

**Universidad Nacional Agraria  
La Molina**

**Facultad de Industrias Alimentarias**



**Desarrollo de un Método  
Espectrofotométrico para la  
Determinación de Acido  
Oleanólico en Quinoa  
(Chenopodium quinoa Willd.)**

**Tesis presentada para optar el Título de**

**INGENIERO EN INDUSTRIAS  
ALIMENTARIAS**

**Carlos César Augusto  
Elías Peñafiel**

**Lima – Perú**

**1990**

## TABLA DE CONTENIDO

	<u>Pags.</u>
I.- INTRODUCCION .....	13
II.- REVISION DE LITERATURA .....	16
2.1. La Quinua .....	16
2.1.1. Clasificación Botánica .....	16
2.1.2. Datos Agronómicos .....	19
2.1.3. El valor nutritivo de la quinua .....	22
2.2. Las saponinas .....	25
2.2.1. Conceptos Generales .....	25
2.2.2. Acido Oleanólico .....	36
2.2.3. Propiedades .....	40
2.2.3.1. Físicas .....	40
2.2.3.2. Químicas.....	41
2.2.3.3. Biológicas .....	41
2.2.4. Métodos para la Identificación y Determinación Cuantitativa de Saponinas y de Acido Oleanólico.....	46
2.2.4.1. Consideraciones Generales.....	46
2.2.4.2. Detección e Identificación.....	47
2.2.4.3. Determinación Cuantitativa de saponinas y de Acido Oleanólico.....	50
2.2.4.3.1. Sililación .....	55
2.2.5. Espectrofotometría de saponinas, saponinas y ácido oleanólico .....	59
2.2.6. Aislamiento de Saponinas .....	65
III.- MATERIALES Y METODOS .....	74

3.1. Materia prima .....	74
3.2. Equipos, materiales y reactivos .....	74
3.2.1. Equipos y materiales .....	74
3.2.2. Reactivos .....	74
3.3. Metodología seguida .....	75
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	77
4.1. Aplicación en Quinoa del método de Honerlagen y Tretter (1979).....	77
4.1.2. Detección de carbohidratos.....	80
4.1.3. Estudio espectrofotométrico de los extractos de Saponinas y Sapogeninas.....	82
4.1.4. Estudio espectrofotométrico del standard de ácido oleanólico.....	86
4.1.5. Conclusiones .....	89
4.2. Evaluación de la recuperación de ácido oleanólico en tres flujos extractivos.....	92
4.2.1. Conclusiones. ....	103
4.3. Purificación de ácido oleanólico y propuesta de un método espectrofotométrico definitivo.....	103
4.3.1. Determinación espectrofotométrica.....	109
4.3.2. Expresión de ácido oleanólico en términos de saponinas semipurificadas.....	112
4.3.3. Relación de sapogenina/azúcar. Ensayos de aná- lisis de azúcares por cromatografía de gas. ....	116
4.3.4. Conclusiones .....	118
V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	120
VI.- BIBLIOGRAFIA .....	122
VII.- APENDICES .....	129

## INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

### FIGURAS:

Nº 1 : Partes del fruto de la quinua. ....	18
Nº 2 : Ejemplo de la estructura de una saponina.....	27
Nº 3 : Sapogenina (genina) liberada por la hidrólisis de saponina .....	27
Nº 4 : Azúcares liberados por la hidrólisis de saponina....	27
Nº 5 : Ejemplo de la complejidad en estructura de saponinas.	28
Nº 6 : Ejemplo de saponina triterpénica. ....	29
Nº 7 : Digitonina, presentada como un ejemplo de saponina esteroidal. ....	29
Nº 8 : Vía más probable para la biosíntesis de saponinas..	31
Nº 9 : Geninas que sirven como base para la clasificación de las saponinas triterpénicas. ....	37
Nº 10: Ejemplo de sapogeninas que han sido caracterizadas en la naturaleza. ....	37
Nº 11: Sapogeninas que han sido caracterizadas en quinua...	38
Nº 12: Ac. oleanólico, (fórmula desarrollada).....	38
Nº 13: Ac. oleanólico, (fórmula semidesarrollada).....	38
Nº 14: Flujo para la determinación del ácido oleanólico por cromatografía de gas. ....	53
Nº 15: Flujo para la determinación de saponinas en raíces de Ginseg Panax y extractos. ....	56
Nº 16: Trimetil silil derivación de ácido oleanólico .....	60
Nº 17: Degradación del BSTFA mediante el agua.....	60

Nº 18: Espectros de absorción en ácido sulfúrico concentrado del ác. oleanólico, hederagenin y otros.....	63
Nº 19: Flujo para la purificación preliminar se saponinas de quinua. ....	66
Nº 20: Método para la purificación de saponinas de quinua Real.....	69
Nº 21: Método para la obtención de sapogeninas de quinua Real a partir de saponinas purificadas.....	71
Nº 22: Aplicación con ligeras modificaciones del flujo de Honerlagen y Tretter (1979) a la extracción de saponinas de quinua.....	78
Nº 23: Espectros de absorción del standard de saponina blanca Merck y del extracto crudo de saponinas.....	83
Nº 24: Espectros de absorción del standard de Glucosa Anhidra.....	84
Nº 25: Espectros de absorción del standard de ácido oleanólico y del extracto de sapogeninas.....	85
Nº 26: Espectros de absorción del ácido oleanólico a los 55' y a las 24 horas después de la reacción.....	88
Nº 27: Curva standard de ácido oleanólico determinada por espectrofotometría. ....	90
Nº 28: Flujos para la determinación de ácido oleanólico en quinua por cromatografía de gas.....	93
Nº 29: Cromatograma de los TMS-Derivados de las sapogeninas	102
Nº 30: Flujo espectrofotométrico definitivo resumido así como su evaluación.....	105
Nº 31: Flujo espectrofotométrico definitivo para la cuantificación de ácido oleanólico .....	106

Nº 32: Cromatografía en capa fina (tLC) de las saponinas.	109
Nº 33: Espectros de absorción del standard de ácido oleanólico y de la mancha cuyo Rf es similar al del ácido oleanólico. ....	111
Nº 34: Flujo para la obtención de saponinas semipurificadas .....	115
Nº 35: Espectros de absorción del extracto crudo de saponinas de quinua y de saponinas semipurificadas.....	117

**CUADROS:**

Nº 1 : Promedio de los valores nutricionales en granos de quinua.....	23
Nº 2 : Comparación del contenido de aminoácidos esenciales de la proteína de grano de quinua.....	24
Nº 3 : Comportamiento de las saponinas frente a los métodos : afrosimétrico, hemolítico, espectrofotométrico....	33
Nº 4 : Procedencia y estructura de saponinas encontradas en la naturaleza.....	39
Nº 5 : Propiedades y usos de las saponinas en general.....	42
Nº 6 : Variación de la absorbancia en función del tiempo ..	87
Nº 7 : Curva de calibración del standard de ácido oleanólico	91
Nº 8 : Condiciones gas cromatográficas seguidas para la determinación de los TMS derivados de saponinas.....	96
Nº 9 : Porcentajes de ácido oleanólico determinados por GC.	97
Nº 10: Tratamiento estadístico del % del ácido oleanólico..	100
Nº 11: Análisis de varianza de los porcentajes de ácido oleanólico.....	100
Nº 12: Media (X), desviación standard (S) y coeficiente de de variabilidad (CV).....	112

## RESUMEN

Se evaluó por cromatografía de gas, tres métodos extractivos de ácido oleanólico. El extracto de saponinas del método (Augusto 1979), que arrojó mayor tenor (0.32%) fue tratado por cromatografía en capa fina preparativa para la purificación de ácido oleanólico, siendo éste leído al espectrofotómetro, previa reacción de color con el reactivo de Lieberman Burchard modificado.

