

COMPARACIÓN DE PRUEBAS DE EXTRACCIÓN DE SAPONINAS (ÁCIDO OLEANOLICO) EN QUINUAS CULTIVADAS EN DOS ZONAS DE LA PROVINCIA DE JUJUY (VALLES Y PUNA)

COMPARISON OF SAPONINS (OLEANOLIC ACID) EXTRACTION TESTS IN QUINOA CULTIVATED IN TWO AREAS OF JUJUY PROVINCE (VALLEYS AND PUNA)

Cristina Castillo^{*}, Daniela Choque¹, Norma Wierna¹, María Alejandra Ruggeri¹, Alejandra Romero¹ y Natalia Ávila Carreras¹

¹Grupo de Investigación Química Aplicada. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy (UNJu). Alberdi N° 47, San Salvador de Jujuy. Jujuy. Argentina. (C.P. 4600)

*Autor para correspondencia:
cristinacastillo@fca.unju.edu.ar

Licencia:
[Licencia Creative Commons](#)
[Atribución-NoComercial-](#)
[Compartir Igual 4.0 Internacional](#)

Período de Publicación:
Julio 2021

Historial:
Recibido: 27/08/2020
Aceptado: 26/04/2021

RESUMEN

Las saponinas son glucósidos triterpénicos que se encuentran en una gran variedad de plantas, entre estas la quinua. Estos glucósidos triterpénicos derivan de siete agliconas siendo el ácido oleanólico (AO) uno de los que se encuentra en mayor porcentaje en la quinua. El objetivo del presente trabajo fue estudiar distintos métodos de extracción de ácido oleanólico en quinuas de dos regiones de la provincia de Jujuy, cuantificando y comparando la influencia de la zona de cultivo sobre la concentración de AO. El muestreo se realizó en dos regiones de la provincia de Jujuy (Valles y Puna). Se recolectaron dos muestras de población conocida Amarilla de Marangani y 252, que se cultivan en ambas zonas de estudio, Abra Pampa y Perico. Se compararon 4 métodos de extracción de AO: 1) lavado y maceración 2) escarificada y lavados 3) escarificados y lavados reiterados 4) soxhlet, seleccionando el mejor método para la cuantificación. La cuantificación se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). El método de lavado se realizó a diferentes concentraciones de EtOH/H₂O. El método soxhlet presentó una recuperación superior al 80%, siendo considerado el mejor método de extracción para la cuantificación de las muestras 252 y AMMA. Los resultados indican mayor concentración de AO en las quinuas cultivadas en Perico.

Palabras clave: ácido oleanólico, métodos de extracción, quinua, saponinas

SUMMARY

Saponins are triterpenic glycosides found in a wide variety of plants, including quinoa. These triterpenic glycosides are derived from seven aglycones, oleanolic acid being one of those found in the highest percentage in quinoa. The objective of this work was to study different methods of oleanolic acid extraction in quinoas from two regions of the province of Jujuy, quantifying and comparing the influence of the cultivation area on the concentration of OA. The sampling was carried out in two regions of Jujuy province (Valles

and Puna). Two renowned population samples were collected (Amarilla de Marangani and 252) that are grown in both study areas, Abra Pampa and Perico. Four methods of AO extraction were compared: 1) washing and maceration 2) scarifying and washing 3) scarifying and repeated washings 4) soxhlet, selecting the best method for quantification. The quantification was carried out by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The washing method was carried out at different concentrations of EtOH / H₂O. The soxhlet method presented a recovery greater than 80%, being considered the best extraction method for the quantification of samples 252 and AMMA. The results indicate a higher OA concentration in quinoas grown in Perico.

Keywords: extraction methods, oleanolic acid, quinoa, saponins

INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) es un grano que se cultiva en la región andina de América del Sur (Jancurová, Minarovičová y Dandár, 2009). Se le denomina pseudocereal porque no pertenece a la familia de las gramíneas (Murillo y Mujica Sánchez, 2013). Es una especie anual, dicotiledónea perteneciente a la subfamilia Amaranthaceae (Medina-Meza, Nicole, Aluwi, Saunders y Ganjyal, 2016). Las quinoas pueden tolerar diversas condiciones ambientales, así como largos periodos de sequía y alta salinidad (González y Prado, 2013). Este género incluye alrededor de 250 especies (Bhargava, Shukla y Orhi, 2005). Tanto la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), la califican como un alimento único por su altísimo valor nutricional (Miranda y otros, 2012; Vega-Gálvez y otros, 2010). Sin embargo, presentan en su composición compuestos tóxicos llamados saponinas. Estos son metabolitos secundarios que pertenecen al grupo de los glucósidos formados por un azúcar (glucosa, galactosa y ramnosa) unido a una aglicona. Las saponinas se concentran principalmente en el exterior de las capas del grano, su concentración oscila entre el 0,01% y el 5% en peso seco (Medina-Meza y otros, 2016). Koziol (1991) clasificó las quinoas de acuerdo a la concentración de saponinas en: dulces con un contenido menor a 0,11% y amargas con un contenido mayor a 0,11%,

debido a que le confiere sabor amargo (Medina-Meza y otros, 2016) reduciendo sus características organolépticas y palatabilidad. Por tal motivo, deben ser removidas previo a su consumo. En la actualidad el nivel máximo tolerable de saponinas considerado apto para el consumo humano es de 0,06 a 0,12%, establecido a partir de un análisis de aceptabilidad organoléptica y test semicuantitativo de la espuma (Cáceres Ríos, 2016).

