estimación de la concentración de saponinas como método estándar  $Y = 2.243 + 9.294X$ ,  $r = 0.985$ . con una desviación estándar de

2.36 y un coeficiente de error de 0.305. Donde X es la concentración en mg/mL y Y es la altura medida en centímetros.

considera poco práctico además, la espuma va variando muy rápido y decayendo al transcurrir el tiempo, por consiguiente es poco estable durante su medición; la correlación que se obtiene en la curva de calibración supone una variación de un parámetro, en este caso la altura medida en centímetros de la espuma según el tiempo de extracción; sin embargo, no solo depende del tiempo de extracción (en este caso la agitación que se le da al estándar o a la muestra) sino también de la concentración de la saponina y la facilidad de lixiviación de las saponinas además de las propiedades espumantes de las saponinas presentes en el disolvente. A pesar de sus varios inconvenientes, este método ha sido utilizado con éxito en varios estudios como en investigaciones agronómicas en la clasificación de mas de 5000 especies de quinua.<sup>92</sup>

### **3.5. Metodo cuantitativo espectrofotométrico UV-VIS: obtención de la curva de calibración.**

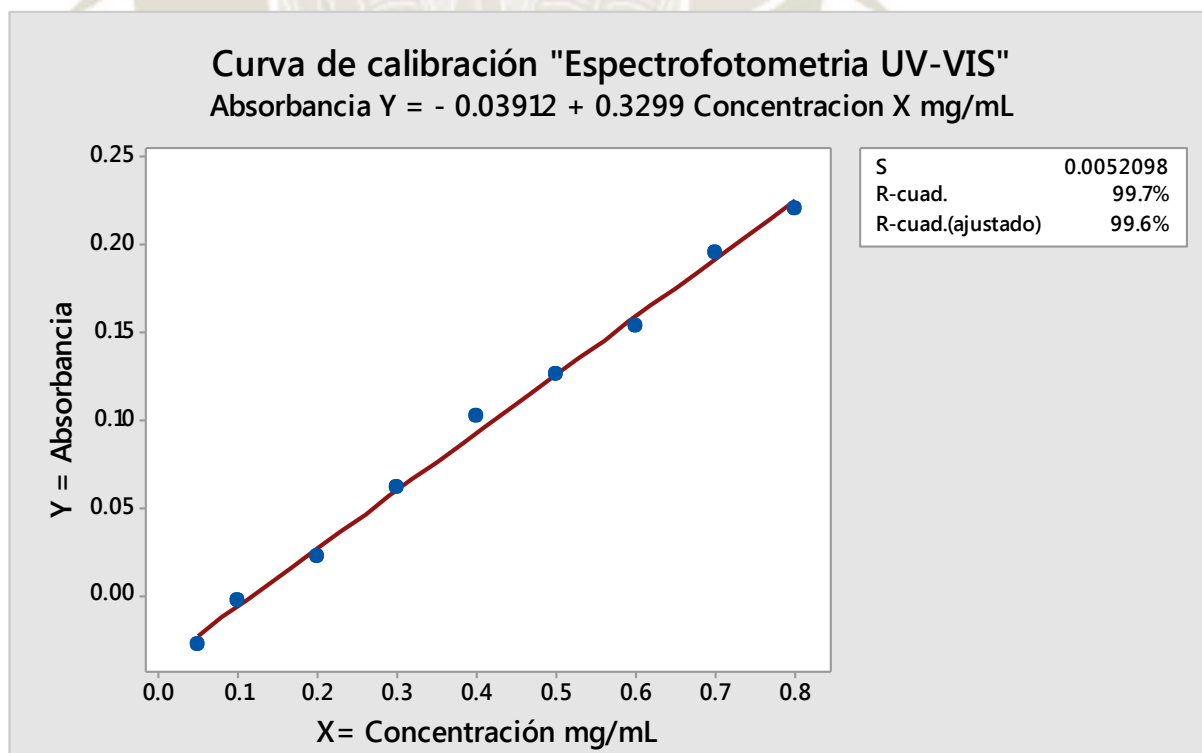
La curva de calibración se realizó usando como blanco etanol al 50% V/V; se prepararon nueve estándares que cubran la mayoría de la escala de concentraciones como se observa en la Tabla 17; de los datos obtenidos se obtuvo la Figura 16 y se puede observar la relación entre la concentración y absorbancia de la solución: la longitud de onda en el espectrofotómetro muestra 518 nm, se asemeja más al resultado de Muñoz<sup>93</sup>, y Guzman<sup>94</sup> quienes obtuvieron 528 nm de longitud de onda a diferencia de Miranda Zea<sup>95</sup>; quien obtuvo 355 nm lo cual es una diferencia considerable. El coeficiente de determinación es cercano al 100% lo cual ayuda a

indicar la relación existente entre la concentración de la muestra y la absorbancia resultante.

**Tabla 17.** Datos obtenidos después de la lectura de absorbancia de los estándares de saponinas en el espectrofotómetro.

Concentración de estándares de saponinas mg/mL	Absorbancia 1 (Primera medición)	Absorbancia 2 (Segunda medición)	Absorbancia 3 (Tercera medición)	Absorbancia promedio final
0.05	-0.027	-0.029	-0.029	-0.028
0.1	-0.002	-0.003	-0.004	-0.003
0.2	0.024	0.023	0.022	0.023
0.3	0.060	0.063	0.062	0.062
0.4	0.103	0.101	0.101	0.102
0.5	0.126	0.125	0.126	0.126
0.6	0.152	0.154	0.155	0.154
0.7	0.197	0.195	0.197	0.196
0.8	0.221	0.220	0.222	0.221

\*Las lecturas espectrofotométricas de los 9 patrones se realizaron por triplicado a 518 nm, hallando al final el promedio de absorbancias los cuales sirvieron para hacer la curva de calibración.



**Figura 16.** Curva de calibración: método de espectrofotometría UV-VIS; habiendo correlación lineal positiva fuerte. Los puntos refieren a la concentración de saponinas en

los estándares de saponinas medidos frente a las absorbancias obtenidas después de la lectura. La ecuación lineal  $y = -0.03912 + 0.3299X$ ; sirvió para obtener la cantidad de saponinas en el extracto;  $r = 0.997$ ; con una desviación estándar de 0.266 y un coeficiente de error de 0.088. Donde Y es la absorbancia obtenida y X es la concentración en mg/mL.

Con los datos obtenidos del análisis estadístico realizado con la técnica espectrofotométrica para cuantificación de saponinas se puede indicar que el valor coeficiente de correlación  $R^2$  se acerca al valor ideal que es 1, lo que indica que la curva de calibración se aproxima a una línea recta aportando una excelente correlación entre las variables de concentración y absorbancia.

La prueba de Liebermann-Burchard se utiliza bastante para la identificación de compuestos triterpenos y esteroidales.<sup>96</sup> En el ensayo el extracto etanol-agua extrajo una gran cantidad de saponinas, los cuales son compuestos triterpénicos, y esto manifestó la reacción el reactivo color Liebermann-Burchard con la solución dando una coloración marrón rojiza lo cual se descarta la presencia de esteroides ya que estos últimos al combinarse con el reactivo color da una coloración azulada.<sup>97</sup> Como anteriormente se describió, los triterpenos son compuestos de 30 átomos de carbono sintetizado a partir del escualeno. Según Ganoza la reacción del reactivo color es comúnmente vista en estructuras que tienen dos dobles enlaces conjugados en un mismo anillo, en dos anillos adyacentes o en un doble anillo adyacente con un grupo hidroxilo. Se conservó un medio anhidro ya que las moléculas de agua reaccionan con el anhídrido acético y anula la reacción con el núcleo triterpenoide, por consiguiente, es necesario hacerlo en medio frío por la posible reacción violenta con el ácido sulfúrico. El fundamento se basa en la formación de un compuesto cromógeno como consecuencia de una reacción entre la saponina, el anhídrido acético y el ácido sulfúrico en una proporción anteriormente descrita. La proporción que se maneja para la identificación de saponinas es de 22.22% y es importante mencionarla porque si

se agrega poco reactivo color es probable que se cometan errores de lectura y quedaría la reacción incompleta; por otra parte, si se añadiera más reactivo del que se necesita, la reacción resultante sería oscura y por lo tanto también habría un error de medición por la desnaturalización de los anillos de genina por acción del ácido sulfúrico.<sup>96,97</sup> Con la técnica realizada no se observó ninguna interferencia con los colores resultantes de la muestra y tampoco con el reactivo color; por consiguiente, los datos obtenidos muestran que la cascarilla de quinua constituye una fuente para la obtención de saponinas.

### **3.6. Comparación final de los datos obtenidos.**

Se realiza la comparación de los datos obtenidos, comparando el peso obtenido por el método semi-cuantitativo y el método cualitativo.

En la Tabla 18 se observa los datos obtenidos de peso de saponina existentes en 100 mL de extracto hidro-alcohólico; los cuales haciendo las respectivas comparaciones se obtuvo, tanto para el método afrosimétrico como el espectrofotométrico, mayor peso de saponinas; tanto para el índice de espuma en el que se obtiene un valor de 0.734 g y en el método espectrofotométrico da un valor de 0.713 g; esto en 100 mL de extracto hidro-alcohólico.

Se realizó un prueba t Student para comparar los dos grupos y se obtuvo un valor  $P(T \leq t)$  dos colas de 0.86 y un valor crítico de t (dos colas) de 2.073; el valor  $t = 0.86$  es mayor a  $\alpha = 0.05$ , por lo que se descarta que las medias muestrales tengan una diferencia significativa, del mismo modo, se infiere que los resultados no son significativos entre ellos (anexo 5). Es decir, los datos obtenidos varían muy poco y por consiguiente ambos métodos se pueden tomar como referente frente a los datos

finales obtenidos al final de la extracción; siendo el método espectrofotométrico más exacto que el afrosimétrico.

**Tabla 18.** Comparación de pesos de saponinas obtenidos en el método semi-cuantitativo o afrosimétrico y en el método espectrofotométrico; ambos pesos de saponinas en 100 mL de extracto hidro-alcohólico.

Número de muestra de extracto hidro-alcohólico con saponinas	Peso de saponina: método semi-cuantitativo en 100 mL del extracto (g)	Peso de saponina: método espectrofotométrico en 100 mL del extracto (g)
<b>I</b> (20:24:20)	0.542	0.449
<b>II</b> (20:24:50)	0.544	0.451
<b>III</b> (20:72:20)	0.538	0.633
<b>IV</b> (20:72:50)	0.475	0.625
<b>V</b> (50:24:20)	0.637	0.513
<b>VI</b> (50:24:50)	0.649	0.513
<b>VII</b> (50:72:20)	0.732	0.704
<b>VIII</b> (50:72:50)	0.734	0.713
<b>IX</b> (80:24:20)	0.481	0.490
<b>X</b> (80:24:50)	0.509	0.491
<b>XI</b> (80:72:20)	0.498	0.602
<b>XII</b> (80:72:50)	0.357	0.602

\*En esta tabla se proporcionan las siguientes condiciones en el experimento. Por ejemplo, para el experimento I: el porcentaje de alcohol es 20%, aplicado a un tiempo de 24 horas y a una temperatura de 20°C. Los valores son el promedio de 3 experimentos desarrollados en las mismas condiciones.

Analizando todos los datos y haciendo las respectivas comparaciones como se muestra en la Tabla 19; se puede decir que tanto el peso final que se obtuvo como crudo de saponinas, el rendimiento de extracción, comparado con los métodos de determinación de saponinas van relacionadas, los resultados obtenidos en el método afrosimétrico y el método espectrofotométrico están relacionados con los datos obtenidos en la extracción del crudo de saponinas en extracto hidro-alcohólico y mucho más con el rendimiento de extracción del proceso.

**Tabla 19.** Datos finales de la obtención de la determinación de saponinas mediante el método semi-cuantitativo o afrosimétrico: índice de espuma, el método cuantitativo: espectrofotometría UV-VIS, el crudo de saponinas al resultante al final de la extracción y el rendimiento del proceso de extracción de saponinas.

Número de muestra de extracto hidro-alcohólico con saponinas	Peso de saponina: método afrosimétrico en 100 mL del extracto (g)	Peso de saponina: método espectrofotométrico en 100 mL del extracto (g)	Crudo de saponinas al final de la extracción (g)	Rendimiento del proceso de extracción de saponinas %
<b>I</b> (20:24:20)	0.542	0.449	0.609	24.356
<b>II</b> (20:24:50)	0.544	0.451	0.301	12.052
<b>III</b> (20:72:20)	0.538	0.633	0.440	17.601
<b>IV</b> (20:72:50)	0.475	0.625	0.798	31.939
<b>V</b> (50:24:20)	0.637	0.513	0.919	36.751
<b>VI</b> (50:24:50)	0.649	0.513	0.994	39.741
<b>VII</b> (50:72:20)	0.732	0.704	1.111	44.432
<b>VIII</b> (50:72:50)	0.734	0.713	1.186	47.429
<b>IX</b> (80:24:20)	0.481	0.490	0.917	36.664
<b>X</b> (80:24:50)	0.509	0.491	0.923	36.933
<b>XI</b> (80:72:20)	0.498	0.602	0.827	33.076
<b>XII</b> (80:72:50)	0.357	0.602	0.912	36.481

\*En esta tabla se dan las siguientes condiciones en el experimento. Por ejemplo, para el experimento I: el porcentaje de alcohol es 20%, aplicado a un tiempo de 24 horas y a una temperatura de 20°C da un peso de saponina en el método afrosimétrico de 0.542 g, en el espectrofotométrico da 0.449 g, el crudo de saponinas obtenido al final de la extracción es de 0.609 y el rendimiento de extracción bajo estas condiciones es de 24.356%. Los valores son el promedio de 3 experimentos desarrollados en las mismas condiciones.

En la Tabla 19, la muestra VIII (50%;72hr;50°C) da como resultados mayores valores, tanto en los métodos de determinación de saponinas como en el crudo de saponinas obtenido al final del proceso después de su secado por consiguiente también el rendimiento del proceso de extracción es mayor de entre todas las muestras realizadas. Con más motivo es necesario incidir que la mejor concentración

de disolvente fue la de 50% V/V etanol-agua, la mejor temperatura de extracción fue de 50°C y el mejor tiempo de agitación fue el de 72 horas. Muy cercano a ese resultado óptimo se tiene a la muestra VII el cual también se puede tomar en cuenta para futuras investigaciones.