Así una porción (10 grs. aprox.) de granos de quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) fue extraída por gradiente en un sistema n-BuOH 80%: EtOH 80%;1:2;1:1;2:1;3x 50ml) a reflujo en baño de arena (115°C x 30'), filtrada (lana de vidrio y Whatman Nº1) y el extracto conteniendo las saponinas fue concentrado (±2.5ml) al rotavapor (60°C) y llevado a volumen (25ml) con una mezcla n-BuOH 80%: EtOH 80%(1:1;v/v).

Una alícuota (10 ml) fue llevada a sequedad en el rotavapor para proceder a la hidrólisis: el extracto seco se solubilizó en un sistema 1-4 Dioxano:agua(1:1; 20 ml) se adicionó 20ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12N y se hidrolizó (baño de arena 110°C x 1.5 hrs.). Se enfrió a temperatura ambiente para posteriormente extraer las saponinas resultantes con clorofórmico (3 x 50 ml).

Una alícuota de la solución clorofórmica de sapon-

ninas fue concentrada y algunos microlitros (equivalente a 121 mgrs. de quinua aproximadamente) fueron sembrados en bandas de 5cm frente a un standard de ácido oleanólico sobre placas recubiertas por silicagel G Merck de 0.5mm de espesor, siendo desarrolladas en una mezcla que consiste en un sistema Cloroformo: Acetona: benceno (80:20:10;v/v)obteniéndose buena resolución.

Localizadas las manchas con vapores de yodo y eliminado el yodo remanente con corriente de aire forzado, la banda cuyo Rf fue similar a la del standard de ácido oleanólico, fue separada e introducida a una columna de vidrio de 1.2 cm. de diametro, eluida con cloroformo, secada, disuelta en 1ml de ácido acético glacial tratada con 4 ml del reactivo Lieberman Burchard modificado, el que consiste en una mezcla de ácido sulfúrico: ácido acético glacial(1:1; v/v). Se calentó en baño maría a 60°C x 25', se enfrió y se llevó al espectrofotómetro donde fue leída a 527 nm contra un blanco. El standard de ácido oleanólico tratado bajo las mismas condiciones mostró una linealidad en el rango de 60 a 480 microgramos cuando se ploteó cantidad vs. absorbancia; así como una absortibilidad específica  $E_{1\%}^{1\text{cm}}_{527\text{nm}} = 67.80$ .

El porcentaje de ácido oleanólico en quinua ha sido determinado espectrofotométricamente(0.296±0.027), el mismo que presenta un error en exactitud de 10.7% en defecto, frente a la evaluación gas cromatográfica.

Adicionalmente se obtuvo saponinas semipurificadas

en nuestro laboratorio, las mismas que presentaron un tenor de ácido oleanólico de 11.74% hallándose la siguiente relación:

$$\text{ácido oleanólico} \times 8.5208 = \text{saponinas.}$$

esta misma relación aplicada a nuestros resultados, arroja un tenor de 2.44% de saponinas ( $=0.286 \times 8.5208$ ).

## INTRODUCCION

La quinua (Chenopodium quinoa, Willd.) es un cultivo que forma parte del ecosistema andino y ha sido cultivada por los campesinos de las altas regiones de los andes desde la época del Imperio de los Incas (Cardozo, 1976; citado por Augusto, 1979). En la dieta de los pobladores andinos de América, la quinua fué el reemplazo prioritario, o a veces exclusivo, de las proteínas animales (Cardozo y Tapia, 1979).

El grano de quinua supera en proteínas a los cereales más importantes como trigo, maíz y arroz. Su verdadero valor está determinado por la calidad de sus proteínas (Cardozo y Tapia, 1979).

El hecho de que la planta crezca bajo condiciones de temperatura y humedad excepcionalmente bajas, en la que otros productos no pueden competir (Junge, 1973; citado por Augusto, 1979), hace que su cultivo, en las zonas de nuestro Altiplano principalmente, se presente como una magnífica alternativa, no sólo por el hecho de estar en su ecología natural; sino también, por que como consecuencia de esto, puede convertirse en el instrumento para el desarrollo socio-económico de la región (Bacigalupo, 1970; citado por Augusto, 1979).

El factor que se aduce como obstáculo para la industrialización de la quinua es su contenido de saponinas. Siendo las saponinas las responsables del sabor amargo

Las coberturas externas del grano (Bacigalupo, 1970; citado por Augusto, 1979), se destinan esfuerzos tanto a nivel genético como industrial para su eliminación. Industrialmente, se elimina la saponina por fricción y/o lavado; genéticamente, se pretende lograr una quinua libre de saponinas (variedades dulces). La evaluación de ambos esfuerzos se hace necesaria, por lo que se hace indispensable un método analítico cuantitativo (Bacigalupo, 1970; Norman et al, 1975; citados por Augusto 1979).

Se da el nombre de saponinas (del latín SAPON = jabón) a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y que disminuyen la tensión superficial de ésta cuando se agita, formando espuma abundante y relativamente estable. Por hidrólisis de la saponina se obtiene carbohidratos y una aglicona, llamada sapogenina, la cual puede tener una estructura esteroideal o triterpénica (Dominguez, 1973).

Las saponinas esteriodales están localizadas en las monocotiledoneas y las triterpenoides son aisladas principalmente de las dicotiledoneas (Dominguez, 1973), habiéndose demostrado que las saponinas de quinua pertenecen a este último grupo (Augusto, 1979; Burnouf-Radosévitch, 1984).

El presente trabajo tiene por objetivo proponer un método espectrofotométrico para la determinación de ácido oleanólico (principal sapogenina de quinua).

Adicionalmente se extraerá y purificará parcialmente saponinas de quinua para hallar un factor, el mismo que permita expresar ácido oleanólico como saponinas de quinua.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1.- LA QUINUA

#### 2.1.1.- Clasificación Botánica.

Carrea(1953) menciona que la quinua es llamada también: trigo indio o arrocillo y mijo en España, siendo su clasificación taxonómica la siguiente:

Reino.....Vegetal.  
 División (tipo)....Fanerógama.  
 Clase .....Angiospermas.  
 Sub-clase.....Dicotiledoneas  
 Orden .....Centropermales.  
 Familia.....Chenopodaceas.  
 Género.....Chenopodium.  
 Especie.....Chenopodium quinoa Willd.

Su clasificación Botánica aparece en Vildoso (1798) como Chenopodium quinoa Willd., y Narrea (1976) afirma que su clasificación fué hecha por Luis Christian Willdenow.

Es una planta herbácea, anual, de más de un metro de altura, cuyo color puede variar desde verde hasta púrpura, de hojas alternadas y pecioladas. Presenta inflorescencia y una espiga de flores hermafroditas.

Mazzoco y Rietti(1941) así como Narrea(1976) dicen que desde el punto de vista botánico, el fruto es

un aquenio<sup>1</sup>, de granos discoides, pequeños, de 2 a 2.5 mm de diámetro, con embrión<sup>2</sup> anular de 1.2 a 1.6 mm de largo. Cornejo(1976) menciona que haciendo un corte transversal del fruto se puede observar, entre otros, un esporito joven y parcialmente desenvuelto con la presencia de dos cotiledones.

Gandarillas et al(1979), afirman que el fruto (Figura 1) es un aquenio cubierto por el perigonio<sup>3</sup> del que se desprende con facilidad cuando está seco. El color del fruto está dado por el perigonio y se asocia directamente con el de la planta, de donde resulta que puede ser verde, púrpura o rojo.

El pericarpio del fruto está pegado a la semilla, presenta alveolos y en algunas variedades se pueden separar fácilmente. Pegado al pericarpio se encuentran las saponinas que le transfieren el sabor amargo.

La semilla está envuelta por el episperma en forma de una membrana delgada. El embrión está formado

---

<sup>1</sup> Aquenio.-Fruto seco, indehiscente y con pericarpio separado del tegumento de la semilla.  
Indehiscente.-Fruto cuyo pericarpio no se abre naturalmente, al llegar a la madurez, para dar salida a la semilla.