El Ácido Oleanólico (AO) es la principal saponina del grano de quinua (Mastebroek, Limburg, Gilles y Marvin, 2000), y representa entre un 76-86% del total de las saponinas (Troisi y otros, 2014), en tanto que otros investigadores como Cuadrado, Ayet, Burbano, Muzquiz, Camacho, Cavieres, Lovon, Osagie y Price (1994) proponen un porcentaje más bajo de 68%. Es muy soluble en 1-butanol le siguen el etanol, la acetona, y por último, el agua. Así mismo, esta solubilidad aumenta con el aumento de la temperatura (14°C a 54°C) (Liu y Wang, 2007). La toxicidad de las saponinas en animales superiores es variable (Valle Vega y Florentino, 2000). Estudios nutricionales *in vivo* en ratas alimentadas con quinua no lavada mostraron alteraciones en el crecimiento y se observó una importante reducción de la eficiencia de asimilación de los alimentos. La DL50 según la U.S. Environmental Protection Agency es de DL50 > 5000 mg/kg, es decir, que son tóxicas en grandes cantidades (Gianna, 2013). En el ser humano el efecto por vía oral aún está en discusión (FAO,

2013). Su contenido depende de diversos factores tales como: tipo de cultivo, edad de la planta, la localización geográfica o el órgano vegetal y factores ambientales y agronómicos (Güçlü-Üstündag y Mazza, 2007).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar distintos métodos de extracción de ácido oleanólico en quinuas de dos regiones de la provincia de Jujuy, cuantificando y comparando la influencia de la zona de cultivo sobre la concentración de AO.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

Se seleccionaron poblaciones de quinua provista por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Abra Pampa que provienen del Banco de germoplasma de Salta, tomadas de dos regiones de la provincia de Jujuy: Puna (Abra Pampa) y Valles Templados (Perico). Del resultado del muestreo estratificado (por región) y aleatorizado, surgieron dos muestras de población conocida que son cultivadas en ambas zonas de estudio, la 252 y la AMMA (Amarilla de Marangani). La primera, es material seleccionado a partir de la CHEN252 que tras 5 años de selección masal se las denominó RQ-252-16. En cuanto a la AMMA, es una variedad libre, provista por el Instituto Provincial de Agricultura Familiar (IPAF) a los productores. El estudio consta de dos etapas: 1° Selección de las dos mejores técnicas de extracción de AO y 2° comparación de AO en las dos muestras provistas por INTA, utilizando los dos mejores métodos de extracción obtenidos en el punto 1, ver Tabla N°1.

Tabla 1. Muestras seleccionadas para dos regiones de la provincia de Jujuy

CÓDIGO DE MUESTRAS	REGIÓN	COLOR
AMARILLA DE MARANGANI (AMMA)	Abra Pampa (AP)	amarillo a anaranjado
AMARILLA DE MARANGANI (AMMA)	Perico (P)	amarillo a anaranjado
252	Abra Pampa (AP)	blanco
252	Perico (P)	blanco

Recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas en bolsas de polietileno las que fueron debidamente identificadas y refrigeradas para su posterior análisis.

Propuesta metodológica

Se estudió los siguientes parámetros de extracción AO: tiempo de maceración, lavado, escarificado y relación porcentual etanol/agua. La cuantificación de AO se realizó por HPLC con detector DAD y utilizando una columna RP C18, según método oficial AOAC 27.3.06 y cenizas, según métodos oficiales AOAC 32.1.05.

Curvas de calibración utilizadas en la selección de métodos de extracción: se preparó una solución madre de AO a partir de la cual se hicieron las diluciones posteriores para los estándares. Para ello se pesó 7,2 mg de patrón de AO (SIGMA ALDRICH) y se disolvió en 5 mL de metanol, obteniéndose una concentración de 1440 mg/L. A partir de este patrón se prepararon 7 diluciones del estándar de 25, 50, 75, 100, 180, 360 y 720 mg/L. Se realizaron dos curvas, la 1° con rango de 100 a 1440 mg/L y 2° de 25 a 100 mg/L con posterior lectura en el HPLC. Las curvas calculadas dieron las siguientes rectas de regresión, ambas mostraron buena linealidad.

Ecuación (1) $y=1021.x+58968$ con $R^2=0,9992$

Ecuación (2) $y=12180.x+26654$ con $R^2=0,9996$

Para el cálculo del método de recuperación con amaranto se utilizó dos curvas de menor concentración.

Ecuación (3) $y=27305.x+15532$ $R^2=0,9969$

Ecuación (4) $y=10865.x+30918$ con $R^2=0,9934$

Curvas de calibración utilizadas en la cuantificación de AO en las muestras 252 y AMMA, utilizando los dos mejores métodos de extracción: Para la cuantificación de las muestras por el método soxhlet y método de escarificado y lavados reiterados se realizaron dos curvas nuevas. La 1° curva con concentraciones de 100, 150, 200 y 300 mg/L y la 2° de 1,5; 2,5 y 10 mg/L. Para ello se pesó

7,5 mg de patrón y se llevó a un volumen final de 25 mL con metanol obteniéndose una solución madre de 300 mg/L. A partir de esta se hicieron las diluciones para los estándares. Las curvas calculadas fueron:

Ecuación (5) $y = 5831.x + 34472$ con $R^2 = 0,9996$

Ecuación (6) $y = 8447.x + 7997$ con $R^2 = 0,9997$

Se realizó el cálculo del LD y LQ del equipo HPLC obteniéndose un LD= 0,215 mg/L y el LQ= 0,652mg/L.

Métodos propuestos de extracción de Ácido Oleanólico (AO)

Las técnicas convencionales de extracción de saponinas más utilizadas son: lavado, maceración, escarificado y soxhlet. Estas se basan en la solubilidad del soluto en el disolvente, la cual aumenta con la temperatura y agitación.

1- Método de extracción de un Lavado/ maceración

Inicialmente, se trabajó con la metodología propuesta por Lozano y otros (2012) con algunas modificaciones (Figura N°1). La técnica de extracción empleada fue lavado/maceración relación masa/volumen (m/v) con mezclas hidroalcohólicas etanol/agua (EtOH/H₂O) (v/v) (Tabla 2).

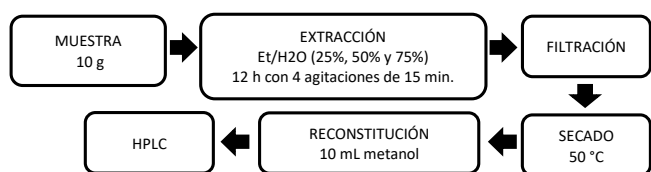


Figura 1. Diagrama de flujo de método de un lavado y maceración

Tabla 2. Parámetros de extracción

solución al 25 %	solución al 50 %	solución al 75%
m/v	m/v	m/v
1:10=10g/100mL	1:10=10g/100mL	1:10=10g/100mL
1:20=10g/200mL	1:20=10g/200mL	1:20=10g/200mL
1:40=10g/400mL	1:40=10g/400mL	1:40=10g/400mL
1:60=10g/800mL	1:60=10g/800mL	1:60=10g/800mL

1.1- Primera Modificación de método de un lavado y maceración

Se presentaron problemas de evaporación de la solución preparada, por lo tanto, se redujo a la mitad los volúmenes respetando las proporciones masa/volumen. Ver Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de extracción modificada

solución al 25 %		solución al 50 %		solución al 75%	
m/v	Código	m/v	código	m/v	Código
1:10	1A	1:10	2A	1:10	3A
1:20	1B	1:20	2B	1:20	3B
1:40	1C	1:40	2C	1:40	3C
1:60	1D	1:60	2D	1:60	3D

Se prepararon las soluciones de EtOH/H₂O al 25 %, 50 % y 75 % las que fueron agregadas a cada proporción de m/v de quinua respectivamente. Se agitó 4 veces por 15 min y se maceró 12 h. Se trasvasó el líquido de macerado de cada muestra a vasos de precipitado y se llevó a sequedad a 50 °C. Se pasó por filtro de membrana (0,45 µm) y se resuspendió con metanol en matraz de 10 mL, posterior lectura en el HPLC.