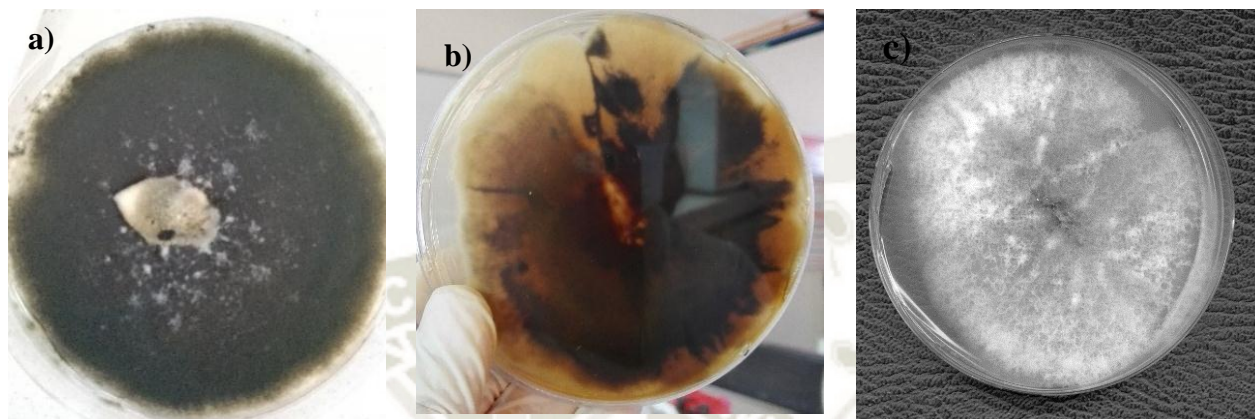
### **3.7. Evaluación antifúngica del extracto de saponinas en hongos fitopatogénicos**

#### **3.7.1. Aislamiento de hongos fitopatogénicos de la planta de *Chenopodium quinoa***

##### **Willd**

Se observó durante aproximadamente tres meses el crecimiento a campo abierto de las plantas de quinua en el distrito de San Salvador Cusco y también en un pequeño huerto también en Cusco como los síntomas de una infestación por hongos iba enfermando a las plantas, como en la Figura 10 de la metodología muestra, manchas foliares y tallos con zonas necrosadas fueron el punto clave para el aislamiento de los hongos en una cámara húmeda en los laboratorios de la universidad Católica de Santa María. Al realizar el aislamiento de cada órgano de la planta en la cámara húmeda, trajo consigo un problema, hubo una gran cantidad de hongos y bacterias creciendo en el medio PDA por más que se usó hipoclorito de sodio al limpiar los tejidos vegetales. Por lo tanto, se hizo tres réplicas del aislamiento de hongos fitopatogénicos a partir de los tejidos vegetales, tomando en cuenta los síntomas que presentaban cada órgano de la planta. También se aisló en medio Agar Sabouraud cloranfenicol como medio específico de aislamiento. Como resultados del aislamiento de hongos fitopatogénicos a partir de raíz, tallo y hojas de la planta de *Chenopodium quinoa* W. se obtuvo a los hongos, *Alternaria sp.*, y *Fusarium sp* los cuales se muestran en la Figura 17 y 18. La cámara húmeda después de cinco días a temperatura de 22 °C dio como resultados una variedad de hongos en crecimiento los cuales al prepararse el

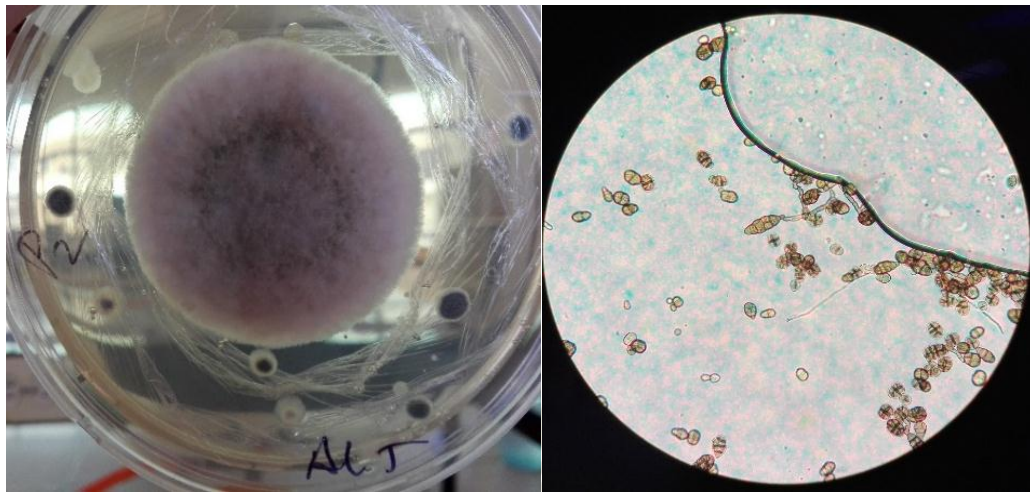
medio PDA selectivo pudo obtenerse dos tipos de hongos a partir del aislamiento. En la Tabla 20 y 21 se realizó la caracterización macroscópica y microscópica para aquellos hongos aislados en medio PDA.



**Figura 17.** Fotografías de aislamiento de hongos fitopatógenos obtenidos después de su caracterización macro y microbiológica: a) y b) *Alternaria sp.* c). *Fusarium sp.* ambos sembrados en medio PDA después de 10 días de incubación.

**Tabla 20.** Descripción macroscópica y microscópica de los hongos aislados a partir de hojas y tallos seccionados de *Chenopodium quinoa* Willd.

Hongo	Característica Macroscópica	Característica Microscópica
<i>Alternaria sp.</i>	Micelio aéreo, algodonoso, bien desarrollado. Color inicial blanco grisáceo que pronto cambia a marrón oscuro, bordes enteros bien definidos reverso tiene rojo purpura a negro.	Características macroscópicas: Características microscópicas: Hifas de color amarillo castaño claramente septadas. Formación de cadenas de macroconidias multicelulares que están separadas por tabiques transversales y longitudinales (muriforme). Las macroconidias tiene forma similar a palillos de tambor, con el cabo elongado de una conidia contra el extremo redondeado.

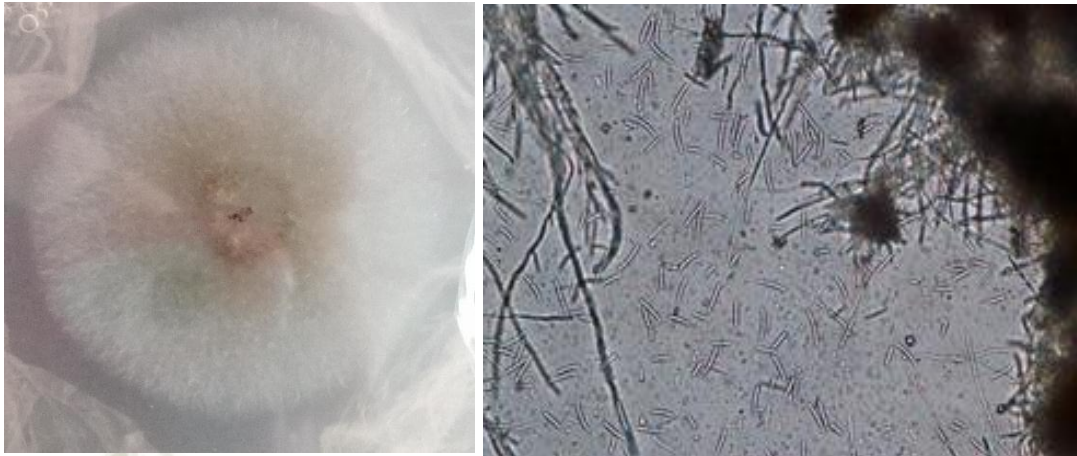


**Figura 18.** Vista macroscópica y microscópica del hongo *Alternaria sp.* aislado a partir de hojas de *Chenopodium quinoa* Willd.

Del aislamiento de *Alternaria sp.*, se tuvo en cuenta la forma de las conidias, estudios preliminares se basan en la morfología de estas para reconocerlas y clasificarlas.

**Tabla 21.** Descripción macroscópica y microscópica de los hongos aislados a partir de hojas y tallos seccionados de *Chenopodium quinoa* Willd. (continuación)

Hongo	Característica Macroscópica	Característica Microscópica
<i>Fusarium sp.</i>	Las colonias son vellosas a algodonosas y aparecen con micelio hialino de color blanco crema a color salmón con el reverso incoloro a beige oscuro.	Esporas descoloridas (conidios) que se forman en vista lateral, la presencia de macroconidios falciformes con varios septos en los que exhiben una especie de muesca en forma de celula pie, la muesca se encuentra en el extremo que se implanta en el esporoforo.



**Figura 19.** Vista macroscópica y microscópica del hongo *Fusarium sp.* aislado a partir de hojas de *Chenopodium quinoa* Willd.

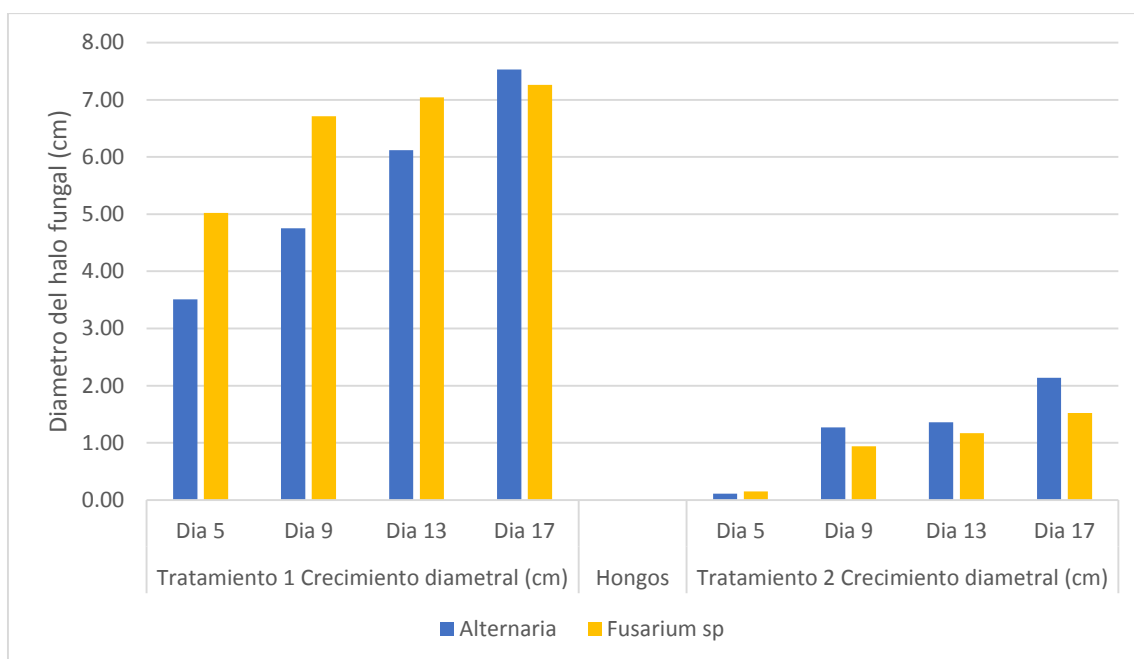
### 3.7.2. Prueba preliminar de evaluación anti fúngica: Crudo de saponinas vs Extracto hidro-alcohólico con saponinas

La evaluación preliminar como se describe en la metodología 2.6.1. se divide en dos tratamientos: tratamiento 1 que consiste en la dilución del crudo de saponinas en polvo obtenido al final del proceso de extracción anteriormente descrita en el medio PDA esteril y el tratamiento 2 que consiste en el extracto hidro-alcohólico obtenido durante la optimización del proceso 50 %V/V de disolvente etanol-agua, a 72 horas de agitación y a 50 °C. La evaluación preliminar se hizo en las dos cepas fungales encontradas, esta prueba se realizó por triplicado para óptimos resultados.

En la prueba preliminar se determinó qué tipo de tratamiento se maneja, siendo el tratamiento 1 el crudo de saponinas en medio PDA y el tratamiento 2 el extracto etanólico de saponinas; el extracto que se utilizó en el tratamiento 2 fue la obtenida anteriormente 50 %V/V a 72 horas y 50 °C solo que este extracto fue filtrado y centrifugado para su uso como agente antifúngico.

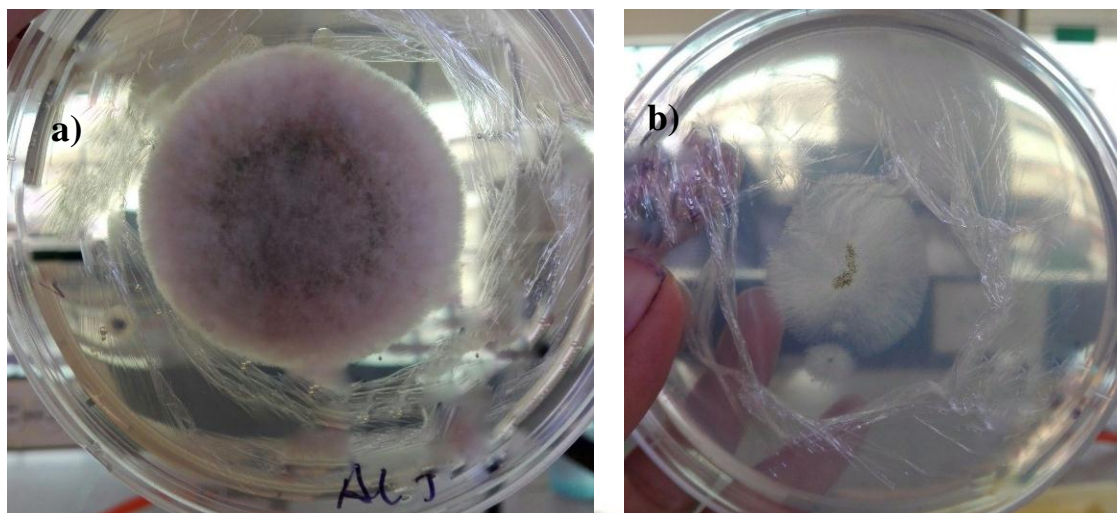
Como se observa en la Figura 20, el crecimiento del hongo es mucho mayor con el

tratamiento 1 (crudo de saponinas en polvo en medio PDA) que con el tratamiento 2 (extracto hidro-alcohólico de saponinas en medio PDA), las posibles causas podrían ser la falta de refinamiento del crudo de saponinas, debido a que éste para su secado estuvo expuesto a un ambiente poco estéril y es posible que esté contaminado.



**Figura 20.** Comparación de crecimiento de halo fungal de crudo de saponinas obtenidas al final de la extracción (tratamiento 1) vs saponinas en extracto hidro-alcohólico (tratamiento 2) con respecto a los hongos *Alternaria sp.* y *Fusarium sp.* Se tomó en cuenta el número de días al que se sometió a los hongos al tratamiento y el diámetro de crecimiento del hongo medido en centímetros.

Esto seguido de un análisis ANOVA y una prueba Tukey los cuales indican que el mejor tratamiento a seguir es el tratamiento 2. El tratamiento 2 tiene mayor efecto por el uso de saponinas con el etanol, si bien las saponinas tienen una función fungicida como se demostró en el tratamiento 1, el alcohol le da una mayor efectividad, se observa en la Figura 21. Según Block<sup>98</sup>, el etanol es universalmente conocido como desinfectante debido a su multiplicidad de efectos tóxicos. Diversos estudios como el de McDonnell y Russell<sup>99</sup> sugieren que, aunque la naturaleza específica o el sitio de acción del etanol no se conoce completamente, la teoría más



**Figura 21.** Prueba preliminar antifúngica en el día 9: **a)** crudo de saponinas obtenidas al final de la extracción (tratamiento 1) en *Alternaria sp.* vs **b)** saponinas en extracto hidro-alcohólico (tratamiento 2) en *Alternaria sp.*

ampliamente adoptada es que el etanol actúa a través de la coagulación/desnaturalización de las proteínas y el daño de la membrana, interfiriendo con el metabolismo y causando la lisis celular; aunque esta teoría es inconsistente aún se utiliza el etanol al 70 % como agente fungicida en muchas plantas. Sequeira<sup>98</sup> realizó un estudio donde se probaba el crecimiento o no del *Penicillium chrysogenum* en un periodo de 14 días y demostró que no hay crecimiento a partir de una concentración del 20 % de etanol. También demuestra que si la conidia entra en contacto con el etanol la germinación del hongo se demora en un 30 %, esto medido en un periodo de 5 días comparado con el no uso del etanol. También se probaron en soluciones etanólicas a concentraciones de 30, 70 y 100% los cuales mostraron propiedades antifúngicas pero al momento de la reinoculación se probó que en un rango de 50 a 80 % de concentración de etanol ya no existía un crecimiento del hongo por un periodo de 30 días. Es por esto que para las siguientes

pruebas se usará el extracto etanólico hallado anteriormente: saponinas en disolvente etanol-agua al 50%, agitado previamente durante 72 horas a 50°C.