Pericarpio.-Parte exterior del fruto que cubre la semilla, en el cual generalmente, se pueden distinguir tres partes:una externa o exocarpio y otra interna o endocarpio.

<sup>2</sup> Embrión.- Germen o rudimento.

<sup>3</sup> Perigonio.-Envoltura de los órganos sexuales de una planta.

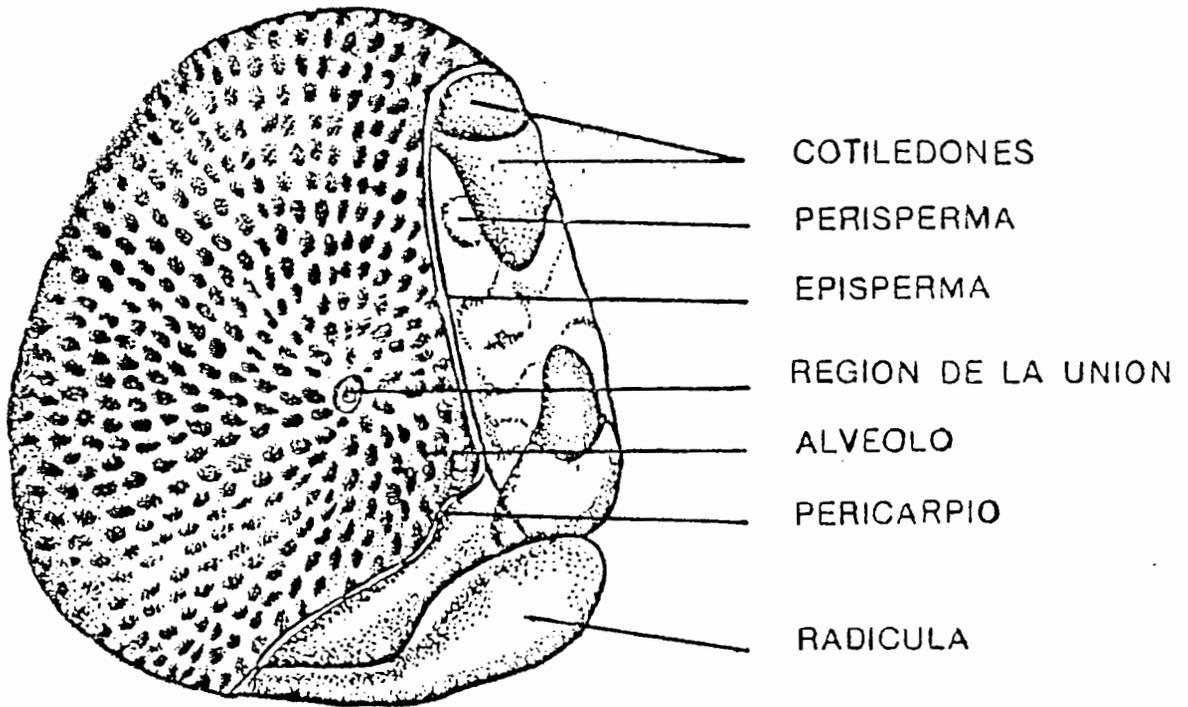


FIGURA 1: PARTES DEL FRUTO DE QUINUA.

FUENTE: TAPIA et al 1979.

por los cotiledones y la radícula y constituye la mayor parte de la semilla que envuelve al perisperma como un anillo. El perisperma es almidonoso y normalmente de color blanco.

Según Carbajo(1977), el almidón de la quinua se halla concentrado en el perisperma del grano, mientras que en la generalidad de los cereales se encuentra en el endosperma.

La quinua puede ser encontrada en las regiones que abarcan desde el Canadá hasta el sur de Chile, tomando nombres diferentes como quinoa o quinua en el Perú, Argentina, Bolivia y Chile; en Colombia es conocida como suba (Junge, 1973).

#### 2.1.2.- Datos Agronómicos.

La quinua es una planta que forma parte del ecosistema andino y por eso es cultivada por los campesinos de las regiones altas de los Andes desde la época del Imperio de los Incas(Cardozo, 1976). Se adapta a otras latitudes y altitudes; así, muestras provenientes de Bolivia fueron sembradas en Campinas-Brazil, con crecimiento y producción satisfactorias(Rivero, 1941). Muestras procedentes del Perú crecieron con mucho suceso en Africa(Elmer, 1942). En Alemania, la quinua es cultivada como una planta alimenticia(Lubsen, 1918).

Es una especie que resiste bien a las sequías, dando buenos rendimientos con apenas 300 mm de precipitación anual; se adapta muy bien a diversos suelos,

prefiriendo los ricos en potasio y magnesio(Dendy et al; citado por Augusto, 1979).

Una de las principales ventajas agronómicas por las cuales la quinua es de interés económico, es la de crecer y presentar excelente producción en suelos considerados inapropiados para el trigo(Junge; 1973); representando una gran esperanza en términos socioeconómicos para los pueblos que la producen (Bacigalupo, 1970); citado por Augusto, 1979). Gandarillas(1983) menciona que la importancia económica de la quinua radica en el hecho de que en el Altiplano Boliviano, es el único producto que puede cultivarse en forma extensiva, y con índices de relativa seguridad dada sus condiciones de extrema sequedad.

Según Romero(1983) una serie compleja de factores han motivado, a través del tiempo, a una importante reducción de la producción de esta quenopodiácea en el Perú. Así, en los inicios de la década del cincuenta, la producción se estimaba alrededor de 50,000 toneladas métricas (TM) y un rendimiento de 1TM/Ha. En los inicios de la década del sesenta las cifras de la producción bajaron a 20,000 TM y la productividad a 800 kg/-Ha. En el setenta, la producción desciende a 6,000 - 7,000 TM y la productividad a 500 Kgs/Ha, situación que se mantiene en la década del 80.

En la Sierra Central y Norte del Perú, la quinua es un cultivo de carácter familiar que se realiza

en asociación con otros cultivos, asegurando la disponibilidad en cantidades pequeñas de grano para uso doméstico. El Valle del Mantaro es posiblemente la zona donde puede encontrarse extensiones mayores de cultivo, hay casos de algunas hectareas que han alcanzado rendimientos hasta de 3 TM/Há. Así también, Romero(1983) afirma que en Colombia se cultiva quinua en el departamento de Nariño, donde se puede obtener rendimientos de 6 TM/Há, sin mayor complicación por el uso de insumos.

A pesar de que en la actualidad se conocen más de cuarenta variedades de quinua(Bacigalupo, 1970; citado por Augusto, 1979), las más difundidas por su rendimiento y cultivo, según Mujica, 1977 (citado por Augusto 1979) son:

**Sajama:** de origen Boliviano, de ciclo vegetativo precoz (ciento cincuenta días), de alto rendimiento, grano blanco y grande, relativamente libre de saponinas solubles.

**Kancolla:** de origen Peruano(Puno), de ciclo vegetativo largo, grano blanco y medio, con alto tenor de saponinas solubles, considerada la variedad de mayor cultivo.

**Blanca de Juli:**de origen Peruano(Puno), de período semilargo y de buen rendimiento, con pocas saponinas solubles.

**Chewca:** de origen Peruano(Puno), con rendimiento regu-

lar casi ningún tenor de saponinas solubles.

**Witulla:** de origen Peruano(Puno), periodo vegetativo largo, con rendimiento regular y alto tenor de saponinas solubles.

### 2.1.3.- El Valor Nutritivo de la Quinua.

Fuentes, 1972 (citado por Linn, 1983) analiza los porcentajes de la constitución anatómica del grano y encuentra que la cáscara constituye un porcentaje bajo, de 1.5 a 3%. El germen constituye aproximadamente el 25% del grano y contienen 48.5% de proteína y 28% de grasa. Con el germen separado y estabilizado, se puede contar con una materia prima rica en proteínas y aceites.