1.2- Segunda Modificación de método de un lavado

Se trabajó por triplicado y solo con las concentraciones EtOH/H₂O al 50 % y 75 %. Se utilizó la relación m/v 1:20 (1g/20 mL). Para la cuantificación se cambió la fase móvil del HPLC a acetonitrilo, ácido fosfórico 1,25% (85:15) (Quattrocchi, Abelaira y Laba, 1992). Para el procedimiento se pesó 1 g de quinua (252 de Abra Pampa y 252 de Perico) en tubos falcón de 50 mL. Se agregó 20 mL de solución EtOH/H₂O al 50 %. Se agitó 6 veces durante 10 min cada tubo, se dejó macerar 24 h, posteriormente se agitó mediante vórtex por 10-min y se centrifugó por 10 min a 2625 rpm (simulación de lavado). Se

filtró el sobrenadante y se llevó a evaporación hasta sequedad, se reitera el filtrado usando membrana 0,45 μm y se resuspendió con metanol a 10 mL. Se realizó igual procedimiento para la solución de 75%. Para la recuperación del método se trabajó de dos maneras: *Primero* con 1 g de amaranto con el agregado de 1 mL de patrón 180 mg/L. *Segundo*: con 1 g de amaranto parcialmente molido al que se le agregó 0,25 mL de patrón de 250 mg/L. En ambos casos se siguió el mismo procedimiento mencionado en el punto 1.2, acompañado cada uno de un blanco.

2- Método de extracción con escarificado y lavado

Siguiendo la propuesta por Quispe-Fuentes y otros, 2012 con modificaciones se procedió a pesar 1 g de quinua AMMA de Abra Pampa por duplicado. En paralelo se realizó el método de recuperación. Se escarificó el grano con un tamiz (N°20) por 5 min en vaso de precipitado. Para la recuperación se agregó a la cascarilla 0,25 mL (125 mg/L) de patrón de AO. Se lavó el grano con 10 mL de solución EtOH/H₂O al 50 % y se trasvasó a tubos falcón de 50 mL, se enjuagó el vaso (que contenía la cascarilla) con los 10 mL de solución restante y se juntó con los granos. Se llevó a shaker con temperatura de 40 °C a 140 rpm durante 24 h. Se centrifugó por 25 min a 2625 rpm. Se filtró, sacando el sobrenadante con pipeta, y se llevó a sequedad en shaker 50 °C 140 rpm. Para la disolución de la muestra seca se utilizó unas gotas de agua bidestilada, de acuerdo a Wehinger (2013). Se resuspendió en metanol, se agregó 10 gotas de agua bidestilada y se llevó a un sonicador por 30 min a 40 °C. Se filtró y se llevó a volumen final de 10 mL. Se realizó el mismo proceso con solución EtOH/H₂O al 60 %.

2.1- Modificación de método con escarificado y lavado

En este caso se realizaron dos procesos en paralelo uno de los cuales se llevó a sequedad y el otro no, ambas se trabajaron con solución alcohólica al 50%.

2.2.1- Primera Modificación

Se pesó 1 g de quinua por triplicado. Se escarificó en tamiz y se trasvasó la quinua escarificada a tubos. Al vaso con cascarilla se adicionó 5 mL de solución EtOH/H₂O al 50 % y se trasvasó a un tubo falcón de 50 mL, lavado el vaso con los 5 mL restantes. A los granos escarificados se le agregó 10 mL de solución. Se llevó a macerar en shaker a 40°C, 140 rpm por 20 h. Los tubos con cascarilla se centrifugaron a 2625 rpm por 25 min y se filtraron, el residuo de cascarilla se adicionó a los tubos que contenían los granos escarificados y se dejó macerar 3 h más en shaker luego se centrifugó y se filtró. Se unieron ambos líquidos de macerado y se enrazó a 30 mL. Se tomó una alícuota para la lectura por HPLC.

2.2.2 - Segunda Modificación

Se realizó el mismo procedimiento que en el anterior punto, pero se llevó a sequedad.

3- Método de extracción con escarificado y lavados reiterados

Se pesó 5 g de quinua en 4 tubos falcón de 50 mL, se escarificó, se lavó el vaso con 10 mL de solución EtOH/H₂O al 50% que se colocó en los tubos. Se pusieron los tubos en shaker a 50°C 200 rpm por 2 h, se retiraron y llevaron a centrífuga a 2625 rpm por 20 min. Se retiró el sobrenadante a otros tubos con pipeta. Al residuo de los tubos se les adicionó 10 mL de solución EtOH/H₂O al 50% y se llevó a shaker nuevamente en las mismas condiciones que las del primer caso. Se repitió este proceso una vez más. Dos de las muestras se llevaron a sequedad en shaker y dos se evaporaron hasta la mitad de volumen 5 mL. Se hizo tres lavados más para cada caso con el objeto de maximizar la extracción de las saponinas. A las muestras que se llevaron a sequedad se les adicionó 3 mL de agua bidestilada para su disolución y se procedió a la lectura en HPLC. El mismo procedimiento se siguió para la solución EtOH/H₂O de 60%

4- Método de extracción Soxhlet

Se trabajó en dos etapas, según el Método con

modificación propuesto por Ruales y Baboo (1993).
 Etapa 1: Extracción de grasas

Se pesó 5 g de quinua y se molió en mortero. Se colocó en una caja de petri tarada y se llevó a sequedad a 60 °C por 1 h. Se puso en desecador por 10 min, hasta peso constante de la muestra. Posteriormente se secó el balón de extracción a 100 °C por 10 min, se llevó a desecador y se registró el peso para el cálculo. Se agregó 150 mL de éter de petróleo al balón y se colocó el cartucho con muestra en el sifón. Se conectó todo el equipo y se inició la extracción de grasa durante 4 h. Una vez terminada se eliminó el solvente del balón por evaporación en manta de arena a 100 °C bajo campana. Posteriormente se secó el balón en estufa a 100 °C por 30 min, se enfrió en desecador y se pesó. Por último, se secó la muestra sin grasa en estufa por 15 min a 60 °C.