### 3.8. Evaluación inhibidora de los hongos aislados con el tratamiento 2:

**Saponinas en extracto hidro-alcohólico al 50 %V/V, con tiempo de agitación de 72 horas a 50°C.**

#### 3.8.1. Evaluación antifúngica de *Alternaria sp.*

Se realizó la dilución de placa y siembra por punción de cada hongo aislado, con una alícuota de extracto etanólico de saponinas en medio estéril. Es decir, en 500 mL de medio PDA se diluyó distintas alícuotas del extracto etanólico, repartiendo 100 mL para cada alícuota siendo el volumen final para cada placa unos 20 mL. Previamente se halló el contenido de saponinas en cada alícuota de extracto etanólico que se utilizó, la cual se representa en la Tabla 22.

**Tabla 22.** Volumen de la alícuota de saponinas en extracto hidro-alcohólico al 50% y el respectivo peso de saponinas dentro de la alícuota para la dilución en el medio PDA y evaluar la actividad antifúngica tanto de *Alternaria sp.* como *Fusarium sp.*

Volumen de alícuota de saponinas en extracto hidro-alcohólico 50% (mL)	Peso de saponinas en la alícuota (mg)
1.50	17.78
3.50	41.48
5.50	65.18
7.50	88.88

Se tomó como variable de estudio la concentración de extracto hidro-alcohólico con saponinas en el medio PDA para que pueda cumplir su función de fungicida o su

capacidad antifúngica; para ello la concentración que se maneja en la Tabla 23 es resultado de la división de la alícuota con el total de medio PDA que se usa en cada muestra.

**Tabla 23.** Variables a manejar en base a la concentración de saponinas tanto de extracto hidro-alcohólico en medio PDA y la respectiva concentración de saponinas en medio PDA, dando así a las variables nombres como C1, C2, C3 Y C4 los cuales se manejaron para evaluar el porcentaje de inhibición de *Alternaria sp.* y *Fusarium sp.*

<b>Variables</b>	<b>Concentración de extracto hidro-alcohólico de saponinas en medio PDA (% V/V)</b>	<b>Concentración de saponinas en medio PDA (mg/mL)</b>
<b>Concentración 1 (C1)</b>	1.5	0.1778
<b>Concentración 2 (C2)</b>	3.5	0.4148
<b>Concentración 3 (C3)</b>	5.5	0.6518
<b>Concentración 4 (C4)</b>	7.5	0.8888

\*Las variables que se manejaron se basan en las concentraciones del extracto hidro-alcohólico en el medio PDA; por ejemplo, para C1 corresponde una alícuota de 1.5 mL en 100 mL dando una concentración de 1.5 % V/V de extracto y que a su vez contiene 0.1778 mg/mL de saponinas en el medio.

Teniendo estas variables de concentración de saponinas en medio PDA, siendo la de menor concentración C1 = 0.1778 mg/mL, y la de mayor concentración C4 = 0.8888 mg/mL de saponinas en medio PDA se estableció el número de días para su crecimiento en condiciones óptimas, los cuales fueron de 12 días, siendo el último día de lectura. Manejando estas variables de concentración de saponinas en medio PDA se obtuvo el crecimiento de un halo hifal, el cual fue examinado en los días 5, 7, 9 y 12; midiendo el diámetro del halo en crecimiento en centímetros. Los resultados se observan en la Tabla 24.

**Tabla 24.** Datos obtenidos después de la medición del halo de inhibición de *Alternaria sp.* para cada variable de concentración de saponinas en medio PDA durante los días 5, 7, 9 y 13; comparados a un grupo control positivo (C+ extracto-Mancozeb) que es el extracto con Mancozeb (antifúngico agrario) y un control negativo (C- agua) en el cual solo es extracto de saponinas y agua esteril.

Día	C1 0.1778 mg/mL de saponinas en medio PDA (cm)	C2 0.4148 mg/mL de saponinas en medio PDA (cm)	C3 0.6518 mg/mL de saponinas en medio PDA (cm)	C4 0.8888 mg/mL de saponinas en medio PDA (cm)	C+ extracto – Mancozeb (cm)	C- agua (cm)
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.34
7	0.15	0.00	0.10	0.16	0.00	1.87
9	0.22	0.15	0.00	0.00	0.10	4.14
13	0.34	0.00	0.00	0.00	0.00	5.10

\*Cada experimento se efectuó bajo las mismas condiciones siguiendo el procedimiento explicado en materiales y métodos. En esta tabla se proporcionan los datos obtenidos después de un número determinado de días de incubación, por ejemplo, en el día 5 a 0.1778 mg/mL de saponinas (C1) no presenta crecimiento de halo fungal; en el día 7 a 0.1778 mg/mL de saponinas (C1) presenta 0.15 cm de crecimiento de halo fungal; comparado con el control positivo –Mancozeb en cual tampoco se obtuvo crecimiento y el control negativo el cual si creció 0.34 cm. Los valores mostrados son el resultado del promedio después de tres repeticiones.

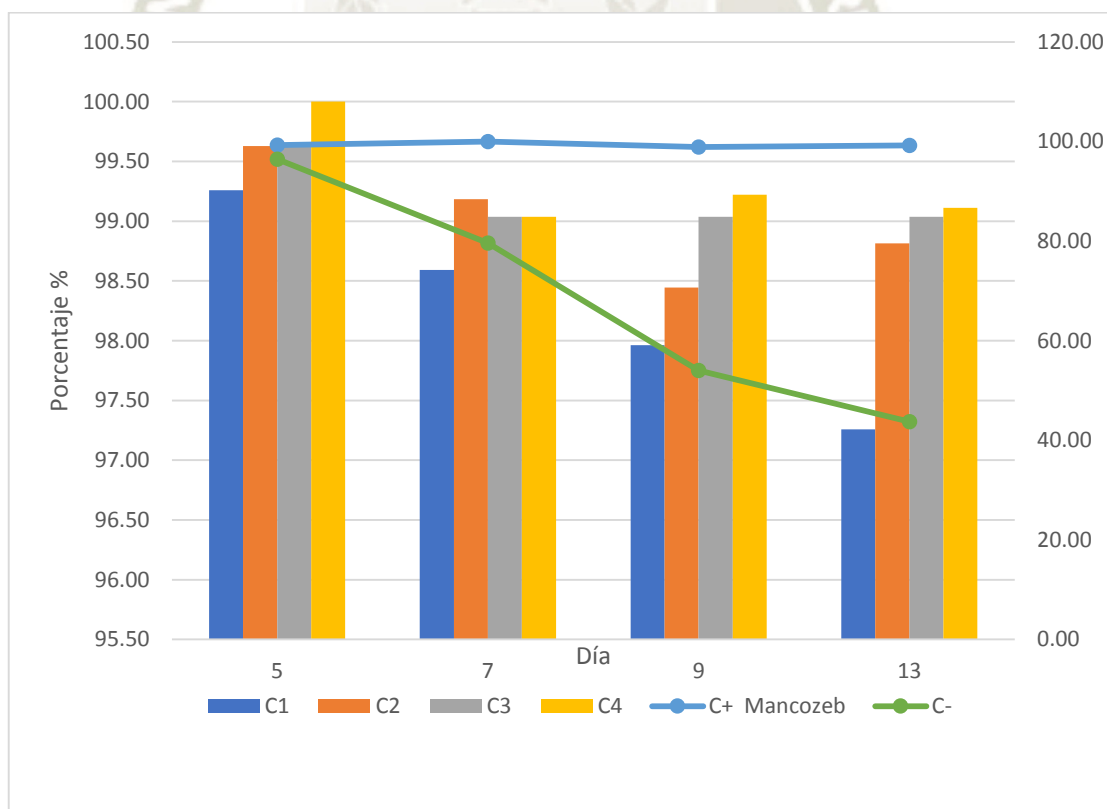
El control positivo es la alícuota del extracto con Mancozeb® que es un pesticida empleado en la agricultura para evitar las manchas foliares y podredumbre en los tallos. Se hizo tres réplicas para evaluar la evaluación antifúngica de los extractos y se halló el porcentaje de inhibición micelial siendo 9 cm el 100 % porque ese es el diámetro de la placa; en la Tabla 25 se expresa los porcentajes convertidos a partir de la Tabla 24.

**Tabla 25.** Porcentaje de Inhibición micelial (%) obtenidos a partir de la Tabla 22, tomando en cuenta que el diámetro de la placa es el 100% en *Alternaria sp.*

Porcentaje de inhibición en <i>Alternaria sp.</i>						
Día	C1 0.1778 mg/mL de saponinas en medio PDA (%)	C2 0.4148 mg/mL de saponinas en medio PDA (%)	C3 0.6518 mg/mL de saponinas en medio PDA (%)	C4 0.8888 mg/mL de saponinas en medio PDA (%)	C+ extracto – Mancozeb (%)	C- agua (%)
5	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	96.22
7	98.33	100.00	98.89	98.22	100.00	79.22
9	97.56	98.33	100.00	100.00	98.89	54.00
13	96.22	100.00	100.00	100.00	100.00	43.33

\*En esta tabla se proporcionan los valores obtenidos después de convertirlos a porcentaje de inhibición a partir de la tabla 24. Por ejemplo, en el día 5 a una concentración de 0.1778 mg/mL de saponinas (C1) presenta el 100 % de inhibición de *Alternaria sp.* esto comparado con el control positivo que también presenta el 100 % de inhibición y el control negativo que presenta una inhibición de 96.22%. Los valores mostrados son el resultado del promedio después de tres repeticiones.

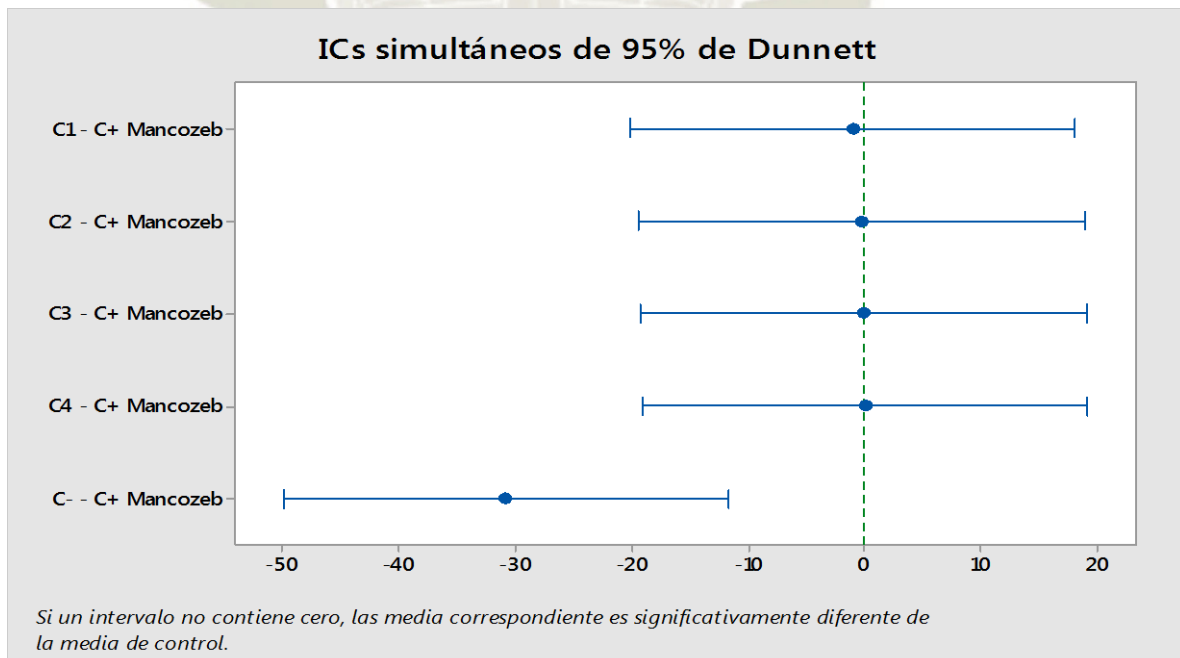
Después de obtener el porcentaje de inhibición se determinó que el extracto hidroalcohólico de saponinas tiene un alto efecto frente al grupo control. El fitopatógeno sin aplicación del extracto presentó mayor crecimiento casi llegando a un 40% lo cual mostró las diferencias significativas con relación a los tratamientos con el extracto hidroalcohólico de saponinas. Resultó interesante que a partir de la concentración 2 (C2) el cual tiene una concentración de 0.4148 mg/mL de saponinas en el medio PDA presentó un efecto inhibitorio significativamente igual que con las siguientes concentraciones C3 Y C4 (0.6518 mg/mL y 0.8888 mg/mL) de saponinas en el medio. La Figura 22 muestra un alto porcentaje de inhibición durante el día 5; es mayor porque está cerca del día cero y conforme avanza los días esa inhibición va disminuyendo.



**Figura 22.** Gráfica de la media del porcentaje de inhibición micelial de las distintas concentraciones de saponinas en el medio PDA frente al hongo *Alternaria sp.* en el cual a partir de la concentración C2 de saponinas (0.4148 mg/mL, barra anaranjada) se obtiene mayor porcentaje de inhibición.

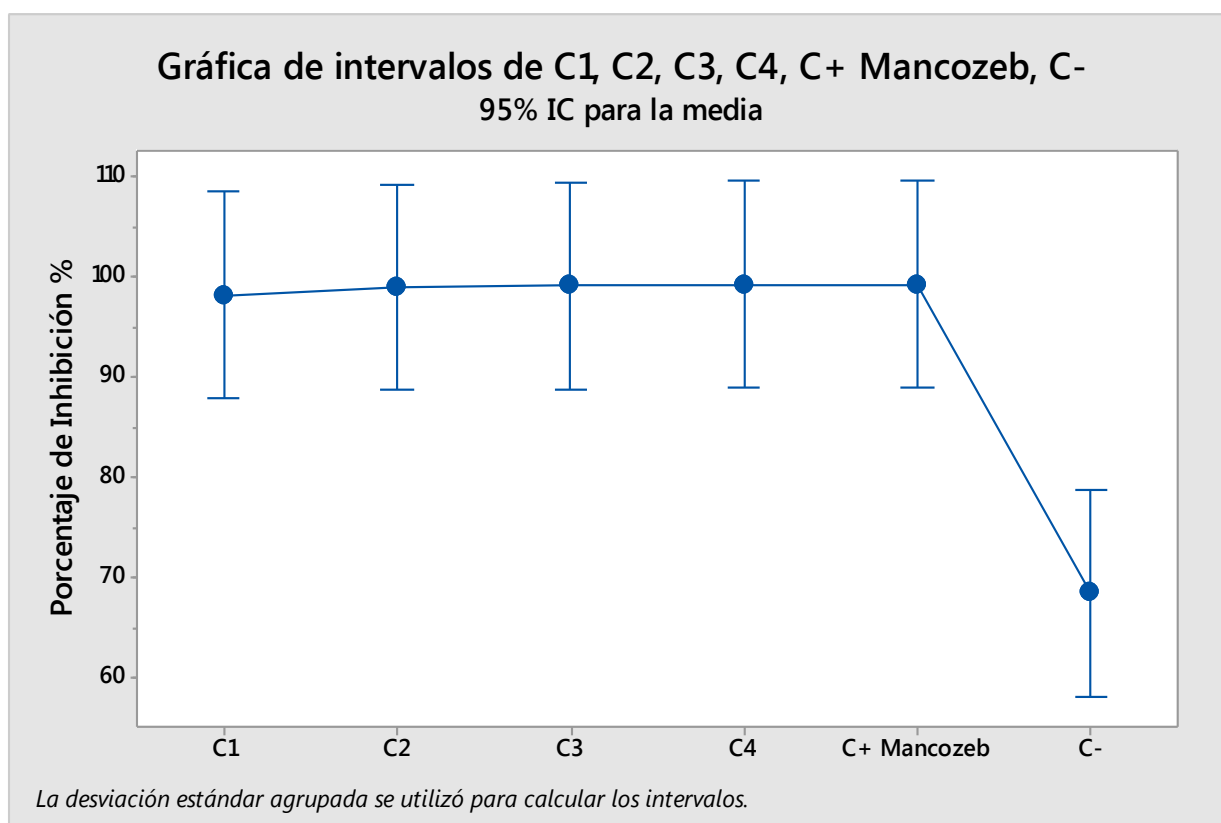
Pero dentro del subgrupo, los de mayor porcentaje de inhibición la tiene la concentración 4 (C4) con una concentración de saponinas de 0.8888 mg/mL en el medio de cultivo.