Este "concentrado" protéico natural serviría de base para elaborar diversos productos, tales como aceites comestibles, una leche de germen de quinua con procesos similares a los usados para obtener leche de soya y para su incorporación en fórmulas para uso infantil (Linn, 1983).

La porción amilacea, es rica en carbohidratos pero pobre en grasa y proteínas (0.7 y 3.4% respectivamente). La industria cervecera utiliza hasta un 20% de carbohidratos en la elaboración de cerveza. Una de las especificaciones que deben cumplir es contener poco aceite (inferior a 1%) y proteínas que intervienen en los procesos de elaboración de una cerveza de buena calidad. La porción amilacea podrá cumplir con estas

especificaciones y podría constituir una buena materia prima para la industria cervecera, que en la actualidad utiliza arroz partido; también podrá utilizarse en galletería y en la producción de pan, almidón, fideos y otros (Yañez e Ivanovic, 1983).

Cardozo y Tapia (1979), mencionan que el grano de quinua supera en proteínas a los cereales más importantes. Los autores citados reportan la composición de los granos de la quinua (Cuadro 1).

**Cuadro 1:** Promedio de los valores nutricionales en los granos de quinua.

Componente	Promedio ( % )	Nº de determi- naciones	Rango %
Humedad	12.65	58	6.80-20.70
Proteína	13.81	77	7.47-22.08
Grasa	5.01	60	1.80- 9.30
Cenizas	3.36	60	2.22- 9.80
Hidratos de Carbono.	59.74	50	38.72-71.30
Celulosa	4.34	22	1.50-12.20
Fibra	4.14	30	1.10-16.32

Linn (1983), citando el cuadro 2, hace las siguientes precisiones, respecto a la calidad de la proteína de la quinua:

- La quinua tiene el índice más alto de los aminoácidos lisina, isoleucina y treonina, en comparación con la proteína patrón de FAO.
- En el caso del triptófano y la valina, la proteína de quinua representa valores de 90 y 100% respectivamente en comparación con la proteína de referencia establecida por la FAO.

- La proteína de la quinua presenta un perfil de aminoácidos bien balanceado, lo que no se encuentra en las proteínas y leguminosas de consumo amplio.
- Basado en estos análisis, se puede decir que la quinua es altamente apta para ser incorporada a mezclas de vegetales y otros cereales por su alto contenido de proteína bien equilibrada.

Cuadro 2.- Comparación del contenido de aminoácidos esenciales de la proteína del grano de quinua respecto a otros alimentos (g/16g N).

AMINOACIDOS										
Alimento	Arg.	Fenil.	His.	Iso.	Leu.	Lis.	Met.	Treo.	Trip.	Val.
Trigo	4.0	5.0	1.8	4.2	7.0	2.1	1.2	2.6	1.1	3.9
Maiz	3.5	4.5	2.1	4.6	13.0	2.9	1.8	4.0	0.6	5.1
Arroz	5.5	4.8	1.6	4.5	8.2	3.8	1.7	3.7	1.0	6.7
Avena	6.1	5.0	1.7	4.8	7.0	3.4	1.4	3.1	1.2	5.5
Quinua	6.5	4.5	3.2	5.2	6.5	6.3	2.5	4.3	0.7	5.0
Soya	7.2	4.9	2.4	5.4	7.7	6.3	1.3	3.9	1.4	5.2
Leche	3.2	1.4	2.7	10.	6.5	7.9	2.5	4.7	1.4	7.0
Carne	6.4	4.1	3.5	5.2	8.2	8.7	2.5	4.4	1.2	5.5
Huevo	6.6	5.8	2.4	8.8	6.6	6.4	3.1	5.0	1.6	7.4
Pescado	5.6	3.7	---	5.1	7.5	8.8	2.9	4.3	1.0	5.3
Patrón	0.	6.0	0.	4.0	7.0	5.5	3.5	4.0	1.0	5.0

Fuente: FAO, 1973; citado por Linn, 1983.

Adicionalmente cabría mencionar, que el diáme-

tro de los granulos de almidón de la quinua, es entre 1.5 y 3 micras que es menor que el maíz y trigo con 1 a 23 y 2 a 40 micras (Wolf et al, citado por Linn 1983). En el estudio del aceite de la quinua se encontró la siguiente composición (De Bruin, citado por Linn, 1983):

Acido Oléico _____	48.0	%
Acido Linoléico _____	50.7	%
Acido Linolénico _____	0.8	%
Acidos grasos no saturados _____	0.46	%

La quinua ha sido utilizada para complementar harinas con buenos resultados. Por ejemplo, una mezcla de 20 % de quinua y 80 % de trigo, mejora el valor del PER del trigo en 72% (Mahoney et al, 1975; citado por Augusto, 1979).

## 2.2.-LAS SAPONINAS-

### 2.2.1.-Conceptos Generales

Según Birk (1969), las saponinas son glicócidos que están presente en una amplia variedad de plantas. Ellas están caracterizadas por su sabor amargo, formación de espuma en soluciones acuosas, así como por el hecho de hemolizar los glóbulos rojos. Son elevadamente tóxicas para animales de sangre fría. Su toxicidad es relacionada con su actividad para bajar la tensión superficial. Aunque el término saponina es referido a compuestos diferentes en lo que refiere a su composición química, ellas son caracterizadas sobre la base de sus propiedades comunes y mayormente por la formación de espuma, propiedad de la cual deriva el

término saponina. El rol de las saponinas en la planta, no ha sido aún establecido.

Por hidrólisis completa liberan sapogeninas (aglicones) y azúcares (Hexosas, Pentosas, azúcares ácidos). (Figs. 2, 3 y 4). Las saponinas son difícilmente purificadas y caracterizadas y a causa de su peso molecular relativamente grande (Fig. 5), los análisis sólo dan fórmulas empíricas aproximadas.

Las saponinas se dividen en dos grandes grupos de acuerdo a la naturaleza química de las sapogeninas : esteroidales ( $C_{27}$ ) o triterpenoides ( $C_{30}$ ) figs. 6 y 7. Las saponinas son de interés a causa de su actividad hemolítica y, en algunas de ellas, por su propiedades terapéuticas. Las saponinas en alimentos y forrajes han sido estudiadas muy poco y diferentes propiedades que se le atribuyen no han sido siempre probadas.

Basu y Rastogi (1967) dicen que químicamente, las saponinas son glicósidos, las cuales por hidrólisis liberan : (A) una o más unidades de azúcares y (B) aglicones libres de azúcares los cuales son derivados de sistemas de anillos policíclicos y son comúnmente referidos como sapogeninas.

Dominguez (1973) menciona que se da el nombre de saponinas (del latín SAPON =jabón) a un grupo de glicósidos que se disuelven en el agua y disminuyen la tensión superficial de ésta cuando se agita, formando espuma abundante y relativamente estable. Por hidrólisis

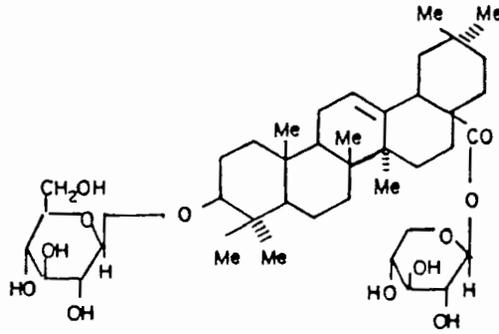


FIGURA 2..Ejemplo de la estructura de una saponina  
Fuente:Hiller 1978,citado por Augusto 1979.