Segunda Etapa: Extracción de ácido oleanólico

Se colocó la muestra en el sifón y 150 mL de metanol en el balón, se conectó el soxhlet. El tiempo de extracción fue de 6 h. Una vez terminada la extracción se eliminó el metanol del balón por evaporación en manta de arena a 50 °C bajo campana hasta sequedad. El residuo del balón se resuspendió con metanol en matraz de 5 mL para su posterior cuantificación en HPLC. Para la recuperación del método se usó muestra desengrasada y seca de amaranto, a la que se le adicionó 1 mL de patrón de 300 mg/L (0,3 mg/mL) prosiguiendo el mismo procedimiento que en el punto 4. También se realizó un blanco.

La tabla N° 4 indica las modificaciones de los distintos métodos de extracción.

Tabla 4. Resumen de modificaciones de las diferentes técnicas de extracción de AO

Métodos	Modificaciones	Características modificadas
Lavados y maceración	1°	Se redujo el volumen de sol alcohólica a la mitad
	2°	Se trabajó solo con la sol alcohólica de 50% y 75% Se cambia la fase móvil a Acetonitrilo + ácido fosfórico.
Escarificado y lavado	1°	El escarificado se trabaja por separado del grano y solo al 50% de sol. Alcohólica
	2°	Idem a la 1° modificación, pero al final se lleva a sequedad
Escarificado y lavados reiterados		Sin Modificación
Soxhlet		Sin Modificación

RESULTADOS

Se presentan los resultados obtenidos de la 1° etapa: Selección de la mejor técnica de extracción de AO.

1- Resultados de Método de Extracción de AO.

1.1- Primera Modificación de método de un lavado/maceración

Solo se obtuvieron valores cuantificables de las muestras 1B, 3A y 3B los cuales se expresan en la tabla 5. Se utilizó la ecuación (2).

Tabla 5. Muestra comercial de quinua

Muestras	Áreas	Áreas Promedio	mg/L	mg/g	mg/Kg
1B	1752292	1752308,5	141,67	0,141	141,67
	1752325				
3A	815919	817449,5	64,92	0,064	64,92
	818984				
3B	755305	759908,5	60,20	0,060	60,20
	764512				

1.2- Segunda Modificación de método de un lavado

Se observó adherencias en el fondo del tubo y para poder reconstituirlas se agregó 5 mL de metanol. No se obtuvo repetibilidad en las áreas de los cromatogramas, en consecuencia, no hubo resultados concretos (Tabla 6). Por lo tanto, se realizaron nuevos cambios en la metodología. El porcentaje de recuperación obtenido fue del 55,5%. Respecto al Método de recuperación con amaranto parcialmente molido los resultados fueron: 16% para las tratadas con solución al 25 % EtOH/H₂O, 188% para las tratadas con 50 % EtOH /H₂O y del 148% para las del 75 % EtOH/H₂O.

Tabla 6. Áreas obtenidas en las muestras 252 de Perico y ABRA PAMPA

MUESTRAS 252 DE PERICO			MUESTRAS 252 ABRA PAMPA		
REPETICIONES	tR	áreas	REPETICIONES	tR	áreas
A	6,63	88173	A	6,65	39772
	6,63	88245		6,64	39284
B	6,67	71956	B	6,67	35002
	6,68	74370		6,66	34152
C	6,61	79703	C	6,67	34771
	6,62	79746		6,63	36142

La muestra se preparó por triplicado leyéndose dos veces en el HPLC

2- Método de extracción con escarificado y lavado

Se presentó la misma dificultad que en los puntos anteriores en la disolución con metanol. También se observó residuo en los filtros. Las muestras no pudieron ser cuantificables por el equipo de HPLC.

Se pudo cuantificar las muestras tratadas al 50 y 60% EtOH/H₂O. Para la lectura y cálculos se empleó la ecuación (2). El porcentaje de recuperación obtenido fue del 69,59 % para las tratadas con solución al 50 % EtOH/H₂O y del 41,74 % para las de solución al 60% EtOH/H₂O, indicando la inefectividad del método.

Primera y Segunda Modificación del método con escarificado y lavado

Las áreas obtenidas en la primera modificación no fueron cuantificables, motivo por el cual se decidió no continuar con la segunda modificación.

3- Método de extracción con escarificado y lavados reiterados

Se obtuvo mejor resultado de extracción en las muestras que se redujeron a mitad de volumen, con respecto a aquellas que se llevaron a sequedad. Se observa en la Tabla 7 los resultados de los 6 lavados. Se utilizó la ecuación (4).

Tabla 7. Promedios de AO en dos ensayos

AO ensayos reducidos a la mitad de volumen				AO ensayos con evaporación total					
Muestra	Áreas promedio	mg/L	mg/g AO	mg/Kg AO Total extraído en los lavados	Muestra	Áreas promedio	mg/L	mg/g AO	mg/Kg AO Total extraído en los lavados
A 1	629660,5	6,1	0,015		A 1	184974,5	2,0	0,006	
A 2	663977,5	6,4	0,032		A 2	625289	6,0	0,018	
A 3	667998,5	6,4	0,032		A 3	620488	6,0	0,018	
A 4	254528	2,6	0,013	120	A 4	169258,5	1,8	0,006	60
A 5	333694,5	3,4	0,017		A 5	217830	2,3	0,007	
A 6	242641,5	2,5	0,013		A 6	191886	2,1	0,006	
B 1	154006	1,7	0,006	130	B 1	112667,5	1,3	0,004	50
B 2	956635	9,1	0,045		B 2	628867,5	6,1	0,018	
B 3	624880	6,0	0,030		B 3	606314,5	5,9	0,018	
B 4	353109	3,5	0,018		B 4	275927,5	2,8	0,008	
B 5	347259,5	3,5	0,017		B 5	165715	1,8	0,005	
B 6	270012,5	2,8	0,014		B 6	ND	ND	ND	

*números arábigos junto a las letras mayúsculas indican N° de lavados

**ND no detectable

4- Método de extracción soxhlet

La concentración de AO se encontró dentro del rango de resultados hallados por otros autores. Se obtuvo un valor de 0,21 mg/g de AO para una muestra comercial (Tabla 8). La ecuación utilizada fue la (1).