Se realizó un análisis ANOVA de los resultados obtenidos seguido de una prueba de Tukey y la prueba de Dunnett (anexo 6); ya que el método de Dunnett compara la media de cada nivel con la media del grupo control, se obtiene que solo la variable de concentración 1 (C1) con una concentración de saponinas de 0.1778 mg/mL, es significativamente diferente, esto debido a que es menor la concentración de saponinas que se tiene en el medio y por ello con el paso de los días se obtiene mayor crecimiento hifal sin que pueda inhibirse por completo, lo contrario a las concentraciones como C2, C3 y C4 (0.4148; 0.6518 y 0.8888 mg/mL) las cuales al tener mayor concentración de saponinas en el medio PDA hay mayor porcentaje de inhibición al pasar los días; esto también se demuestra en la Figura 23.



**Figura 23.** Gráfica de intervalos de confianza de 95% de Dunnett que compara las diferencias entre las medias de cada variable de concentración obtenida frente a la media del grupo control, en esta gráfica el intervalo del control negativo (C-) no contiene 0, por lo que es significativamente diferente al resto de variables.

Las gráficas de intervalos tanto de la Figura 23 como de la Figura 24 muestra como resultado que la variable de concentración C1 de saponinas en medio PDA es diferente al resto; como anteriormente se describió puede deberse a la menor cantidad de saponinas que existe en la alícuota del extracto hidro-alcohólico usada.



**Figura 24.** Gráfica de intervalos de las variables de concentración de saponinas en medio PDA: C1, C2, C3 Y C4 en comparación con el grupo control (Extracto + Mancozeb) en *Alternaria sp.* Esta gráfica apoya a Figura 23 y por lo tanto a los resultados obtenidos en la Tabla 23, se observa un ligero incremento en el porcentaje de inhibición frente al grupo control positivo y negativo.

Según los datos resultantes los extractos de saponinas obtenidos a partir de la cascarilla de quinua cumplen con una función inhibitoria para controlar las enfermedades producidas por *Alternaria sp.* y no solo en la planta de *Chenopodium quinoa* Willd, sino que es probable que sirva para inhibir el crecimiento de *Alternaria sp.* en otras plantas que con facilidad se contagien con este hongo fitopatgeno.

### 3.8.2. Evaluación antifúngica de *Fusarium sp.*

Se realizaron tres ensayos para cada hongo aislado y para cada ensayo se tomaron cuatro mediciones (5, 7, 9 y 12 días) donde se midió el diámetro de crecimiento en centímetros (cm) y esta a su vez fue convertida a porcentaje de inhibición siendo el total de la placa el 100% de inhibición; los datos obtenidos se muestran en la Tabla 26.

**Tabla 26.** Media de porcentaje de inhibición con variables de concentración de saponinas en medio PDA en *Fusarium sp.*

Porcentaje de Inhibición % para <i>Fusarium sp.</i>						
Día	C1 0.1778 mg/mL de saponinas en medio PDA (%)	C2 0.4148 mg/mL de saponinas en medio PDA (%)	C3 0.6518 mg/mL de saponinas en medio PDA (%)	C4 0.8888 mg/mL de saponinas en medio PDA (%)	C+ extracto – Mancozeb (%)	C- agua (%)
5	73.33	80.56	86.00	89.78	93.11	59.89
7	75.67	77.89	82.67	87.33	87.56	42.33
9	67.67	77.44	86.22	86.89	83.67	20.67
13	55.44	71.56	87.56	88.33	76.11	6.11

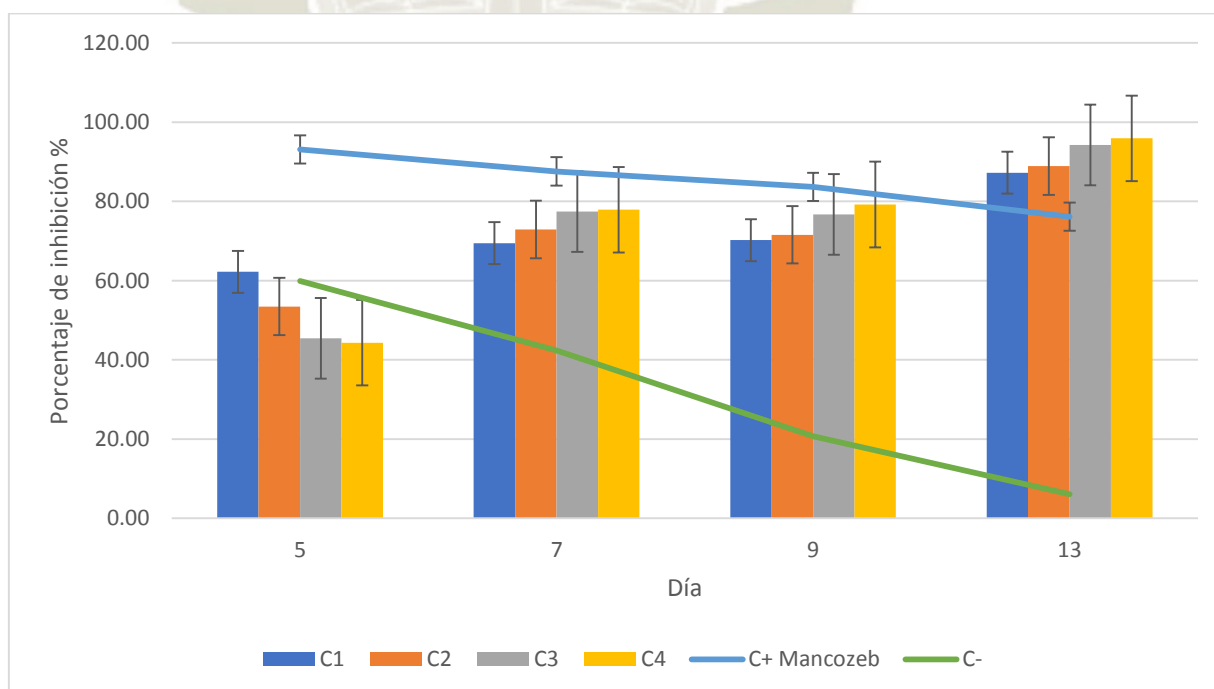
\*Cada experimento se efectuó bajo las mismas condiciones siguiendo el procedimiento explicado en materiales y métodos. En esta tabla se proporcionan los datos obtenidos después de un número determinado de días de incubación; por ejemplo, en el día 5 a 0.1778 mg/mL de saponinas (C1) presenta una inhibición del 73.33 % de *Fusarium sp.*; para 0.4148 mg/mL de saponinas en el medio presenta una inhibición del 80.56%; para 0.6518 mg/mL de saponinas en el medio presenta una inhibición del 86.00% y para una concentración de 0.8888 mg/mL de saponinas en el medio presenta una inhibición de 89.78% siendo esta la mayor de entre las cuatro variables, comparadas con el control positivo-Mancozeb que tiene una inhibición del 93.11 y en el control negativo tiene una inhibición de 59.89%.

Se realizó un análisis de varianza a los valores obtenidos del porcentaje de inhibición donde el valor p dado es de 0.05; el análisis da como resultado que el valor p obtenido es de 0.001 lo cual es menor, estadísticamente uno de los factores o variables estudiados tiene un efecto significativo en la inhibición del hongo *Fusarium sp.*

Los ensayos que se realizaron sobre el crecimiento *Fusarium sp.* en medio PDA con extracto hidro-alcohólico con saponinas se muestran en la Figura 26, los cuales no poseen una total capacidad inhibitoria en el crecimiento del hongo *Fusarium sp.* ya que depende mucho de la cantidad del extracto de saponinas que se agrega al medio

de cultivo; por lo tanto, se halló que a mayor volumen concentración de saponinas en medio PDA, mayor será la capacidad de inhibición. Apablaza<sup>100</sup> estudió los efectos de productos comerciales teniendo como base a las saponinas de quillay (*Quillaja saponaria*) y encontró que la capacidad de inhibición promedio fue de 37.9% y 42% para oídio, que es un hongo ectoparásito, en zapallo. Los resultados obtenidos pueden depender del tipo de investigación que se realiza, dando resultados diferentes; Apablaza<sup>100</sup> lo realizó en invernadero y Coello<sup>101</sup> in vitro.

La Figura 26 indica que existe una notoria diferencia frente a grupos control, mientras que el grupo control positivo es el medio PDA con extracto reforzado con Mancozeb, dando como resultado una mayor inhibición al pasar los días, se podría decir que el crecimiento se detuvo a diferencia de los otros grupos en los que se varía el volumen de extracto en medio, el crecimiento hifal en todos los medios fue mayor en aquellas en las que la alícuota de extracto fue menor.



**Figura 25.** Gráfica de la media del porcentaje de inhibición micelial de las distintas concentraciones de saponinas en el medio PDA frente al hongo *Fusarium sp.*

Se hace las comparaciones múltiples de Dunnett (anexo 7) y da como resultado que aquellas que no comparten la misma agrupación son diferentes a la media. Los resultados son complementarios a estudios realizados anteriormente y ofrecen mayores fundamentos para utilizar los residuos del escarificado de quinua durante su proceso; la prueba de Dunnett ofrece un mayor análisis con respecto al grupo control ya que se encarga de hacer la comparación entre grupos; la Tabla 27 y 28 demuestra que la agrupación asignada va de acuerdo con el grupo control y solo la variables de concentración de saponinas en medio PDA C2, C3 y C4 mas no C1 son significativamente diferentes, esto podría deberse a la menor cantidad de contenido de saponinas en el medio de cultivo PDA.

**Tabla 27.** ANOVA unidireccional para variables de concentración de saponinas en medio PDA: C1, C2, C3 y C4 en el que el valor p es menor a 0.05; lo cual significa que uno de los valores obtenidos es significativamente diferente.

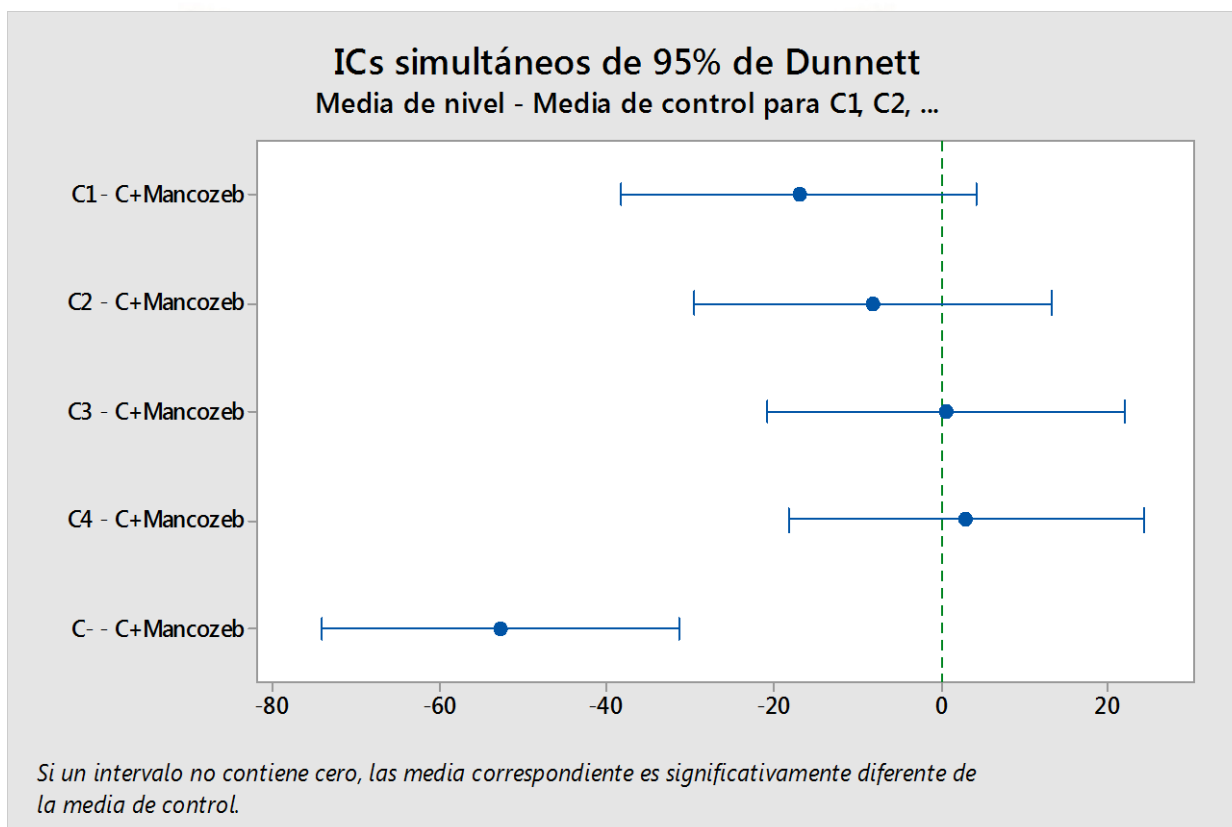
FUENTE	GL	SC AJUST.	MC AJUST.	VALOR F	VALOR P
FACTOR	4	1093.6	273.41	8.93	0.001
ERROR	15	459.1	30.61		
TOTAL	19	1552.7			

**Tabla 28.** Las comparaciones multiples de Dunnett ayudan a diferenciar aquellas medias que son significativamente diferentes dentro de una muestra.

Variable	N	Media	Agrupación
C- agua	4	32.3	B
C+ Extracto -Mancozeb	4	85.11	A
C4: 0.8888 mg/mL de saponinas en medio PDA	4	88.083	A
C3: 0.6518 mg/mL de saponinas en medio PDA	4	85.61	A
C2: 0.4148 mg/mL de saponinas en medio PDA	4	76.86	A
C1: 0.1778 mg/mL de saponinas en medio PDA	4	68.03	B

\*La variable de concentración de saponinas en medio PDA (C1) y el control negativo (C-) son significativamente diferentes y es por eso que se les asigna una letra diferente frente (B) a las otras variables de concentración. (C2, C3, C4 Y C+ Extracto –Mancozeb).