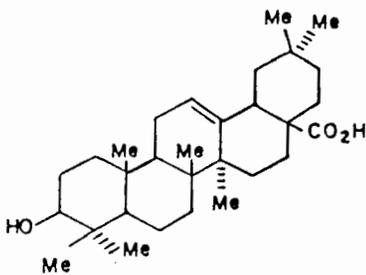
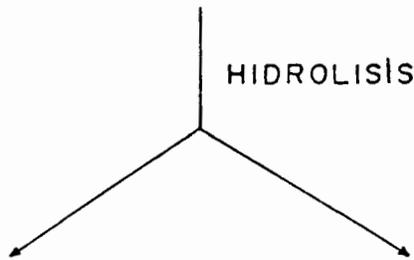


FIGURA 3.. Sapogenina (o genina)  
liberada por la hidrólisis de saponinas.

Fuente: Fernandes 1967, citado por Augusto 1979.

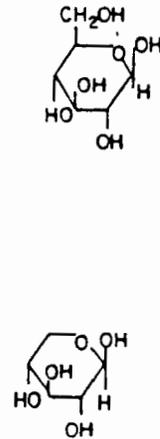


FIGURA 4.. Azúcares, liberados por  
la hidrólisis de saponinas.

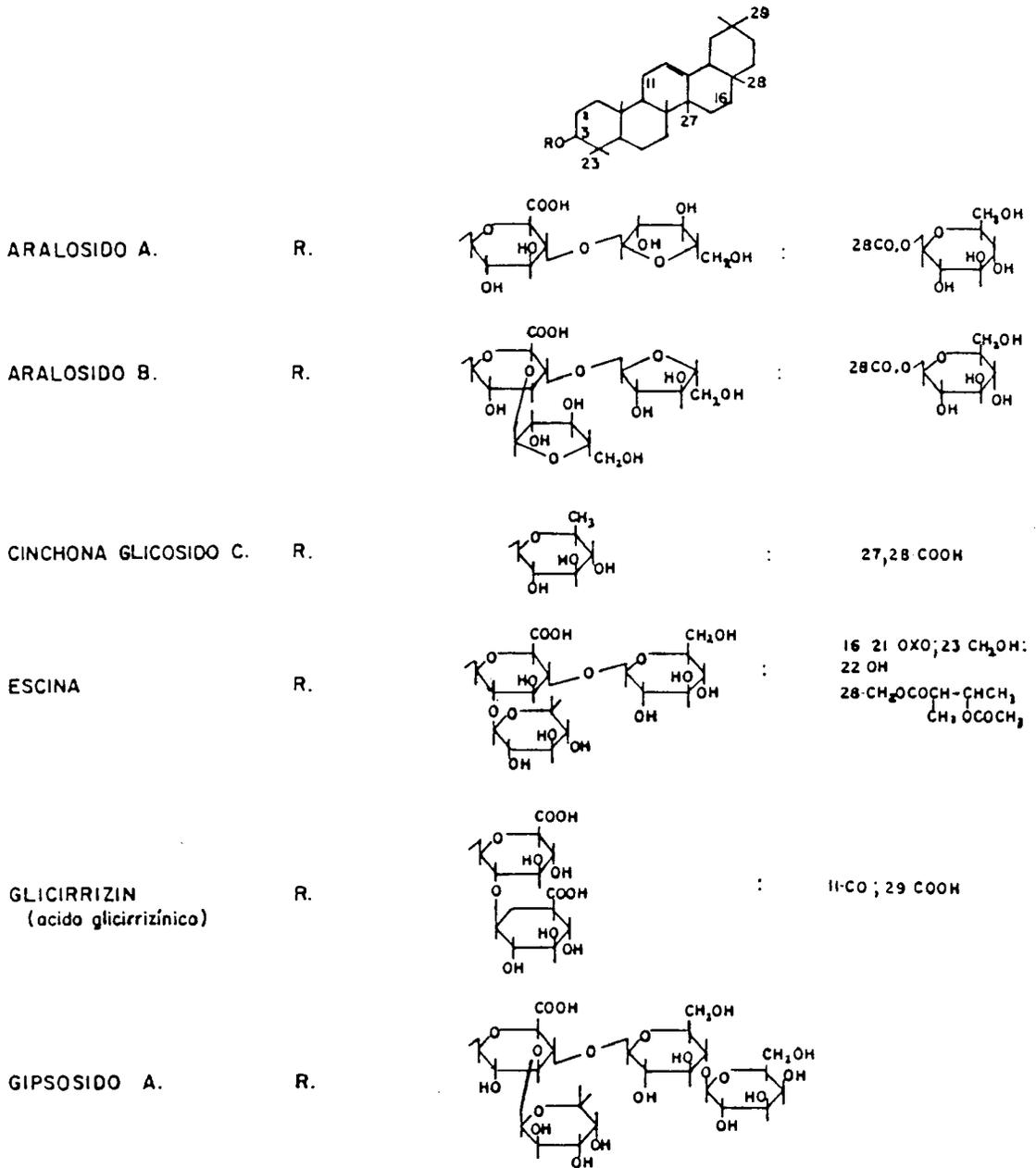


FIGURA 5.- Ejemplo de la complejidad en la estructura de saponinas (sustitución de los hidrógenos en los carbonos 3 y 28 del ác. oleanólico).

Fuente: Basu y Rastogi 1967.

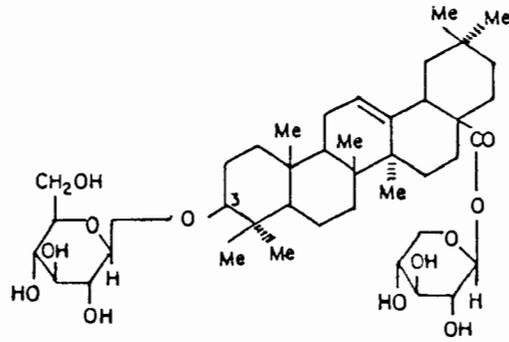


FIGURA 6.- Ejemplo de saponina triterpénica  
Fuente: Hiller 1978, citado por Augusto 1979

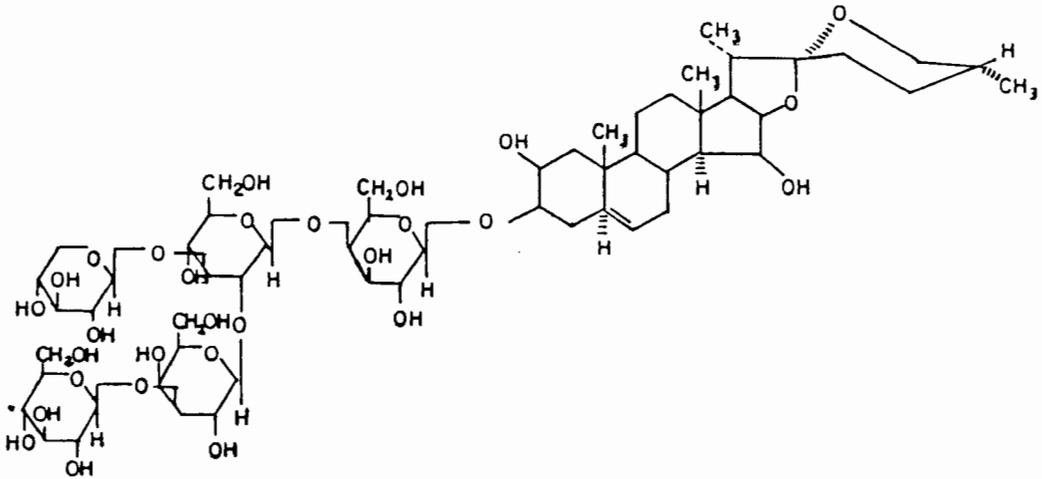


FIGURA: 7 .- Digitonina, presentada como ejemplo de saponina esteroidal.  
Fuente : Windholz 1976, citado por Augusto 1979

sis de la saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona llamada sapogenina la cual puede tener una estructura esteroideal o triterpeniodes.