Tabla 8. Contenido de AO mediante soxhlet

Muestra	tR	Áreas	Áreas promedio	mg/L	mg/g	mg/Kg
1	7,4	2233083	22022676,5	209,735691	0,21	209,73
1	7,3	2172270				

4.1- Método de recuperación mediante soxhlet con amaranto

Nuevamente se detectó la presencia de AO en el blanco de amaranto de 0,088 mg/g (Tabla 9). De acuerdo a bibliografía consultada (Cuadrado y otros, 1994; Rastrelli y otros, 1995) se encuentran ciertas saponinas en el amaranto, pero en cantidades imperceptibles al paladar. El porcentaje

de recuperación fue del 87 % que se determinó mediante la diferencia entre el valor obtenido del amaranto con patrón y el blanco, utilizando la ecuación (5).

Tabla 9. Método de recuperación mediante soxhlet

Amaranto	Área promedio	mg/L	mg/g	mg/Kg
s/patrón	549575,5	88,3387927	0,088	88,3
c/patrón	853602	140,478477	0,140	140,4

Resultados 2° etapa: comparación de AO en las dos muestras provistas por INTA, utilizando los métodos de extracción Método de escarificado y lavados reiterados y método Soxhlet.

1- Cuantificación de AO mediante método de escarificado y lavados reiterados

Las extracciones obtenidas por este método fueron muy bajas comparadas con las del soxhlet; en las Tablas 10 y 11 se puede observar la baja repetitividad de las lecturas, por lo tanto, no se aplicó el método de recuperación. Sin embargo,

las muestras se leyeron también con este método, debido a que los productores lo utilizan para la eliminación de saponinas. Las muestras AMMA de Abra Pampa presentó valores cuantificables mientras que en la de Perico no hubo detección del AO (Tabla 10) En las muestras 252 se obtuvieron resultados en ambas zonas de cultivo (Tabla 11), además solo se obtuvo valores del duplicado y triplicado. Para los lavados A1, B1, C1 y C2 se utilizó la ecuación (5). En las restantes se usó la ecuación (6). El promedio de AO extraído fue de 39,77 mg/Kg, cinco veces menos que el soxhlet.

Tabla 10. Promedios de AO. Muestra AMMA

Lavados	Muestra AMMA Abra Pampa					Muestra AMMA Perico				
	Área promedio	mg/L	mg/Kg	mg/Kg total	Prom. mg/Kg	Área promedio	mg/L	mg/Kg	mg/Kg total	Prom. mg/Kg
A1	ND	ND	ND			ND	ND	ND		
A2	ND	ND	ND	-		ND	ND	ND	-	
A3	ND	ND	ND			ND	ND	ND		
B1	148487,5	19,553	19,55			ND	ND	ND		
B2	196671	27,816	27,81	69,24	46,13	ND	ND	ND	-	-
B3	162042,5	21,877	21,87			ND	ND	ND		
C1	128672	16,155	16,5			ND	ND	ND		
C2	49976,5	6,863	6,86	23,01		ND	ND	ND	-	
C3	ND	ND	ND			ND	ND	ND		

Tabla 11. Promedios de AO en Muestra 252

Lavados	Muestra 252 Abra Pampa					Muestra 252 Perico				
	Área promedio	mg/L	mg/Kg	mg/Kg total	Prom. mg/Kg	Área promedio	mg/L	mg/Kg	mg/Kg total	Prom. mg/Kg
A1	140221	18,135	18,13			ND	ND	ND		
A2	72895,5	9,576	9,57	35,8		ND	ND	ND	ND	
A3	60364,5	8,092	8,09			ND	ND	ND		
B1	176374,5	24,335	24,33			191441,5	26,919	26,91		
B2	77033	10,066	10,06	43,9	39,77	252851,5	37,451	37,45	105,93	100,99
B3	72279	9,503	9,5			276824,5	41,562	41,56		
C1	147185	19,329	19,32			214830,5	30,93	30,93		
C2	98555,5	10,99	10,99	39,62		216957	31,295	31,29	96,04	
C3	70606	9,305	9,3			231641	33,813	33,81		

Si bien los resultados obtenidos con este método fueron bajos, en la Figura 2 se puede observar que la muestra de Perico contiene más AO que las muestras de Abra Pampa.

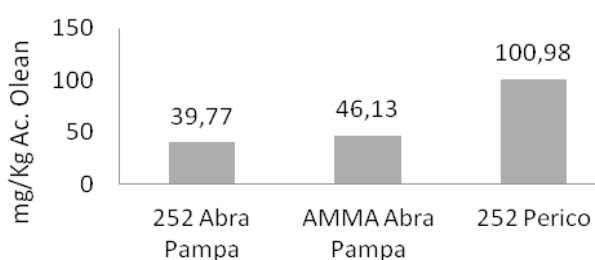


Figura 2. AO obtenidos por el método de lavados reiterados por población y localidad de cultivo.

2- Cuantificación de AO mediante soxhlet

En la recuperación del método se obtuvo un porcentaje del 87 %. Este porcentaje se utilizó para corregir los valores obtenidos del AO en las muestras. Para el cálculo de la concentración de AO se utilizó la ecuación (5). Ver tabla 12.

Tabla 12. Concentración de AO mediante soxhlet

Muestra	Áreas promedio	mg/L	mg/g	mg/Kg
AMMA Ab. Pampa 1	1088311,5	180,73	0,208	208,69
AMMA Ab. Pampa 2	810765	133,13	0,153	153,73
AMMA Perico 1	1197874	199,52	0,230	230,39
AMMA Perico 2	841744,5	138,44	0,159	159,86
252 Ab. Pampa 1	1108310,5	184,16	0,212	212,65
252 Ab. Pampa 2	1146138,5	190,64	0,220	220,14
252 Perico 1	1481777,5	248,20	0,286	286,61
252 Perico 2	1687037,5	283,41	0,327	327,26

Se encontró mayor contenido de AO en las muestras cultivadas en Perico comparadas con las muestras de Abra Pampa (Figura 3 y 4).