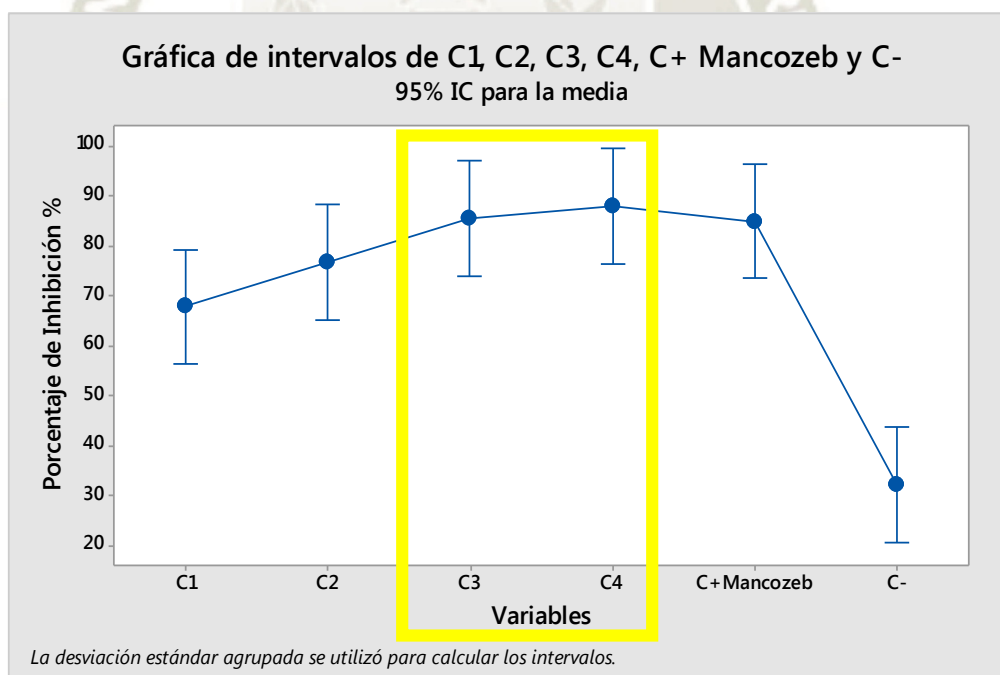
La Figura 27 de intervalos de confianza demuestra que tan alejadas están las variables de concentración de saponinas en medio PDA: C1 y C2 de los que están las otras variables C3 y C4, esto quiere decir que para mejores resultados es conveniente usar a partir de de extracto hidro-etanólico con saponinas en el medio para la inhibición de *Fusarium sp.*



**Figura 26.** Gráfico de intervalos de confianza de Dunnett: esta gráfica muestra que tan alejadas están las medias de 0, en este caso tanto C1 y C2 se van alejando considerablemente de 0 lo cual aporta nuevamente que a partir de C3 y C4 (0.6518 y 0.8888 mg/mL) es cuando existe una mayor inhibición de *Fusarium sp.*

Según el análisis efectuado se encontró que la aplicación de mayores concentraciones de saponinas del extracto de hidro-alcohólico al 50% V/V es bastante significativo para una mayor inhibición de *Fusarium sp.* lo cual deja fuera de un resultado óptimo a la variable de concentración de saponinas de C1 (0.1778 mg/mL) porque tiene menor cantidad de saponinas en la alícuota utilizada a partir del extracto y por lo tanto tendrá menor cantidad de saponinas en el medio de cultivo y eso también aplica

para la variable de concentración de saponinas en medio PDA: C2 (0.4148 mg/mL). Los demás datos: C3 y C4 (0.6518 y 0.8888 mg/mL) reducen significativamente el crecimiento y desarrollo de *Fusarium sp.* al pasar los días; la Figura 28 de intervalos de confianza de Dunnett muestra a un alejado grupo control negativo, frente al grupo control positivo; haciendo las respectivas comparaciones tanto las variables de concentración de saponinas en medio PDA C3 y C4 (0.6518 y 0.8888 mg/mL) se aproximan a la media del control positivo; mientras que la variables de concentración de saponinas en medio PDA C2 y C1 (0.1778 y 0.4148 mg/mL) se van alejando del punto medio. Lo cual quiere decir que son significativamente diferentes, es decir no existe mucha inhibición del extracto hidro-etanólico con saponinas frente al hongo *Fusarium sp.*



**Figura 27.** Intervalos de factor C1 (0.1778 mg/mL), C2 (0.4148 mg/mL), C3 (0.6518 mg/mL) y C4 (0.8888 mg/mL) al 95 %; los cuales tanto C3 y C4 demuestran un mayor porcentaje de inhibición frente a *Fusarium sp.*

Los ensayos realizados *in vitro* sobre la evaluación de la inhibición del crecimiento de *Alternaria sp.* y *Fusarium sp.* en medios con extractos de saponinas de cascarilla

de quinua muestra que poseen una inhibición incompleta en el crecimiento de estos microorganismos; según las variables estudiadas depende mucho de la concentración de saponinas en el medio PDA o del volumen de la alícuota del extracto hidroalcohólico que se maneja; lo cual lo convierte en una proporción directa, a mayor concentración de extracto de saponinas, hay mayor porcentaje de inhibición de los microorganismos (Figura 22 y 25).

Apablaza<sup>100</sup> realizó otro estudio de efectos inhibitorios en los cuales se usaron productos comerciales a base de saponinas pero de la quillay, *Quillaja saponaria*, ya que esta planta contiene el mayor porcentaje de saponinas a diferencia de la quinua (*Chenopodium quinoa* W.) Los resultados obtenidos por Apablaza muestran una inhibición promedio de 37.9% y 41.7% para pepino y zapallo respectivamente.<sup>102</sup>

De acuerdo con Hodges<sup>103</sup> *Chenopodium quinoa* Willd posee una reacción de defensa contra los hongos fitopatógenos que no solo están en la cascarilla de la quinua sino en todos los órganos de la planta; las propiedades fungicidas más fuertes se encuentran en los tallos muy cerca de la panícula.<sup>104</sup> Singh, encontró que los órganos de las plantas más viejas como por ejemplo la corteza exterior de los tallos y la cascarilla<sup>105</sup> de los granos maduros poseen mayores cantidades de taninos y polifenoles solubles en agua. Esto les confiere junto a las saponinas un alto poder antimicrobiano.<sup>14</sup>

Bokhari reporta que la actividad biológica del extracto de *Chenopodium quinoa* Willd no solo depende de la parte de la planta que se estudia sino también del solvente que se utiliza para su preparación y la concentración de éste.<sup>106</sup> Comparado con otros estudios, el extracto acuoso es un poco débil a diferencia de otros extractos con

solventes orgánicos, es por eso que se usa etanol y agua para la extracción de saponinas y para analizar la inhibición de los hongos fitopatógenos.<sup>107</sup>

Estudios previos argumentan que existe una notable diferencia entre saponinas monodesmosídicas y bidesmosídicas debido a que cada una tiene diferente actividad fungicida, siendo la monodesmosídica la de mayor actividad inhibitoria.<sup>102</sup>

Ya son diversos estudios que evalúan la utilización de los residuos de quinua como el escarificado para obtener un producto antifúngico, ya que ayudaría a proporcionar un controlador orgánico<sup>108</sup>, sería una alternativa de valor agregado para los agricultores que se dedican al cultivo de *Chenopodium quinoa Willd* en todos sus cultivos, especialmente en aquellas que se sabe que son amargas y necesitan un proceso de desaponificado previo para su consumo.<sup>71</sup> Las manchas foliares y la podredumbre en los tallos y raíces causan muchas pérdidas económicas en lugares de clima húmedo<sup>12</sup>; con el paso del tiempo al usarse pesticidas, estos fitopatógenos fueron volviéndose resistentes lo cual resulta siendo contraproducente para los agricultores; se puede agregar que si el escarificado de quinua se utiliza para la extracción de metabolitos secundarios como las saponinas, habría una mayor producción y apoyo para la agricultura y la ganadería<sup>109</sup>; para la agricultura por utilizar un controlador fúngico orgánico y como residuo de la extracción de saponinas quedaría afrecho del escarificado ya libre de saponinas, lo cual, según Zarate<sup>86</sup>, ayuda de mucho a la alimentación porcina y bovina mejorando la producción de la carne.<sup>33</sup>

Por último, la capacidad biológica de las saponinas como fungicidas incrementa su potencia cuando se adiciona algún compuesto de baja polaridad como el etanol, anteriormente descrito, esto, al modificarse de manera química mejora la capacidad de lisis celular tanto de las saponinas como del etanol.

# CONCLUSIONES

1. Los extractos de saponinas a partir *Chenopodium quinoa* Willd, fueron obtenidos mediante una sucesión de operaciones unitarias con un solvente de baja polaridad: etanol; obteniéndose la mejor extracción a una concentración de 50 % V/V de etanol; a un tiempo de agitación de 72 horas y a una temperatura de extracción de 50 °C.
2. El rendimiento de extracción dio como resultado un  $47.429 \pm 0.028$  % de rendimiento de extracción de saponinas, casi cercano al 50 %.
3. Se determinó el contenido de saponinas mediante el método semi-cuantitativo manejando el índice de espuma obteniéndose el mayor resultado de 0.734 g y el método cuantitativo por la reacción Liebermman–Burchard el cual el mayor resultado fue de 0.713 g; estos dos últimos resultados son correlativos con el rendimiento de la extracción y el peso de crudo de saponinas obtenido al final del proceso que es de 1.186 g a partir de 2.5 g de cascarillado de quinua.
4. Aislado y caracterizando los hongos de las muestras vegetales de *Chenopodium quinoa* Willd se halló hongos fitopatógenos de la misma planta de quinua siendo *Alternaria sp.* y *Fusarium sp.*
5. Se evaluó la actividad antifungica o el efecto inhibitorio con el extracto hidroalcohólico con saponinas de mayor rendimiento. En *Alternaria sp.* se demostró que se necesita más de 0.1778 mg/mL de saponinas para poder inhibirlo. De igual manera los resultados para *Fusarium sp.* se necesita más de 0.6518 mg/mL de saponinas para obtener resultados óptimos de inhibición; es decir que a partir de la variable 0.6518 y 0.8888 mg /mL de saponinas frente al control, si llega a inhibir y ralentizar el crecimiento de *Fusarium sp.*

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda hacer un análisis preliminar con otros cultivares de *Chenopodium quinoa* Willd especialmente con las quinuas mas amargas ya que poseen mayor cantidad de saponinas.
2. Realizar la extracción de saponinas usando otros métodos, agregando muchas más variables de extracción como concentración de escarificado; tipo de cultivar.
3. Se recomienda la cuantificación mediante métodos que poseen mayor exactitud como la cromatografía HPLC.
4. En caso de los hongos aislados se debería tener cuidado durante el aislamiento debido a que existen muchos las fitopatogenos en la planta, pero también existen bacterias, levaduras y hongos del medio ambiente que pueden dar resultados equivocados durante su estudio; también se recomienda realizar el secuenciamiento con el fin de corroborar los resultados que se obtuvieron por microscopia.
5. Evaluar el efecto de las saponinas en otros hongos de otros cultivos y también evaluar la actividad antimicrobiana.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Waller GR. Saponins: Chemistry and Pharmacology of Natural Products By K. Hostettman and A. Marston (Lausanne University, Switzerland). Cambridge University Press: Cambridge, U.K. 1995. xii + 548 pp. \$120.00. ISBN 0-521-32970-1. 1996;
2. Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, O'Maille P, Osbourn A. Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2014;65(1):225–57.
3. Filho AMM, Pirozi MR, Borges JTDS, Pinheiro Sant'Ana HM, Chaves JBP, Coimbra JSDR. Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017;57(8):1618–30.
4. Wilson HD. Quinoa biosystematics I: Domesticated populations. *Economic Botany*. 1988;42(4):461–77.
5. Abugoch James LE. Chapter 1 Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [Internet]. 1a ed. Vol. 58, *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Inc.; 2009. 1–31 p.
6. Wright KH, Pike OA, Fairbanks DJ, Huber CS. Composition of *Atriplex hortensis*, Sweet and Bitter *Chenopodium quinoa* Seeds. *Journal of Food Science*. 2002;67(4):1383–5.
7. Díaz Puentes LN. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión [Internet]. Caracas; 2009.

8. Fleck JD, Betti AH, da Silva FP, Troian EA, Olivaro C, Ferreira F, et al. Saponins from *Quillaja saponaria* and *Quillaja brasiliensis*: Particular Chemical Characteristics and Biological Activities. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2019;24(1).
9. Stuardo M, San Martín R. Industrial crops and products. [Internet]. Industrial crops and products. Elsevier Science; 2008.
10. Baumann E, Stoya G, Völkner A, Richter W, Lemke C, Linss W. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochemica*. 2000;102(1):21–35.
11. Gleń-Karolczyk K, Witkowicz R, Boligłowa E. In vitro study on the use of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) extracts from to limit the development of phytopathogenic fungi. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*. 2016;61(3):132–8.
12. Bader G, Kulhanek Y, Ziegler-Böhme H. [The antifungal action of polygalacic acid glycosides]. *Die Pharmazie*. 1990;45(8):618–20.
13. Stuardo M, San Martín R. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*. 2008;27(3):296–302.
14. Bokhari NA, Siddiqui I, Perveen K, Siddique I, Soliman DWA. MYCOCIDAL ABILITY OF *TOONA CILIATA* AGAINST *RHIZOCTONIA SOLANI* [Internet]. Vol. 25, *J. Anim. Plant Sci*.
15. Aranibar G. “Efecto inhibitorio de la Saponina de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) en la flora fúngica natural e inducida de *Penicillium digitatum* en naranjas (*Citrus sinensis*)”. 2011;1–96.

16. Cuadrado C, Ayet G, Burbano C, Muzquiz M, Camacho L, Cavieres E, et al.  
Occurrence of saponins and sapogenols in Andean crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1995;67(2):169–72.
17. I. A, Palacios C. JH, Betancourt G. C. *Agronomía colombiana*. Vol. 27, *Agronomía Colombiana*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía; 1983.
18. Wilson HD. Genetic Variation among South American Populations of Tetraploid *Chenopodium* sect. *Chenopodium* subsect. *Cellulata*. *Systematic Botany*. 2006;6(4):380.
19. Mujica A, Y AC, Saravia R. *Quinua (Chenopodium quinoa willd.) Ancestral Cultivo Andino, Alimento del Presente y Futuro*. Santiago de Chile: UNALM. Santiago (Chile) FAO/RLC; 2001. p. 21–59.
20. Fao. *La quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial* [Internet]. 2011.
21. Salcines Minaya F. *Cadena Agroalimentaria de la Quinua y la Maca Peruana y su Comercialización en el Mercado Español*. 2009;
22. Tomé A, Teillier S, Howorth R. Contribución a conocimiento de la flora vascular de la Reserva Nacional Tamango, Región de Aisén, Chile. *Boletín Museo Nacional de Historia Natural Chile*. 2007;56:9–25.
23. Bonifacio A. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL DESARROLLO INDUSTRIAL Subdivisión de Promoción de Inversión y Tecnología. 2006;83510.
24. Fontúrbel R. Francisco. Problemática de la producción y comercialización de *Chenopodium quinoa* W. (*Chenopodiaceae*), debida a la presencia de las saponinas.