La saponinas esteriodales están localizadas en las monocotiledoneas y las triterpenoides son aisladas principalmente de las dicotiledóneas.

Ruzicka(1963), citado por Birk(1969), sugirió analogías en las estructuras entre las triterpenoides y las esteriodales; él también expresó la hipótesis que en las células vivientes la biosíntesis de las esteroidales y de las triterpenoides proceden de un precursor común, el escualeno. El mecanismo hipotético sugerido por Ruzicka se basó sobre conocimientos anteriores, en los cuales las células vivientes son capaces de sintetizar esteroides de moléculas pequeñas como ácido acético. Desde entonces numerosas investigaciones confirman la hipótesis de Ruzicka (Fig. 8)

Birk(1969) menciona que las saponinas exhiben ciertas propiedades características las cuales son usadas para su identificación y caracterización : sabor amargo, formación de espuma estable en soluciones acuosas, hemólisis de los glóbulos rojos, elevada toxicidad para peces y anfibios y formación de compuestos moleculares con colesterol y otros hidroxiesteroides. Una gran variabilidad existe, sin embargo, en estas propiedades, entre saponinas procedentes de varias fuentes y no todas las saponinas necesariamente poseen todas

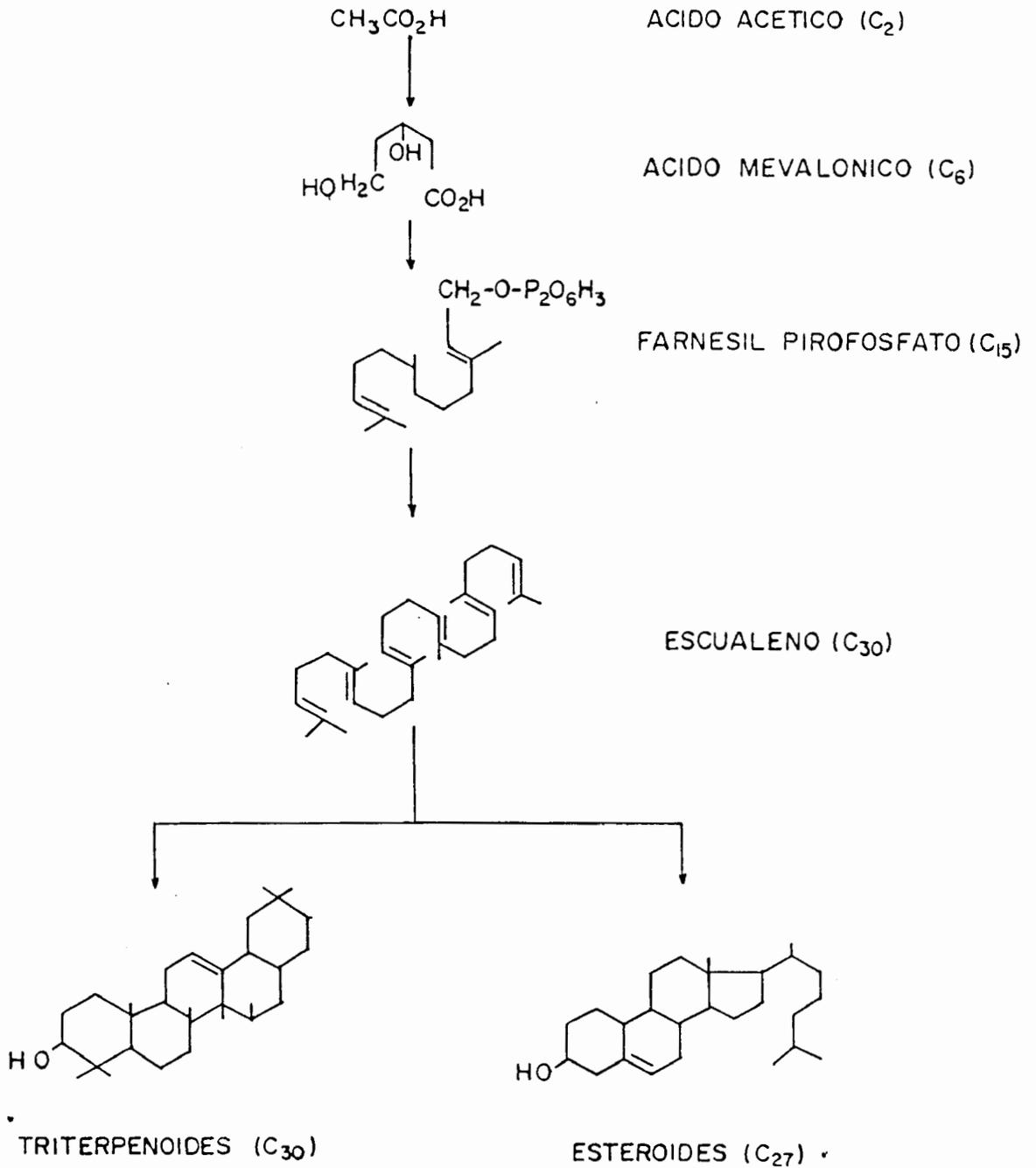


FIGURA 8.- Via más probable para la biosíntesis de saponinas.  
 Fuente: Birk, Y (1969).

estas propiedades.

Saponinas de soya no forman complejos con el colesterol; saponinas de Trevol Ladino no son tóxicas para peces y no hemolizan los glóbulos rojos. Sin embargo, saponinas procedentes de la misma planta pueden variar en la potencia relativa de las diferentes actividades características; por ejemplo, saponina de soya e, es un fuerte agente hemolisante con una baja actividad afrosimétrica (formación de espuma), sin embargo en la saponina de soya c esta relación es inversa (cuadro 3).

Las propiedades lipofílicas e hidrofílicas, también como su actividad superficial y la habilidad para migrar en diferentes medios y para combinarse con esteroides, son determinadas por la combinación entre las sapogeninas y las moléculas de carbohidratos en la molécula de saponina.

Desde que la mayoría de las caracterizaciones fueron hechas sobre extractos de saponinas en vez de que sobre sustancias puras, es muy posible que ciertas propiedades las cuales fueron atribuidas a las saponinas, resulten realmente de materiales acompañantes (coextractivos). Es posible, por consiguiente, sugerir que las propiedades listadas anteriormente, las cuales están en uso común para su caracterización e identificación de saponinas, deberían ser usadas solamente como indicadores. La caracterización final y evaluación de-

Cuadro 3.

Comportamiento de las saponinas frente a los métodos: afrosimétrico, hemolítico, espectrofotométrico.

Procedencia	Saponina	Afrosimétrico (formación de espuma)	Hemolítico	Espectrofotométrico	Fuente
Trebol ladino	-	-	negativo	-	Birk (1969)
Soya	soya e	baja actividad	fuerte agente hemolizante.	-	Birk (1969)
Soya	soya c	alta actividad	bajo agente hemolizante.	-	Birk (1969)
Quinoa	fracción X	negativo	fuerte agente hemolizante.	-	Augusto (1979)
Quinoa	fracción Y	baja actividad	bajo agente hemolizante	alto coeficiente de extinción	Augusto (1979)

Nomenclatura:

"-" : no reportado

Negativo: por ejemplo, en el caso de las saponinas del trebol ladino, significa que no hemolizan los glóbulos rojos

bería ser relacionada con análisis de composición química (Birk, 1979).

Augusto (1979), trabajando con fracciones de extractos de saponinas de quínoa, en la evaluación de tres métodos: afrosimétrico (formación de espuma), hemolítico (ruptura de glóbulos rojos) y espectrofotométrico; encontró que fracciones con cero milímetros de formación de espuma arrojaban el más alto porcentaje de hemólisis de glóbulos rojos de las siete fracciones analizadas. Esta falta de correlación también se presentó entre el método espectrofotométrico con el afrosimétrico y con el hemolítico. Así, el más alto coeficiente de extinción ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ , 470nm) presentó una de las más bajas alturas de espuma, así como un bajo porcentaje de hemólisis (cuadro 3).