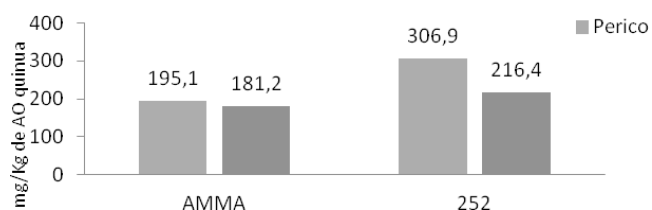


Figura 3. Comparación de contenido de ácido oleanólico según las regiones de estudio

Al realizar el análisis estadístico ANOVA se observó diferencias significativas con un $p=0,0484$ entre las localidades en la población 252, mientras que en la AMMA no se observó diferencias significativas con un $p=0,7851$. Por otro lado, se observó diferencias significativas con un $p=0,0406$ entre las dos poblaciones de quinua (Figura 4).

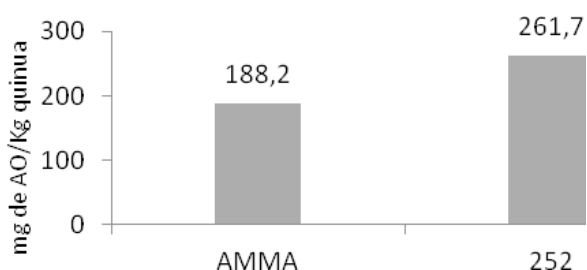


Figura 4. Promedio del Contenido de ácido oleanólico según las poblaciones de quinua

En la Figura 5 se observa la comparación entre los dos métodos seleccionados para cuantificar las muestras provistas por INTA. Se observan diferencias significativas entre los métodos de lavado tanto para la muestra 252 como para la AMMA, obteniendo mayor concentración en las muestras extraídas a través del método soxhlet.

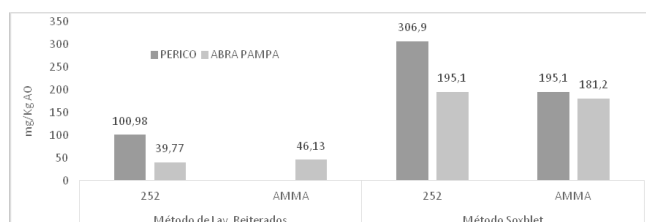


Figura 5. Promedio de AO en Quinuas de 2 regiones diferentes, empleando los 2 métodos de extracción seleccionados

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue estudiar cual es el mejor método de extracción de AO usando el método de lavado con modificaciones y soxhlet. En el primero se encontraron valores por debajo de los obtenidos en otros estudios realizados (Nickel y otros, 2016; Quispe-Fuentes y otros, 2012; Monje, Yarko y Raffailac, 2006; Muir, Paton, Ballantyne y Aubin, 2002; Zhu y otros, 2002). Los investigadores Dini, Schenttino, Simioli y Dini. A (2001) y Zhu y otros (2002) determinaron que los procesos de eliminación con mezclas alcohólicas no son muy eficaces, ya que incluso después del lavado algunas especies de saponinas permanecen en las semillas, por lo que se recomiendan el uso de agua ligeramente alcalina en lugar de neutra. Este comportamiento se debe al carácter anfífilo o anfipático, que caracteriza a las saponinas (Ahumada, Ortega, Chito y Benítez, 2016). Así mismo, Bacigalupo y Tapia (2000) compararon tres temperaturas del agua de lavado (50, 70 y 80 °C), y encontraron que, mediante el lavado con agua a 50 °C, se puede reducir el contenido de saponina hasta en un 25%, del contenido inicial; mientras que con lavados a 70 y 80 °C, la saponina residual ya no es detectable. De igual forma Quispe y otros (2012) determinaron que la concentración de saponinas disminuía con el aumento de la temperatura (de 20°C a 60°C) de lavado con solución EtOH/H₂O al 50%, bajo agitación constante; con tiempos de 15 a 120 min.

En este trabajo se utilizó una solución alcohólica de etanol absoluto y agua bidestilada al 50 % y 75 %, siendo estas las que presentan mejores condiciones para la extracción del AO. Aunque la bibliografía indica que el alcohol isopropanol es el mejor solvente para la extracción, este no fue utilizado debido a su toxicidad. La temperatura de extracción fue de 50°C bajo agitación constante por un tiempo de 120 min cada lavado. Sin embargo, la extracción fue menor a otras bibliografías consultadas (Nickel y otros, 2016; Quispe-Fuentes y otros, 2012; Monje y otros, 2006). Cabe acotar que, en los trabajos mencionados, se determinaron saponinas totales y no AO como en el presente trabajo.

Por otro lado, la técnica de extracción por soxhlet, cuya recuperación obtenida fue del 87 %, justifica el empleo de esta técnica. Los resultados muestran que el contenido de AO en una misma variedad varía según la zona de cultivo. De acuerdo al estudio de Soliz-Guerrero y otros (2002), el contenido de saponinas se ve afectado por un déficit hídrico en el suelo; estos promueven bajos contenidos de saponinas, que concuerdan con los obtenidos por Troisi y otros (2014) y De Santis y otros (2016). Otro investigador Koziol (1992) muestra cómo las quinuas cultivadas en regiones de poca precipitación presentan concentraciones menores a las cultivadas en zonas de mayor precipitación. Esto justifica los resultados obtenidos en Abra Pampa, donde el contenido es menor respecto al obtenido en Perico (Valles) debido a que la Puna (3500 a 4000 msnm) es una zona árida con escasas precipitaciones (entre 100 y 300 mm anuales) a diferencia de los Valles que reciben anualmente entre 500 y 1200 mm, con temperaturas medias relativamente bajas debido a su altura promedio de 1100 msnm (Alcoba y Chávez, 2015). Los resultados obtenidos, también mostraron que el contenido de AO presente en la población de quinua 252 son mayores a la AMMA.

Según Cuadrado y otros (1994) el AO representa un 68 % del total de las saponinas en la variedad Amarilla de Marangani y entre un 35-41% en las variedades blancas, todas cultivadas en el altiplano de Perú. Troisi y otros (2014) propone entre un 76-85 % para genotipos de quinuas identificadas como RB y KVLQ52 cultivadas en Italia. Así mismo Gómez-Caravaca y otros (2012) en su investigación de compuestos fenólicos y saponinas en muestras de quinua cultivadas bajo diferentes regímenes de irrigación salina y no salina determina un porcentaje de AO del 36-50 % con quinuas provenientes de Dinamarca, pero cultivadas en Italia.