2003. p. 447–51.
25. Thomas E, Vandebroek I, Van Damme P, Goetghebeur P, Douterlungne D, Sanca S, et al. The relation between accessibility, diversity and indigenous valuation of vegetation in the Bolivian Andes. *Journal of Arid Environments*. 2009;73(9):854–61.
  26. Karyotis T, Iliadis C, Noulas C, Mitsibonas T. Preliminary Research on Seed Production and Nutrient Content for Certain Quinoa Varieties in a Saline-Sodic Soil. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 2003;189(6):402–8.
  27. Mujica A, Jacobsen S-E. Capítulo 27 definición.
  28. Ando H, Chen Y-C, Tang H, Shimizu M, Watanabe K, Mitsunaga T. Food Components in Fractions of Quinoa Seed. Vol. 8, *Food Sci. Technol. Res*. 2002.
  29. Prego I, Maldonado S, Otegui M. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*. 1998;82(4):481–8.
  30. Carrillo-Ocampo A, Engleman EM. Anatomía de la semilla de *Chenopodium berlandieri* ssp. *nuttalliae* (Chenopodiaceae) “huauzontle”. *Botanical Sciences*. 2019;34(54):17.
  31. García MA. Efecto de la salinidad por NaCl en el crecimiento y desarrollo de plantas de *Chenopodium quinoa* Willd. *CIENCIA EN DESARROLLO*. 2018;10(1).
  32. Planchuelo AM. Estudio de los frutos y semillas del género *Chenopodium* en la Argentina. *Darwiniana*. Instituto de Botánica Darwinion; 1975. p. 528–65.
  33. Taylor SL. *Advances in food and nutrition research*. Volume 58. Academic Press; 2009. 270 p.

34. Rivera Monica. Obtención, caracterización estructural y determinación de las propiedades funcionales de un aislado proteico de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa*). 2006. p. 1–61.
35. Bhargava A, Rana TS, Shukla S, Ohri D. Seed protein electrophoresis of some cultivated and wild species of *Chenopodium*. *Biologia Plantarum*. 2005;49(4):505–11.
36. Moses T, Papadopoulou KK, Osbourn A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;49(6):439–62.
37. Oshodi AA, Ogungbenle HN, Oladimeji MO. Chemical composition, nutritionally valuable minerals and functional properties of benniseed (*Sesamum radiatum*), pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) flours. *International journal of food sciences and nutrition*. 1999;50(5):325–31.
38. Mastebroek HD, Limburg H, Gilles T, Marvin HJ. Occurrence of saponins in leaves and seeds of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80(1):152–6.
39. Lacaille-Dubois MA, Wagner H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*. 1996;2(4):363–86.
40. Kalinowska M, Zimowski J, Pączkowski C, Wojciechowski ZA. The formation of sugar chains in triterpenoid saponins and glycoalkaloids. *Phytochemistry Reviews*. 2005;4(2–3):237–57.
41. Composition of Foods Raw, Processed, Prepared USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27 Documentation and User Guide [Internet]. 2014.

42. Navruz-Varli S, Sanlier N. Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Cereal Science*. 2016;69:371–6.
43. Woldemichael GM, Wink M. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(5):2327–32.
44. Kuljanabthagavad T, Thongphasuk P, Chamulitrat W, Wink M. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry*. 2008;69(9):1919–26.
45. Moses T, Papadopoulou KK, Osbourn A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2014;49(6):439–62.
46. Guclu-Ustundag Ö, Mazza G, Güçlü-Üstündağ Ö, Mazza G. Saponins: Properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007;47(3):231–58.
47. Dini I, Schettino O, Simioli T, Dini A. Studies on the constituents of *Chenopodium quinoa* seeds: isolation and characterization of new triterpene saponins. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(2):741–6.
48. George AJ. Legal status and toxicity of saponins. *Food and Cosmetics Toxicology*. 1965;3:85–91.
49. Zhu N, Sheng S, Sang S, Jhoo J-W, Bai N, Karwe M V, et al. Triterpene saponins from debittered quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(4):865–7.
50. Ahumada A, Ortega A, Chito D, Benítez R. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Rev Colomb Cienc*

- Quím Farm. 2016;45(3):438–69.
51. Fiallos-Jurado J, Pollier J, Moses T, Arendt P, Barriga-Medina N, Morillo E, et al. Saponin determination, expression analysis and functional characterization of saponin biosynthetic genes in *Chenopodium quinoa* leaves. *Plant Science*. 2016;250:188–97.
  52. Lásztity R, Hidvégi M, Bata Á. Saponins in food. *Food Reviews International*. 1998;14(4):371–90.
  53. Price KR, Johnson IT, Fenwick GR, Malinow MR. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1987;26(1):27–135.
  54. Profesor Patrocinante Q, Elizabeth Abugoch James L, Marcela Romero Palacios N. Obtención, caracterización y relación estructura-funcionalidad de un aislado proteico de quinua. 2006;1–61.
  55. Apaza R, Smeltekop H, Flores Y, Ii GA, Salcedo L. Efecto de saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd contra el fitopatógeno *Cercospora beticola* Sacc. *Rev Protección Veg*. 2016;31(1):63–9.
  56. Gómez-Caravaca AM, Iafelice G, Lavini A, Pulvento C, Caboni MF, Marconi E. Phenolic compounds and saponins in quinoa samples (*Chenopodium quinoa* Willd.) grown under different saline and nonsaline irrigation regimens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(18):4620–7.
  57. Hernández R, Lugo EC, Díaz L, Villanueva S. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN INDIRECTA DE LAS SAPONINAS DE AGAVE LECHUGUILLA TORREY EXTRACTION AND INDIRECT

QUANTIFICATION OF SAPONINS FROM THE AGAVE LECHUGUILLA

TORREY [Internet]. 2005.

58. Uzm Án BG, Cruz L, Lvarado C ; JAA, Ollinedo PM. CUANTIFICACION DE SAPONINAS EN MUESTRAS DE CAÑIHUA CHENOPODIUM PALLIDICAULE AELLEN. Vol. 30, Bolivian Journal of Chemistry. 2013.
59. Miranda M, Vega-Gálvez A, Quispe-Fuentes I, Rodríguez MJ, Maureira H, Martínez EA. Nutritional Aspects of Six Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Ecotypes from three Geographical Areas of Chile. Chilean journal of agricultural research. 2012;72(2):175–81.
60. Ridout CL, Price KR, Dupont MS, Parker ML, Fenwick GR. Quinoa saponins—analysis and preliminary investigations into the effects of reduction by processing. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1991;54(2):165–76.
61. MIZUI F, KASAI R, OHTANI K, TANAKA O. Saponins from bran of Quinoa, *Chenopodium quinoa* Willd. II. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN. 1990;38(2):375–7.
62. BeMiller J, Whistler R. Starch: Chemistry and Technology, Third Edition [Internet].
63. Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Caboni MF. Simultaneous Determination of Phenolic Compounds and Saponins in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) by a Liquid Chromatography–Diode Array Detection–Electrospray Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry Methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011;59(20):10815–25.
64. Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K. The biological action of saponins in animal systems: a review. British Journal of Nutrition. 2002;88(6):587–605.

65. Lozano M, Ticona E, Carrasco C, Flores Y, Almanza G. Cuantificación De Saponinas En Residuos De Quinoa Real. *Revista Boliviana de Química*. 2012;29(2):131–8.
66. Rojas Avalos AS, Tapia Ramírez WE. 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. 2011;40.
67. Rojas W, Pinto M. Clasificación Taxonomica De Los Insectos: Clasificación Taxonomica De Los Insectos [Internet].
68. Arcos Logroño JP. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LAS SAPONINAS DE LA QUINUA FRENTE A LOS AGENTES CAUSALES DEL DAMPING OFF (*Fusarium spp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Pythium sp.*). Escuela Superior Politécnica De Chimborazo Facultad De Ciencias Escuela De Ciencias Químicas. 2016;
69. Kuljanabhadgavad T, Wink M. Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa Willd*. *Phytochemistry Reviews*. 2009;8(2):473–90.
70. Kilinc OK, Ozgen S, Selamoglu Z. Bioactivity of Triterpene Saponins from Quinoa (*Chenopodium Quinoa Willd* .). *Research & Reviews: Research Journal of Biology*. 2016;4(4):25–8.
71. Gong W, Huang Y, Ji A, Peng W, Liu C, Zeng Y, et al. Optimisation of saponin extraction conditions with *Camellia sinensis* var. *assamica* seed and its application for a natural detergent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018;98(6):2312–9.
72. Vilcacundo R, Hernández-Ledesma B. Nutritional and biological value of quinoa

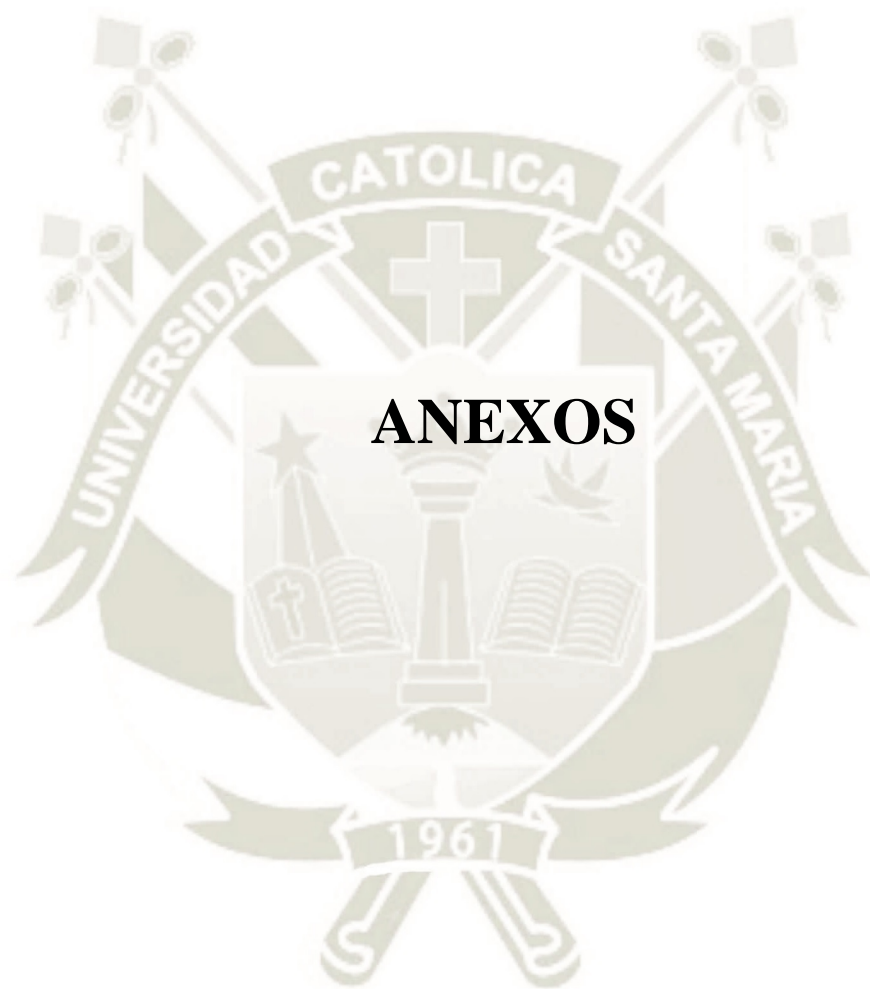
- (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Current Opinion in Food Science*. 2017;14:1–6.
73. Milgate J, Roberts DC. The nutritional & biological significance of saponins. *Nutrition Research*. 1995;15(8):1223–49.
  74. Camel V. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *The Analyst*. 2001;126(7):1182–93.
  75. Choi MPK, Chan KKC, Leung HW, Huie CW. Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions. *Journal of chromatography A*. 2003;983(1–2):153–62.
  76. Pereira E, Encina-Zelada C, Barros L, Gonzales-Barron U, Cadavez V, C.F.R. Ferreira I. Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa) grains: A good alternative to nutritious food. *Food Chemistry*. 2019;280:110–4.
  77. Tomás G, Huamán J, Aguirre R, Barrera M. Extracción y clasificación de la saponina del *Sapindus saponaria* L., “Boliche”. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*. 2010;13(2):36–9.
  78. Mad T, Sterk H, Mittelbach M, Rechberger GN. Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2006;17(6):795–806.
  79. Shi J, Arunasalam K, Yeung D, Kakuda Y, Mittal G, Jiang Y. Saponins from Edible Legumes: Chemistry, Processing, and Health Benefits. *Journal of Medicinal Food*. 2004;7(1):67–78.
  80. Vega-Gálvez A, Miranda M, Vergara J, Uribe E, Puente L, Martínez EA. Nutrition

- facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010;90(15):2541–7.
81. Koziol MJ. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*. 1992;5(1):35–68.
  82. Cuervo Lozada J. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de Nitrogeno y solubilizadores de fosfatos. 2010;35.
  83. Elizalde Ana de Dios, Porrilla Yamid P., Chaparro Diana Carolina C. FACTORES ANTINUTRICIONALES EN SEMILLAS [Internet]. Colombia; 2009.
  84. Lizcano Ramón AJ, Vergara González JL. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA Bogotá. 2008;
  85. Lee M-R, Chen C-M, Hwang B-H, Hsu L-M. Analysis of saponins from black bean by electrospray ionization and fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 1999;34(8):804–12.
  86. Zarate Sullca SE. 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. 2016;
  87. Güçlü-Üstündağ Ö, Balsevich J, Mazza G. Pressurized low polarity water extraction of saponins from cow cockle seed. *Journal of Food Engineering*. 2007;80(2):619–30.

88. Orozco-Mena R, Salmerón-Ochoa I, Ortega-Rivas E, Perez-Vega S. Development of a sustainable process for the solid-liquid extraction of antioxidants from oat. *Sustainability (Switzerland)*. 2014;6(3):1504–20.
89. Bhargava A, Shukla S, Ohri D. *Chenopodium quinoa*—An Indian perspective. *Industrial Crops and Products*. 2006;23(1):73–87.
90. German JB, O’Neill TE, Kinsella JE. Film forming and foaming behavior of food proteins. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*. 1985;62(9):1358.
91. Koziol MJ. Composición química y evaluación nutricional de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd. *Jorunal of Food Composition and Analysis*. 1992;5:35–68.
92. Rossi M, Pagliarini E, Peri C. Emulsifying and foaming properties of sunflower protein derivatives. *Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie = Food science + technology*. 1985;
93. Garrido M, Silva P, Silva H, Muñoz R, Baginsky C, Acevedo E. Evaluación del rendimiento de nueve genotipos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) bajo diferentes disponibilidades hídricas en ambiente mediterráneo. *Idesia (Arica)*. 2013;31(2):69–76.
94. Gianna V, Montes JM, Calandri EL, Guzmán CA. Impact of several variables on the microwave extraction of *Chenopodium Quinoa willd* saponins. *International Journal of Food Science and Technology*. 2012;47(8):1593–7.
95. Valencia Z, Cámara F, Ccapa K, Catacora P, Quispe F. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de semillas de quinua peruana (*Chenopodium quinoa* W. ). *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2017;83(1):16–29.
96. Villar del Fresno AM. *Farmacognosia general* [Internet]. Síntesis; 2010.