Cabe mencionar que el método espectrofotométrico utilizó el reactivo de Lieberman-Burchard para la formación del color, no siendo este reactivo específico, se espera que haya reaccionado con coextractivos presentes, los mismos que no fueron eliminados por adicionales procedimientos de limpieza (Augusto, 1979).

Respecto a la actividad hemolítica, Segal et al (1966) propusieron que el aglicón de las saponinas, es decir las sapogeninas, son el factor esencial en la determinación de las propiedades hemolíticas de las saponinas. Esto lo determinaron esterificando, tanto saponinas como sapogeninas de Styrax Officinalis L. las

cuales presentaron una elevada actividad hemolítica a iguales concentraciones molares.

En posteriores investigaciones, el mismo Segal et al (1970), trabajando con saponinas esteroidales y triterpenoides, encontró un significativo incremento de la actividad hemolítica cuando la función ester introducida en la sapogenina es neutral. Los ésteres con un grupo polar extra, (OH ó COOH) como por ejemplo los succinatos, siempre exhiben un decremento de la actividad hemolítica en comparación con los correspondientes esterres simples. Así fué establecido que la presencia de un grupo OH ó COOH en las partes ácidas del ester inhiben la hemólisis. Esta inhibición puede ser salvada por acetilación ó metilación de los grupos OH ó COOH respectivamente. Parece que no es la introducción de un grupo éster el que incrementa la hemólisis, sinó la remoción del grupo polar. Sapogeninas unidas a grupos polares, la esterificación de uno de ellos, no importe cual, incrementan la hemólisis, mientras que el bloqueo del segundo grupo reduce este efecto.

Templeton, 1969 (citado por Augusto, 1979) menciona que las saponinas triterpénicas poseen un esqueleto de más de treinta átomos de carbono, generalmente pentacíclicos pudiendose encontrar en cuatro series:

a) Serie del Oleanano ( $\beta$ -Amirina), b) Serie del Ursano ( $\alpha$ -Amirina), c) serie de lupano u hopano y d) Otros tipos de esqueletos. Según Basu y Rastogi(1967), reportan

la estructura de  $\beta$ -Amirin,  $\alpha$ -Amirin y el Lupeol (Fig.- 9); así mismo, mencionan que las geninas derivadas de  $\beta$ -Amirin son innumerables en variedad y frecuencia, y el ácido oleanólico parece ser el compuesto predominante en la naturaleza. Las geninas, las cuales han sido caracterizadas se representan en la Fig 10. Así mismo, se presenta una lista de las saponinas cuyas estructuras han sido elucidadas. También, se muestra la estructura de las saponinas ya identificadas (Cuadro 4).

Por otro lado se ha demostrado que la principal sapogenina de quinua es el ácido oleanólico (Augusto, 1979 y Burnouf-Radosevitch 1984). Su identidad, junto con la de otra sapogenina, la hederagenina (Figura 11), ha sido confirmada por espectrometría de masa (Meyer et al 1983, citado por Burnouf-Radosevitch 1984), estando presente no sólo en las semillas de quinua sino también en las raíces de esta planta (Burnouf-Radosevitch y Paupardin, 1983).

### 2.2.2 - Acido Oleanólico

Las figuras 12 y 13 muestran la fórmula desarrollada y semidesarrollada del ácido oleanólico. En The Merck Index (1968), se reporta lo siguiente :  
 ácido  $3\beta$ -Hidroxiolean-12-en-28-oico; Oleanol; Cariophyllin.  $C_{30}H_{48}O_5$ ; peso molecular 456.71. Se encuentra en estado libre en hojas de Olea europea, en Myrtaceae (clavo de olor) y en Swertia japonica (Maxim). Como acetato en corteza de abedul, como glicósido en muchas

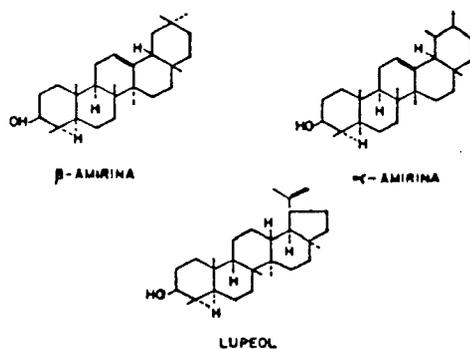
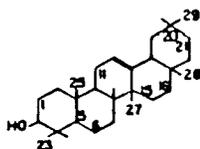


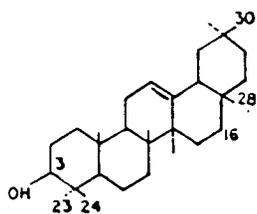
FIGURA 9.- Geninas que sirven como base para la clasificación de las saponinas triterpénicas: a) serie del oleanano ( $\beta$ -amirin); b) serie del ursano ( $\alpha$ -amirin) y c) serie del lupeol. Fuente: Basu y Rastogi 1967.



ACIDO ACACICO	16,21-OH; 28. COOH
ACIDO ARJUNOLICO	2-OH; 23-CH <sub>2</sub> OH; 28-COOH
R <sub>1</sub> -BARRIGENOL	15,16-OH; 27,28-CH <sub>2</sub> OH
BARRINGTOGENOL (*R <sub>2</sub> -barrigenol)	2-OH; 23,28-CH <sub>2</sub> OH
ACIDO BARRINGTOGENICO	2-OH; 23,28-COOH
BARRINGTOGENOL C	16,21,22-OH; 28-CH <sub>2</sub> OH
BARRINGTOGENOL D	22-OH; 16 $\rightarrow$ 21 OXO; 28-CH <sub>2</sub> OH
ACIDO BASSICO	2-OH; 23-CH <sub>2</sub> OH; 28-COOH; $\Delta^{21(22)}$
ACIDO CINCHOLICO	27,28-COOH
CICLAMIRETINA D	16-OH; 25-CHO; 28-CH <sub>2</sub> OH
ACIDO ECHINOCISTICO	16-OH; 28-COOH
ESCIGENINA	22-OH, 16 $\rightarrow$ 21 OXO; 23,28-CH <sub>2</sub> OH
ACIDO GLICIRRETICO	11-CO; 29-COOH
GIPSOGENINA	23-CHO; 28-COOH
HEDERAGENINA	23-CH <sub>2</sub> OH; 29-COOH
ACIDO MEDICAGENICO	2-OH; 23,28-COOH
<u>ACIDO OLEANOLICO</u>	28-COOH
PROTOESCIGENINA	16,21,22-OH; 23,29-CH <sub>2</sub> OH
ACIDO POLIGALACICO	2,16-OH; 23-CH <sub>2</sub> OH; 28-COOH
PHITOLACCAGENINA	2-OH; 23-CH <sub>2</sub> OH; 28-COOH; 29-COOCH <sub>3</sub>
SOYASAPOGENOL A	21,22-OH; 23-CH <sub>2</sub> OH
SOYASAPOGENOL B	21-OH; 23-CH <sub>2</sub> OH
SOYASAPOGENOL C	23-CH <sub>2</sub> OH; $\Delta^{21(22)}$
GENINA ESTIPHNODENDROM B	21 $\rightarrow$ 28 LACTONA
GENINA ESTIPHNODENDROM F	2-OH; 20 $\rightarrow$ 28 LACTONA

FIGURA 10.- Ejemplo de sapogeninas (o geninas) que han sido caracterizadas en la naturaleza.