En todos los casos el AO fue el que se encontró en mayor proporción entre otras saponinas. Estas diferencias en el contenido de saponinas (en este caso AO) se deben a factores ambientales y/o genéticos de la quinua.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las muestras provenientes de Perico presentaron mayor contenido de AO que las de Abra Pampa. Los resultados son similares a los reportados por Cuadrado y otros (1994) de 218 mg/Kg para AMMA y para las variedades blancas (todas de Perú) valores menores de 41 mg/Kg. Por el contrario, quinuas cultivadas en Italia presentaron un mayor contenido de AO con valores entre 1631,29 mg/Kg a 2806,37 mg/Kg (Troisi y otros, 2014). Así también, un estudio realizado en Chile obtuvo altos contenidos de AO 5880 mg/Kg en ecotipos de quinuas chilenas (Miranda y otros, 2012).

Es necesario analizar otras variedades aumentando el número de poblaciones de quinuas para obtener valores estadísticamente significativos, estos resultados son los primeros obtenidos de Ácido Oleanólico en la provincia y sirven de base a futuros estudios que contribuirán a la caracterización de las quinuas cultivadas en Jujuy.

CONCLUSIÓN

El mejor método encontrado para la extracción de AO fue el método soxhlet, sin embargo, el método de escarificado y lavados reiterados es el utilizado por los productores para la eliminación de saponinas. De las soluciones empleadas se pudo observar que la solución EtOH/H₂O al 50% es la que produce mayor extracción. Por otro lado, se encontró diferencias significativas de AO entre AMMA (188,2 mg/Kg) y 252 (261,7 mg/Kg). La población 252 mostró diferencias significativas según la región de cultivo (Perico: 306,9 mg/Kg; Abra Pampa: 216,4 mg/Kg) no así en la población AMMA (Perico: 195,1 mg/Kg; Abra Pampa: 181,2 mg/Kg), siendo mayor la concentración de AO en quinuas cultivadas en Valles probablemente debido al mecanismo de defensa del cultivo frente al posible ataque de plagas ante las condiciones ambientales, no así con la población AMMA.

Ante los resultados obtenidos podemos clasificar a las quinuas estudiadas como quinuas dulces con una concentración menor al 0,11%. Se

puede estimar que las condiciones ambientales influyen en la cantidad de AO presentes en la quinua, pero se requiere seguir estudiando otras poblaciones de quinua.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada, A., Ortega A., Chito, D., y Benítez R. (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. Revista Colombiana de Ciencias, Química y Farmacia; Vol. 45 (3), 438-469. doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n3.62043
- Alcoba, L., y Chávez, M. F. (2015). Análisis comparativo de la incorporación del cultivo de quinua como estrategia productiva y comercial, en Valles templados y la Puna jujeña. IPAF NOA-INTA. V Congreso Mundial Quinua 2015. Recuperado de: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_-_anlisis_comparativo_de_la_incorporacin_del_cul.pdf
- Bacigalupo, A., y Tapia, M. (2000). Capítulo V: Agroindustrias. Factor saponina. En: Tapia M. (ed.). Cultivos andinos subexplotados y su aporte en la alimentación. FAO. Santiago de Chile (Chile). Ediciones Gegra S. A., pág. 114-121, 124. Recuperado de: http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro10/home10.htm
- Bhargava, A., Shukla, S., and Orhi D. (2005). An Indian perspective. Industrial Crops and Products 23, 73-87. doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.04.002
- Cáceres Ríos, M. (2016). Evaluación sensorial del sabor amargo de doce accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) y su correlación con el contenido de saponinas. (Tesis de Ingeniería) Universidad Nacional Agraria La Molina-Facultad de Industrias Alimentarias, Lima (Perú). Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2661/Q04-C323-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cuadrado, C., Ayet, G., Burbano, C., Muzquiz, M., Camacho, L., Cavieres, E., Lovon, M., Osagie, A. and Price K. R. (1994). Occurrence of Saponins and Sapogenols in Andean crops. Journal of the Science of Food and Agriculture 67, 169-172. doi.org/10.1002/jsfa.2740670205
- De Santis, G., Maddaluno, C., D'Ambrosio, T., Rascio, A., Rinaldi, M. and Troisi, J. (2016). Characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) accessions for the saponin content in Mediterranean environment. Italian Journal of Agronomy. Vol. 11: 774, 277-281. doi.org/10.4081/ija.2016.774
- Dini, I., Schettino, O., Simioli, T. and Dini, A. (2001). Studies on the Constituents of *Chenopodium quinoa* Seeds: Isolation and Characterization of New Triterpene Saponins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 741-746. doi.org/10.1021/jf000971y
- FAO (2013). Quinua. Operaciones de Poscocecha; pág. 18-20. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/ar364s/ar364s.pdf>
- Gianna, V. (2013). Extracción, cuantificación y purificación de saponinas de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd provenientes del Noroeste Argentino. (Tesis Doctoral) Universidad Nacional de Córdoba- Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Córdoba. Recuperado de: <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/1413/Tesis%20Doctoral%20Vicente%20Gianna%202013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gómez-Caravaca, A. M., Iafelice, G., Lavini, A., Pulvento, C., Caboni, M.F., and Marconi E. (2012). Phenolic compounds and saponins in quinoa samples (*Chenopodium quinoa* Willd) grown under different saline and nonsaline irrigation regimens. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, 4620-4627. doi.org/10.1021/jf3002125