97. Avendaño C. Introducción a La Química Farmacéutica [Internet]. Mc Graw Hill. Madrid; 2001.
98. Sequeira SO, Phillips AJL, Cabrita EJ, Macedo MF. Ethanol as an antifungal treatment for paper: short-term and long-term effects. *Studies in Conservation*. 2017;62(1):33–42.
99. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(1):147–79.
100. Apablaza G, Díaz MJ, Martín RS a N, Moya E. CONTROL DE OIDIO DE LAS CUCURBITACEAS CON SAPONINAS PRESENTES EN EXTRACTOS DE QUILLAY ( Quillaja saponaria ) 1. *Ciencia e investigación agraria*. 2002;29:83–90.
101. Coello R. Evaluación del efecto de la saponina extraída de la quinua (Chenopodium quinoa) sobre el crecimiento de enfermedades en el cultivo de banano (Musa x paradisiaca) Ricardo. Universidad San Francisco de Quito; 2015.
102. Sun X, Yang X, Xue P, Zhang Z, Ren G. Improved antibacterial effects of alkali-transformed saponin from quinoa husks against halitosis-related bacteria. *BMC complementary and alternative medicine*. 2019;19(1):46.
103. Hodges CF. Vegetative growth and sporulation of *Bipolaris sorokiniana* on sequentially older infected leaves of *Poa pratensis* exposed to postemergence herbicides. *Mycopathologia*. 1994;128(2):105–9.
104. Cobos R, Mateos RM, Álvarez-Pérez JM, Olego MA, Sevillano S, González-García S, et al. Effectiveness of Natural Antifungal Compounds in Controlling Infection by Grapevine Trunk Disease Pathogens through Pruning Wounds. *Applied and environmental microbiology*. 2015;81(18):6474–83.

105. Khatoon S, Singh S, Singh M, Kumar V, Rawat AS, Mehrotra S. Antimicrobial screening of ethnobotanically important stem bark of medicinal plants. *Pharmacognosy Research*. 2010;2(4):254.
106. Amoabeng BW, Gurr GM, Gitau CW, Stevenson PC. Cost:benefit analysis of botanical insecticide use in cabbage: Implications for smallholder farmers in developing countries. *Crop Protection*. 2014;57:71–6.
107. Dissanayake M, Jayasinghe J. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SELECTED MEDICINAL PLANT EXTRACTS AGAINST PLANT PATHOGENIC FUNGI; *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musea* and *Fusarium oxysporum* [Internet]. Vol. 2, [www.ijst.com](http://www.ijst.com)). 2013.
108. Ruiz KB, Khakimov B, Engelsen SB, Bak S, Biondi S, Jacobsen S-E. Quinoa seed coats as an expanding and sustainable source of bioactive compounds: An investigation of genotypic diversity in saponin profiles. *Industrial Crops and Products*. 2017;104:156–63.
109. Martínez-Suárez J V, Rodríguez-Tudela JL. [Antifungal resistance in opportunistic pathogenic fungi (I). Polyenes and fluorocytosine]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 14(6):384–9.



## Anexo A

**SIGMA-ALDRICH**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3060 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Email USA: [techserv@sigma.com](mailto:techserv@sigma.com)

Outside USA: [eurtechserv@sigma.com](mailto:eurtechserv@sigma.com)

### Product Specification

Product Name:

Saponin - for molecular biology, used as non-ionic surfactant, adjuvant

Product Number:

47036

CAS Number:

8047-15-2

MDL:

MFCD00081981

TEST	Specification
Appearance (Color)	Conforms
Light Yellow to Yellow, Light Beige to Beige, Light Brown to Brown, Yellow-Beige to Yellow-Brown	
Appearance (Form)	Conforms
Powder to Powder with Lumps	
Thin Layer Chromatography	Corresponds to Requirements
Solubility (Color)	Conforms
Yellow to Very Deep Brownish-Yellow	
Solubility (Turbidity)	Conforms
Clear to Very Hazy	
Solubility (Method)	All Catalog Values
Sulfated Ash	10 - 20 %
Hydrogen	
Hydrogen Content	
Infrared Spectrum	Corresponds to Requirements
Corresponds to Standard Spectrum	
Sapogenin Content	8 - 25 %
DNAse Detection	None Detected
RNAse Detection	None Detected
Protease Detection	None Detected
Phosphatase Detection	None Detected

Specification: PRD.0.Z05.1000055769

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

1 of 1

## Anexo 1

### 1. Análisis factorial lineal para extracción de saponinas con tres variables: Concentración de disolvente. tiempo de agitación y temperatura

**Análisis factorial: Factor A %V/V; Factor B tiempo de agitación; Factor C temperatura de agitación**

Análisis factorial del componente principal de la matriz de correlación

<b>Cargas de factores no rotados y comunalidades</b>				
<b>Variable</b>	<b>Factor 1</b>	<b>Factor 2</b>	<b>Factor 3</b>	<b>Comunalidad</b>
<b>Factor A: %V/V</b>	0.000	0.000	-1.000	1.000
<b>Factor B: Tiempo de agitación</b>	0.000	-1.000	0.000	1.000
<b>Factor C: Temperatura de extracción</b>	-1.000	0.000	0.000	1.000
<b>Varianza</b>	1.0000	1.0000	1.0000	3.0000
<b>%Varianza</b>	0.333	0.333	0.333	1.000

<b>Coefficientes de puntuación de factores</b>			
<b>Variable</b>	<b>Factor 1</b>	<b>Factor 2</b>	<b>Factor 3</b>
<b>Factor A: %V/V</b>	0.000	0.000	-1.000
<b>Factor B: Tiempo de agitación</b>	0.000	-1.000	0.000
<b>Factor C: Temperatura de extracción</b>	-1.000	0.000	0.000

## Anexo 2

### 2. Optimización del proceso de obtención de saponinas a partir de extractos etanolicos.

#### a. Resultados de absorbancia, concentración y % de saponinas en la muestra: Primera replica

Muestra	Factor A % V/V	Factor B Tiempo de agitación	Factor C Temperatura de extracción	Absorbancia	Concentración	Porcentaje de saponinas en la muestra mg%
I	I	I	I	1.44	4.483540467	17.93416187
II	I	I	II	1.449	4.510821461	18.04328584
III	I	II	I	2.063	6.371991513	25.48796605
IV	I	II	II	2.024	6.253773871	25.01509548
V	II	I	I	1.656	5.138284329	20.55313731
VI	II	I	II	1.647	5.111003334	20.44401334
VII	II	II	I	2.282	7.035829039	28.14331616
VIII	II	II	II	2.316	7.138890573	28.55556229
IX	III	I	I	1.578	4.901849045	19.60739618
X	III	I	II	1.588	4.932161261	19.72864504
XI	III	II	I	1.951	6.032494695	24.12997878
XII	III	II	II	1.93	5.968839042	23.87535617

#### b. Segunda Corrida (replica)

Muestra 2a replica	Factor A % V/V	Factor B Tiempo de agitación	Factor C Temperatura de extracción	Absorbancia	Concentración	Porcentaje de saponinas en la muestra mg%
I	I	I	I	1.447	4.504759018	18.0190361
II	I	I	II	1.449	4.510821461	18.0432858
III	I	II	I	2.059	6.359866626	25.4394665
IV	I	II	II	2.025	6.256805092	25.0272204
V	II	I	I	1.651	5.123128221	20.4925129
VI	II	I	II	1.656	5.138284329	20.5531373
VII	II	II	I	2.285	7.044922704	28.1796908
VIII	II	II	II	2.305	7.105547135	28.4221885
IX	III	I	I	1.575	4.89275538	19.5710215
X	III	I	II	1.578	4.901849045	19.6073962
XI	III	II	I	1.956	6.047650803	24.1906032
XII	III	II	II	1.951	6.032494695	24.1299788

c. Tercera corrida (replica)

Muestra 3a replica	Factor A % V/V	Factor B Tiempo de agitación	Factor C Temperatura de extracción	Absorbancia	Concentración	Porcentaje de saponinas en la muestra mg%
I	I	I	I	1.443	4.49263413	17.9705365
II	I	I	II	1.447	4.50475902	18.0190361
III	I	II	I	2.024	6.25377387	25.0150955
IV	I	II	II	2.024	6.25377387	25.0150955
V	II	I	I	1.656	5.13828433	20.5531373
VI	II	I	II	1.656	5.13828433	20.5531373
VII	II	II	I	2.282	7.03582904	28.1433162
VIII	II	II	II	2.316	7.13889057	28.5555623
IX	III	I	I	1.575	4.89275538	19.5710215
X	III	I	II	1.578	4.90184905	19.6073962
XI	III	II	I	1.93	5.96883904	23.8753562
XII	III	II	II	1.956	6.0476508	24.1906032

Número de muestra de extracto hidro-alcohólico con saponinas	Peso inicial (g)	Crudo de saponinas final 1a repetición (g)	Crudo de saponinas final 2a repetición (g)	Crudo de saponinas final 3a repetición (g)	Crudo de saponinas promedio (g)	desv estandar	error estndar
I(20:24:20)	2.5	0.599	0.6465	0.5812	0.6089	0.03375693	0.01948957
II(20:24:50)		0.2457	0.3489	0.3093	0.3013	0.05206304	0.03005861
III(20:72:20)		0.4791	0.3821	0.4589	0.44003333	0.05117825	0.02954778
IV(20:72:50)		0.8257	0.7387	0.831	0.79846667	0.05182725	0.02992247
V(50:24:20)		0.9934	0.8254	0.9375	0.91876667	0.08555234	0.04939367
VI(50:24:50)		1.0527	0.9459	0.982	0.99353333	0.05432608	0.03136518
VII(50:72:20)		1.1218	1.1172	1.0934	1.1108	0.01524336	0.00880076
VIII(50:72:50)		1.1977	1.1539	1.2056	1.18573333	0.02785001	0.01607921
IX(80:24:20)		0.9178	0.8911	0.9409	0.9166	0.02492168	0.01438854
X(80:24:50)		0.9135	1.0034	0.8531	0.92333333	0.07563097	0.04366556
XI(80:72:20)		0.8209	0.8507	0.8091	0.8269	0.02143922	0.01237794
XII(80:72:50)		0.8813	0.9135	0.9413	0.91203333	0.03002688	0.01733603

### Anexo 3

#### 3. Modelo lineal general: Promedio del vs. Factor A % V/V. Factor B Tiempo. Factor C Temperatura

Método: codificación de factores (-1. 0. +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Factor A % V/V	Fijo	3	20. 50. 80
Factor B Tiempo de agitación	Fijo	2	24. 72
Factor C Temperatura de extracción	Fijo	2	20. 50

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust	MC Ajust	Valor F	Valor p
Factor C temperatura de extracción	1	11.4	11.4	0.33	0.581
Factor A % V/V	2	891.52	445.76	13.1	0.004
Factor B tiempo de agitación	1	49.86	49.86	1.46	2.65
Error	7	238.26	34.04		
Total	11	1191.04			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
5.83409	80.00%	68.56%	41.21%

Coefficientes

Termino	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante	33.12	1.68	19.67	0.000	
Factor C Temperatura de extracción 20	-0.97	1.68	-0.58	0.581	1.00
Factor A % V/V 20	-11.63	2.38	-4.88	0.002	1.33
50	8.97	2.38	3.76	0.007	1.33
Factor B Tiempo de agitación 24	-2.04	1.68	-1.21	0.265	1.00

#### Anexo 4

4. Prueba t para la comparación de las medias de las variables de concentración de extracto hidro-alcohólico, tiempo de agitación y temperatura de extracción.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	$\bar{X}$ Concentración	$\bar{X}$ Tiempo
Media	0.827666667	0.827666667
Varianza	0.069656271	0.00938281
Observaciones	3	4
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	6.944E-16	
P(T<=t) una cola	0.5	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	1	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	$\bar{X}$ Temperatura	$\bar{X}$ Concentracion
Media	0.827666667	0.827666667
Varianza	0.001184222	0.06239677
Observaciones	2	6
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	-1.05896E-15	
P(T<=t) una cola	0.5	
Valor crítico de t (una cola)	2.015048373	
P(T<=t) dos colas	1	
Valor crítico de t (dos colas)	2.570581836	

<b>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales</b>		
	$\bar{X}_{\text{tiempo}}$	$\bar{X}_{\text{temperatura}}$
<b>Media</b>	0.827666667	0.827666667
<b>Varianza</b>	0.001184222	0.06239677
<b>Observaciones</b>	2	6
<b>Diferencia hipotética de las medias</b>	0	
<b>Grados de libertad</b>	5	
<b>Estadístico t</b>	0	
<b>P(T&lt;=t) una cola</b>	0.5	
<b>Valor crítico de t (una cola)</b>	2.015048373	
<b>P(T&lt;=t) dos colas</b>	1	
<b>Valor crítico de t (dos colas)</b>	2.570581836	

## Anexo 5

### 5. Comparaciones para los promedios de rendimiento %

#### a. Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = Promedio del rendimiento %. Término = Factor C: temperatura de extracción

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor C			
Temperatura de extracción	N	Media	Agrupación
50	6	34.096	A
20	6	32.1467	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de Factor C: temperatura de extracción					
niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC simultaneo de 95%	Valor T	Valor p ajustado
50 - 20	1.95	3.37	(-6.02 . 9.91)	0.58	0.581

Nivel de confianza individual = 95.00%

#### b. Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = Promedio del rendimiento %. Término = Factor A: concentración de disolvente

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor A % V/V	N	Media	Agrupación
50	4	42.0883	B
80	4	35.7887	A
20	4	21.487	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de Factor A %V/V	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC simultaneo de 95%	Valor T	Valor p ajustado
niveles					
50 - 20	20.60	4.13	(8.44 . 32.77)	4.99	0.004
80 - 20	14.30	4.13	(2.14 . 26.47)	3.47	0.025
80 - 50	-6.30	4.13	(-18.46. 5.86)	-1.53	0.336

Nivel de confianza individual = 97.86%

- c. Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = Promedio del rendimiento %. Término = Factor B: tiempo de agitación

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor B	N	Media	Agrupación
Tiempo de agitación			
72	6	35.1598	A
24	6	31.0829	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

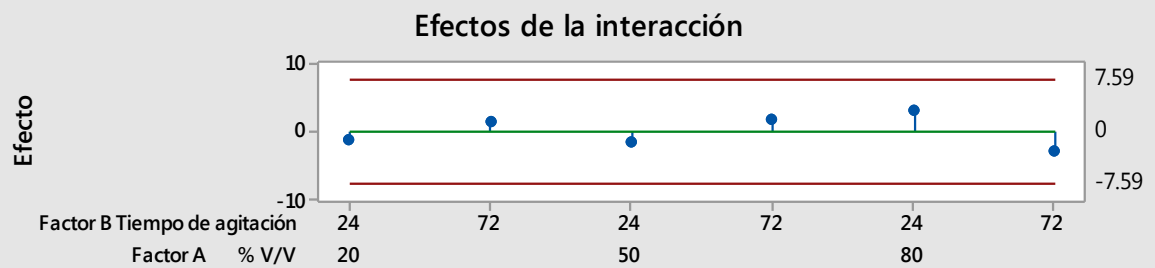
Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de Factor B					
Tiempo de agitación					
niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC simultaneo de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
72 - 24	4.08	3.37	(-3.89 . 12.04)	1.21	0.265

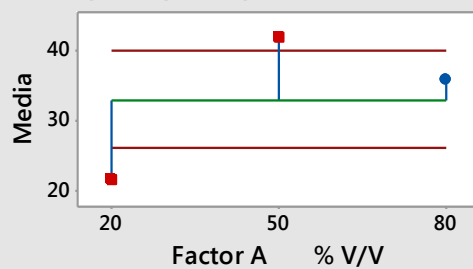
Nivel de confianza individual = 95.00%

d. Análisis de medias, equivalente gráfico de ANOVA prueba la igualdad de las medias de población.

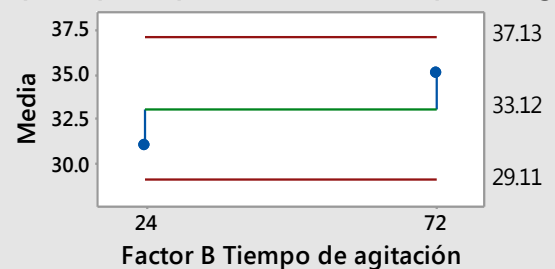
**ANOM normal de dos factores de Promedio del rendimiento %**  
 $\alpha = 0.05$



**Efectos principales para Factor A**



**Efectos principales para Factor B Tiempo de agitación**



- e. Prueba t Student para comparación de dos muestras (Peso de saponina: método afrosimétrico en 100 mL del extracto (g) vs. Peso de saponina: método espectrofotométrico en 100 mL del extracto (g)) suponiendo dos varianzas iguales.