- González, J. A., y Prado, F. E. (2013). Quinoa: aspectos biológicos, propiedades nutricionales y otras consideraciones para su mejor aprovechamiento. *Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales*, Año 3 N° 5 (INTA), pág. 5-15. Recuperado de: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-revista-ciencia-y-tecnologa-de-los-cultivos-indu_4.pdf
- Güçlü-Üstündag, O. and Mazza, G. (2007). Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47, 231-258. doi.org/10.1080/10408390600698197
- Jancurová, M., Minarovičová, L. and Dandár, A. (2009). Quinoa a Review. *Czech Journal Food Science*. Vol. 27, N°2, 71-79. Recuperado de: <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/06732.pdf>
- Koziol, M. J. (1991). Afrosimetric Estimation of Threshold Saponin Concentration for Bitterness in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54, 211-219. doi.org/10.1002/jsfa.2740540206
- Koziol, M. J. (1992). Chemical Composition and Nutritional Evaluation of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of Food Composition and Analysis* 5, 35-68. doi.org/10.1016/0889-1575(92)90006-6
- Lozano, M., Ticona, E., Carrasco, C., Flores, Yonny., Almanza, G. R. (2012). Cuantificación de Saponinas en residuos de quinua *Chenopodium quinoa* Willd. *Revista Boliviana de química*. Vol. 29, N°2, pág. 131-138. Recuperado de: http://www.scielo.org.bo/pdf/rbq/v29n2/v29n2_a02.pdf
- Liu, L. and Wang, X. (2007). Solubility of Oleanolic Acid in Various Solvents from (288.3 to 328.3) K. *Journal of Chemical and Engineering Data*. Vol. 52, N°6, pág. 2527-2528. doi.org/10.1021/JE700312R
- Mastebroek, H.D., Limburg, H., Gilles, T. and Marvin, H.J. (2000). Occurrence of saponins in leaves and seeds of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 152-156. doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000101)80:1%3C152::AID-JSFA503%3E3.0.CO;2-P
- Medina -Meza, I. G., Nicole, A., Aluwi, N. A., Saunders, S. R. and Ganjyal, G.M. (2016). GC-MS Profiling of Triterpenoid Saponins from 28 Quinoa Varieties (*Chenopodium quinoa* Willd.) Grown in Washington State. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 8583-8591. doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02156
- Miranda, M., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., Rodríguez, M. J., Maureira, H. and Martínez, E. A. (2012). Nutritional aspects of six Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) ecotypes from three geographical areas of Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72(2), 175-181. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/chiljar/v72n2/at02.pdf>
- Monje, C., Yarko, A., y Raffailac, J.P. (2006). Determinación de saponina total en quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) Memoria IV Congreso Nacional de la Asociación Boliviana de Protección Vegetal. C.E.A.C. - Dpto. Fitotecnia-FCAPV-UTO. ABPV. Oruro, Bolivia. Recuperado de: <https://es.scribd.com/doc/81052755/DETERMINACION-DE-SAPONINA-TOTAL-EN-QUINUA>
- Muir, A. D., Paton, D., Ballantyne, K. and Aubin, A. A. (2002). Process for recovery and Purification of saponins and saponins from quinoa (*Chenopodium quinoa*). United States Patent. Recuperado de: <https://patentimages.storage.googleapis.com/a3/31/12/c2334f5d0bc88f/US6355249.pdf>
- Murillo, A. C., y Mujica Sánchez, A. (2013). Quinoa: pasado, presente y futuro. Artículo Quinoa. Pe. Recuperado de: <https://drive.google.com/file/d/1JcH67joR69pq0mErTlyzgreKaDRpZPtj/view>

- Nickel, J., Pio Spanier, L., Botelho, F.T., Arocha Gularte, M. and Helbig, E. (2016). Effect of different types of processing on the total phenolic compound content, antioxidant capacity, and saponin content of *Chenopodium quinoa Willd* grains. *Food Chemistry* 209, 139-143. doi: [org/10.1016/j.foodchem.2016.04.031](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.031)
- Quattrocchi, O. A., Abelaira de Andrizzi, S. I., Laba, R. P. (1992). Introducción a la HPLC. Pág. 3-4, 40, 71, 322-324. Recuperado de: file:///C:/Users/tom-4/Downloads/Introduccion_a_la_HPLC_Quattrocchi.pdf
- Quispe-Fuentes, I., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Lemus-Mondaca, R., Lozano, M. and AH-Hen, K. (2012). A Kinetic approach to saponin extraction during washing of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) seeds. *Journal of Food Process Engineering*, 1-9.
- Rastrelli, L., Pizza, C., Saturnino, P., Schettino, O. and Dini, A. (1995). Studies on the Constituents of *Amaranthus caudatus* (Kiwicha) Seeds. Isolation and Characterization of Seven New Triterpene Saponins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 904-909. doi: [org/10.1021/jf00052a011](https://doi.org/10.1021/jf00052a011)
- Ruales, J. y Baboo, N. M. (1993). Saponins, phytic acid, tannins and protease inhibitors in quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) seeds. *Food Chemistry* 48, 137-143. Recuperado de: <https://fdocuments.in/document/saponins-phytic-acid-tannins-and-protease-inhibitors-in-quinoa-chenopodium.html>
- Solíz-Guerrero, J. B., Jaso de Rodríguez, D; Rodríguez-García, R., Angulo-Sánchez, J.L. and Méndez-Padilla, G. (2002). Quinoa Saponins: Concentration and composition análisis. In *Trend in New Crops, and New Uses*. Janick J; Whipkey A. Eds. ASHA Press, Alexandria, VA, 100-114. Recuperado de: <https://hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/pdf/jasso-110.pdf>
- Troisi, J., Di Fiore, R., Pulvento, C., Dandria, R., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Martinez, E. A., Lavini, A. (2014). Saponinas. Capítulo 3.3. En: Bazile D. et al (Editores), "Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013": FAO (Santiago de Chile) y CIRAD, (Montpellier, Francia), pág. 317-330. Recuperado de: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Cultivos%20Andinos/Quinoa/Bibliografia%20Quinoa/4%20OTROS/La%20Quinoa%20en%20el%20mundo%20FAO.pdf>
- Valle Vega, P., Florentino, B.L. (2000). Agentes tóxicos naturalmente presentes en los alimentos. Introducción a la toxicología de alimentos. En: *Toxicología de alimentos*. México, D.F, Ed. Instituto Nacional de Salud Pública Centro Nacional de Salud Ambiental, pág. 77-80. Recuperado de: https://www.fio.unicen.edu.ar/usuario/gmanrique/images/Toxicologia_de_Alimentos_VegaFlorentino.pdf
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., Martínez, E. A. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*), an ancient Andean grain: a review. *Journal of Science Food and Agriculture* 90, 2541-2547. Recuperado de: file:///C:/Users/tom-4/Downloads/Nutrition_facts_and_functional_potential_of_quinoa.pdf
- Wehinger, C. C. (2013). Compuestos fenólicos y saponinas en semillas de quinua. (Tesina de Licenciatura) Universidad de Talca- Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela de tecnología médica, Talca (Chile). Recuperado de: <https://silo.tips/download/compuestos-fenolicos-y-saponinas-en-semillas-de-quinua>
- Zhu, N., Sheng, S., Sang, S., Jhoo, J., Bai, N., Karwe, M. V., Rose, R. T. and Ho, Ch. (2002). Triterpene Saponins from Debittered Quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 865-867. Doi: 10.1021/jf011002l