<b>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales</b>		
	<i>Peso de saponina: método afrosimétrico en 100 mL del extracto (g)</i>	<i>Peso de saponina: método espectrofotométrico en 100 mL del extracto (g)</i>
<b>Media</b>	0.558003371	0.56546024
<b>Varianza</b>	0.012372237	0.008634923
<b>Observaciones</b>	12	12
<b>Varianza agrupada</b>	0.01050358	
<b>Diferencia hipotética de las medias</b>	0	
<b>Grados de libertad</b>	22	
<b>Estadístico t</b>	-0.178222883	
<b>P(T&lt;=t) una cola</b>	0.430089438	
<b>Valor crítico de t (una cola)</b>	1.717144374	
<b>P(T&lt;=t) dos colas</b>	0.860178875	
<b>Valor crítico de t (dos colas)</b>	2.073873068	

## Anexo 6

### 6. Análisis de varianza para porcentaje de inhibición ANOVA para *Alternaria* sp.

#### f. ANOVA unidireccional: Factor A. Factor B. Factor C. Factor D. C+

#### Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente

Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

#### Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor 6 Factor A: 0.1778 mg/mL; Factor B: 0.4148 mg/mL; Factor C: 0.6518 mg/mL; Factor D: 0.8888 mg/mL; C+ extracto –Mancozeb; C-

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC ajustdo	MC asjutado	Valor F	Valor p
Factor	5	3120	623.97	6.48	0.001
Error	18	1735	96.36		
Total	23	4854			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
9.81643	64.27%	54.34%	36.48%

Medias				
Factor	N	Media	Desviación Estandar	IC de 95%
C1: 1.5 mL	4	98.269	0.856	(87.957. 108.580)
C2: 3.5 mL	4	99.019	0.507	(88.707. 109.330)
C3: 5.5 mL	4	99.185	0.296	(88.873. 109.497)
C4: 7.5 mL	4	99.343	0.445	(89.031. 109.654)
C+ extracto-Mancozeb	4	99.343	0.469	(89.031. 109.654)
C-	4	68.5	24.0	( 58.1. 78.8)

Desv.Est. agrupada = 9.81643

**g. Comparaciones en parejas de Tukey**

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
<b>C+ extracto-Mancozeb</b>	4	99.343	A
<b>C4: 7.5 mL</b>	4	99.343	A
<b>C3: 5.5 mL</b>	4	99.185	A
<b>C2: 3.5 mL</b>	4	99.019	A
<b>C1: 1.5 mL</b>	4	98.269	A
<b>C-</b>		68.5	B

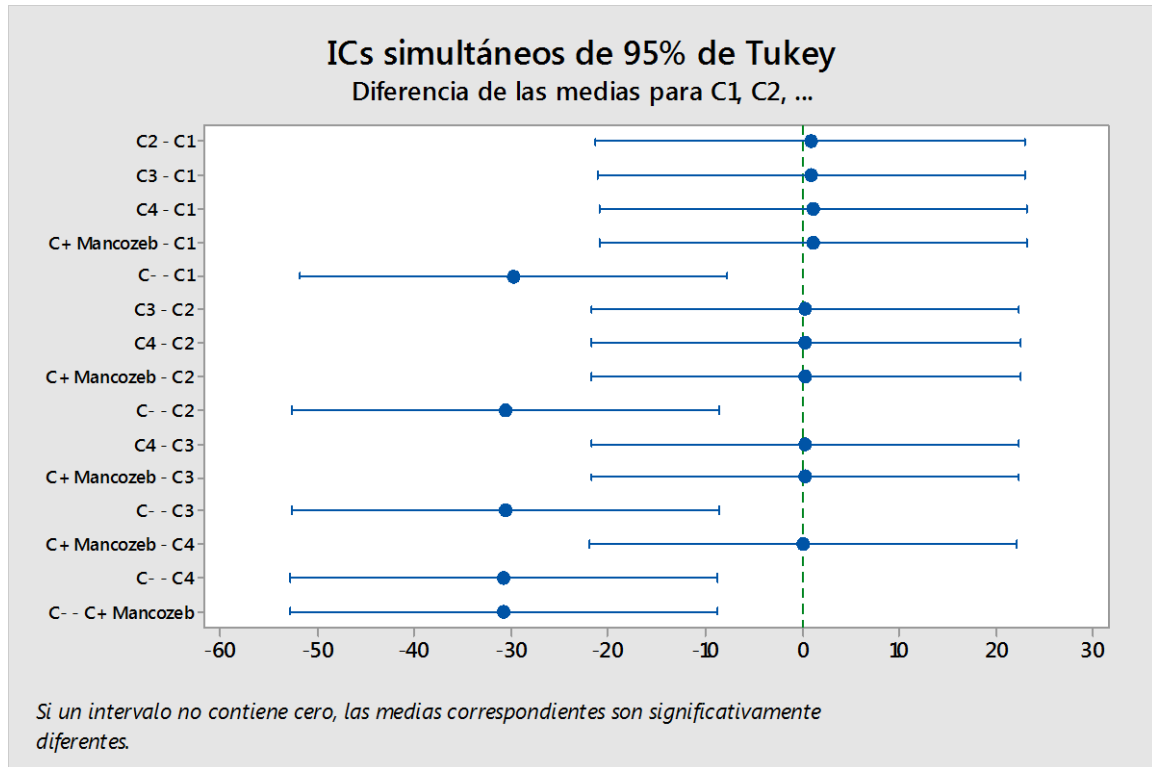
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor P ajustado
<b>Factor B - Factor A</b>	0.75	6.94	(-21.29. 22.79)	0.11	1.000
<b>Factor C - Factor A</b>	0.92	6.94	(-21.12. 22.95)	0.13	1.000
<b>Factor D - Factor A</b>	1.07	6.94	(-20.96. 23.11)	0.15	1.000
<b>C+ e - Factor A</b>	1.07	6.94	(-20.96. 23.11)	0.15	1.000
<b>C- - Factor A</b>	-29.81	6.94	(-51.85. -7.78)	-4.30	0.005
<b>Factor C - Factor B</b>	0.17	6.94	(-21.87. 22.20)	0.02	1.000
<b>Factor D - Factor B</b>	0.32	6.94	(-21.71. 22.36)	0.05	1.000
<b>C+ e - Factor B</b>	0.32	6.94	(-21.71. 22.36)	0.05	1.000
<b>C- - Factor B</b>	-30.56	6.94	(-52.60. -8.53)	-4.40	0.004
<b>Factor D - Factor C</b>	0.16	6.94	(-21.88. 22.20)	0.02	1.000
<b>C+ e - Factor C</b>	0.16	6.94	(-21.88. 22.20)	0.02	1.000
<b>C- - Factor C</b>	-30.73	6.94	(-52.77. -8.69)	-4.43	0.004
<b>C+ e - Factor D</b>	0.00	6.94	(-22.04. 22.04)	0.00	1.000
<b>C- - Factor D</b>	-30.89	6.94	(-52.93. -8.85)	-4.45	0.004
<b>C- - C+ e</b>	-30.89	6.94	(-52.93. -8.85)	-4.45	0.004

Nivel de confianza individual = 99.48%

**h. Intervalos de confianza simultáneos de 95% de Tukey entre las variables de concentraciones y los controles positivos y negativos para *Alternaria sp.***



**i. Comparaciones múltiples de Dunnett con un control**

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

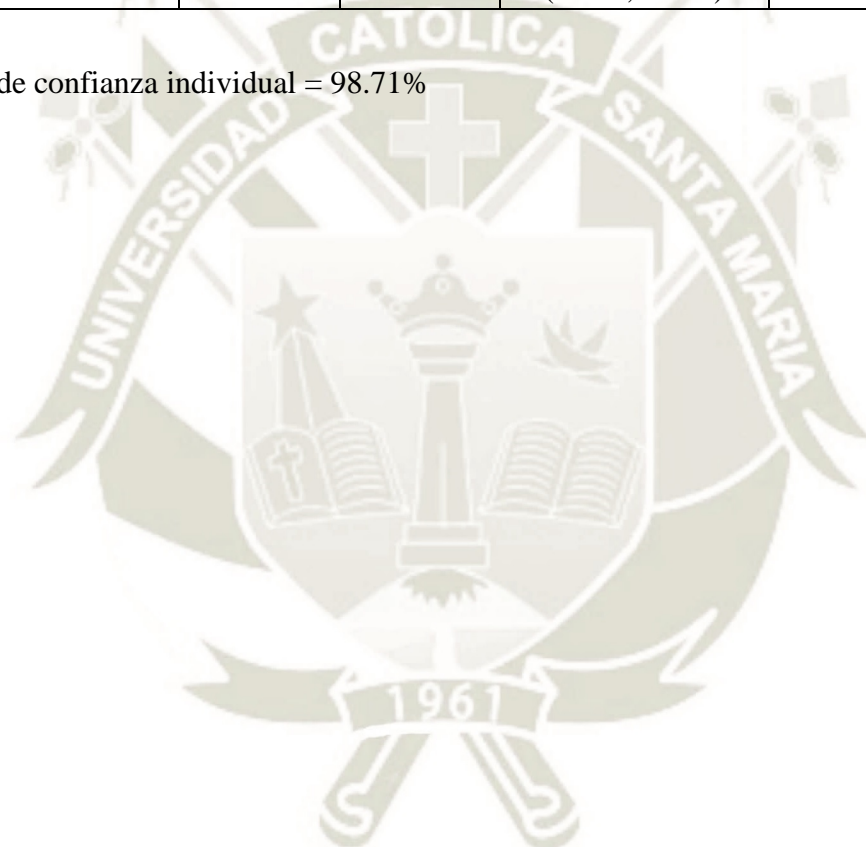
Factor	N	Media	Agrupación
<b>C- (control)</b>	4	68.5	A
<b>C+extracto -Mancozeb</b>	4	99.343	B
<b>Factor D 0.8888 mg/mL</b>	4	99.343	B
<b>Factor C 0.6518 mg/mL</b>	4	99.185	B
<b>Factor B 0.4148 mg/mL</b>	4	99.019	B
<b>Factor A 0.1778 mg/mL</b>	4	98.269	B

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

Pruebas simultáneas de Dunnett para la media de nivel – Media de control

Dif. niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor P ajustado
<b>Factor A - C-</b>	29.81	6.94	(10.65, 48.98)	4.3	0.002
<b>Factor</b>	30.56	6.94	(11.40, 49.73)	4.4	0.002
<b>Factor C - C-</b>	30.73	6.94	(11.56, 49.90)	4.43	0.001
<b>Factor D - C-</b>	30.89	6.94	(11.72, 50.06)	4.45	0.001
<b>C+ e - C-</b>	30.89	6.94	(11.72, 50.06)	4.45	0.001

Nivel de confianza individual = 98.71%



## Anexo 7

### 7. Análisis de varianza para porcentaje de inhibición ANOVA para *Fusarium* sp.

#### j. ANOVA unidireccional: C1, C2, C3 Y C4; C+ y C-

#### Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente

Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

#### Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor 6 C1, C2, C3, C4, C+Mancozeb, C-

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC ajustdo	MC asjutado	Valor F	Valor p
<b>Factor</b>	5	8931	1786.2	15.01	0.000
<b>Error</b>	18	2142	119.0		
<b>Total</b>	23	11073			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
10.909	80.65%	75.28%	65.61%

<b>Medias</b>				
<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Estandar</b>	<b>IC de 95%</b>
<b>C1: 1.5 mL</b>	4	68.03	9.04	(56.57, 79.49 )
<b>C2: 3.5 mL</b>	4	76.86	3.79	(65.40, 88.32)
<b>C3: 5.5 mL</b>	4	85.61	2.08	(74.15, 97.07)
<b>C4: 7.5 mL</b>	4	88.083	1.281	(76.624, 99.543)
<b>C+ extracto-Mancozeb</b>	4	85.11	7.14	(73.65, 96.57)
<b>C-</b>	4	32.3	23.7	( 20.8, 43.7)

Desv.Est. agrupada = 10.9090

### k. Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
<b>C4: 7.5 mL</b>	4	88.083	A
<b>C3: 5.5 mL</b>	4	85.61	A
<b>C+ extracto-Mancozeb</b>	4	85.11	A
<b>C2: 3.5 mL</b>	4	76.86	A
<b>C1: 1.5 mL</b>	4	76.86	B
<b>C-</b>		68.5	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia			Valor T	Valor p ajustado
	de las medias	EE de diferencia	IC de 95%		
C2 - C1	8.83	7.71	(-15.66, 33.32)	1.15	0.856
C3 - C1	17.58	7.71	( -6.91, 42.07)	2.28	0.252
C4 - C1	20.06	7.71	( -4.44, 44.55)	2.60	0.148
C+Mancozeb - C1	17.08	7.71	( -7.41, 41.57)	2.21	0.279
C- - C1	-35.78	7.71	(-60.27, -11.29)	-4.64	0.002
C3 - C2	8.75	7.71	(-15.74, 33.24)	1.13	0.861
C4 - C2	11.22	7.71	(-13.27, 35.71)	1.45	0.695
C+Mancozeb - C2	8.25	7.71	(-16.24, 32.74)	1.07	0.887
C- - C2	-44.61	7.71	(-69.10, -20.12)	-5.78	0.000
C4 - C3	2.47	7.71	(-22.02, 26.96)	0.32	0.999
C+Mancozeb - C3	-0.50	7.71	(-24.99, 23.99)	-0.06	1.000
C- - C3	-53.36	7.71	(-77.85, -28.87)	-6.92	0.000
C+Mancozeb - C4	-2.97	7.71	(-27.46, 21.52)	-0.39	0.999
C- - C4	-55.83	7.71	(-80.32, -31.34)	-7.24	0.000
C- - C+Mancozeb	-52.86	7.71	(-77.35, -28.37)	-6.85	0.000

Nivel de confianza individual = 99.48%

**a. Comparaciones múltiples de Dunnett con un control**

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
<b>C+ extracto-Mancozeb</b>	4	85.11	A
<b>C4: 7.5 mL</b>	4	88.083	A
<b>C3: 5.5 mL</b>	4	85.61	A
<b>C2: 3.5 mL</b>	4	76.86	B
<b>C1: 1.5 mL</b>	4	68.03	B
<b>C-</b>		32.3	B

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

Pruebas simultáneas de Dunnett para la media de nivel – Media de control

<b>Dif. niveles</b>	<b>Diferencia de las medias</b>	<b>EE de diferencia</b>	<b>IC de 95%</b>	<b>Valor T</b>	<b>Valor P ajustado</b>
<b>C1 - C+Mancozeb</b>	-17.08	7.71	(-38.39, 4.22)	-2.21	0.143
<b>C2 - C+Mancozeb</b>	-8.25	7.71	(-29.55, 13.05)	-1.07	0.730
<b>C3 - C+Mancozeb</b>	0.5	7.71	(-20.80, 21.80)	0.06	1.000
<b>C4 - C+Mancozeb</b>	2.97	7.71	(-18.33, 24.27)	0.39	0.994
<b>C- - C+Mancozeb</b>	-52.86	7.71	(-74.16, -31.56)	-6.85	0.000

Nivel de confianza individual = 98.71%