Fuente: Basu y Rastogi 1967



NOMBRE	SUSTITUYENTE				
	16	23	24	28	30
$\beta$ -AMIRINA	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<u>ACIDO OLEANOLICO</u>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	COOH	CH <sub>3</sub>
ERITRODIOL	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>
GIPSOGENIN	H	CH <sub>3</sub>	CHO	COOH	CH <sub>3</sub>
ACIDO ECHINOCISTICO	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	COOH	CH <sub>3</sub>
<u>HEDERAGENINA</u>	H	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	COOH	CH <sub>3</sub>
ACIDO QUERETARICO	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	COOH	CH <sub>2</sub> OH

FIGURA 11 Sapogeninas que han sido caracterizadas en quínua:

Ac. Oleanólico y Hederagenina.

Fuente: Bournouf y Delfel 1984.

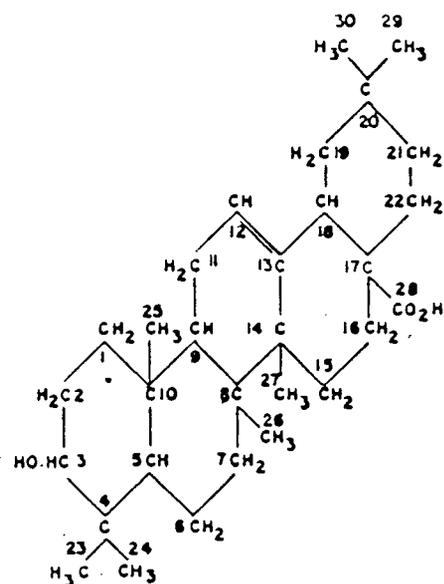


FIGURA 12 Acido oleanólico (fórmula desarrollada).

Fuente: Simonsen y Ross 1957

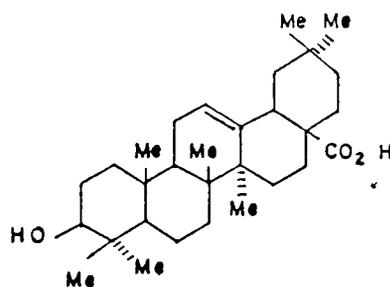


FIGURA 13 Acido Oleanólico (fórmula semidesarrollada).

Fuente: Fernandes 1967, citado por Augusto 1979.

CUADRO 4

Procedencia y estructura (geninas y azúcares) de saponinas encontradas en la naturaleza.

PLANTA	SAPONINA	GENINAS Y AZUCARES
Aesculus hippocastamun (castaña de caballo)	ESCINA, CRIST., m.p.224°	PROSAPOGENINA → Escigenina
	CRIPTOESCINA A y B ESCINA	(MEZCLA DE ESCINA, METIL ESTER DE ESCINA Y COLESTEROL)  PROTOESCIGENINA + ESCIGENINA + ESCINDINA (PRESENTE COMO SALES DE LOS ACIDOS ANGELICO o TIGLICO) +D-glc,+ D-Xil + D-glc.UA.
Aralia manchurica	ARALOSIDO A	ACIDO OLEANOLICO +glc.UA + D-glc. + L-ara.
Aralia elata	m.p.195° ARALOSIDO B m.p.230° ARALOSIDO C	ACIDO OLEANOLICO + glc.UA + glc.+ 2 ara.  ACIDO OLEANOLICO + glc.UA + glc. + Xil. + gal.
Centella asiatica Syn., Hydrocotillo asiatica (variedad madagaspar)	ASTATICOSIDO	ACIDO ASIATICO + 2glc. + ra
Cinchona Calisaya	GLICOSIDO A (quinovina)	ACIDO QUINOVICO + 6 deoxi - glucosa (quinovosa)
	GLICOSIDO B	ACIDO QUINOVICO + D-glc.
	GLICOSODO C	ACIDO CINCOLICO + 6 deoxi-glucosa
Glycyrrhiza glabra y otras especies	GLICIRRIZIN (ácido Glicirrizinico)	ACIDO GLICIRRICETICO + 2glc.UA
Gypsophila pacifica	GIPOSIDO	GIPSOGENIN + D-glc. + D-gal. + D-ara. + L-ara. + D-fuc. + D-glc.UA + 3D-Xil

Abreviaciones: glc.= glucosa, fru.= fructuosa, gal.= galactosa

ara.= arabinosa, fuc.= fucosa, xil.= xilosa, ra.= rannnosa,

glc.UA = ácido glucorónico, amorf.= amorfo, crist.= cristalino.

FUENTE: BASU Y RASTOGI, 1967

saponinas: Simonsen (1957). Insoluble en agua; soluble en 65 partes de eter, 106 partes de alcohol al 95%, 35 partes de alcohol de 95% en ebullición, 118 partes de cloroformo, 180 partes de acetona, 235 partes de metanol.

Por otro lado Kernan (1984), reporta que obtuvo el ácido oleanólico por una extracción en etanol al 80% (bajo reflujo por 3.5 hrs) de harina de kochia, aunque también podría obtenerse a partir de quinua molida y de raíces de alfalfa. Los solventes fueron removidos en rotavapor y el residuo tratado con una solución de etanol al 50% de ácido clorhídrico. Las saponinas crudas fueron hidrolizadas a reflujo por 5 horas. La mezcla de la reacción fué diluída con agua destilada, filtrada y el precipitado lavado con agua. El precipitado fué decolorado 2 veces con carbón activado por reflujo con etanol absoluto y el precipitado recuperado por tratamiento del filtrado con 10% de HCL y lavado con agua. El ácido oleanólico impuro puede ser purificado por varias recristalizaciones en metanol.

### **2.2.3.- Propiedades**

#### **2.2.3.1.- Físicas.**

Estos heterósidos se caracterizan por un conjunto de propiedades físicas. Así mismo, pueden ser sólidos, blancos o amarillentos, generalmente amorfos; su cristalización es muy difícil, pudiendo ser dispersos en agua y formar soluciones difícilmente dia-

lizables (Fernandes, 1967; citado por Augusto, 1979).

Las propiedades, tales como poder emulsificante, capacidad de formación de espuma en soluciones acuosas, permeabilidad de las membranas, son debidas a la alta tensión superficial de las soluciones acuosas. La solubilidad de estos compuestos aumenta en soluciones diluidas de alcoholes; tales como metílico, etílico, butílico (Fernandes, citado por Augusto, 1979).

#### **2.2.3.2.- Químicas.**

Las saponinas pueden ser precipitadas parcialmente en soluciones de Hidróxido de Bario, Hidróxido de Magnesio, Acetato Básico y Neutro de Plomo o ser saturadas como soluciones acuosas de sales como Cloruro de Sodio, Sulfato de Amonio y Sulfato de Magnesio (Fernandes, 1967, citado por Augusto, 1979).

Las características que han sido estudiadas desde el punto de vista químico y físico-químico, son las lipofílicas, las hidrofílicas tenso activas, la capacidad de migración en diferentes medios, la combinación con esteroides (Birk, 1969).

#### **2.2.3.3.- Biológicas.**

Las saponinas han sido involucradas en la patogénesis del hinchamiento de rumiantes por alteración de la tensión superficial y así contribuir a la "espuma de hinchamiento" por el entrampamiento de innumerables

Cuadro 5 Propiedades y usos de las saponinas en general.

Físicas	Químicas	Biológicas
<p>Afrosimétricas (formación de espuma en soluciones acuosas, sabor amargo, emulsificante, baja la tensión superficial, solubles en alcohol diluido. Sustancias sólidas blancas o amarillentas, generalmente amorfas, de difícil cristalización, forma soluciones difícilmente dializables.</p>	<p>Forma compuestos con colesterol e hidroxisteroides. Estabilizador de emulsiones. Agentes espumantes ó detergentes (ventaja frente a los detergentes comerciales). Protector de coloides en secado por atomización de saborizantes (igual comportamiento que la goma arábica). Utilizadas en bebidas por su efecto espumante. Precipitan parcialmente en soluciones de hidróxido de Bario, de Magnésio, acetato básico y neutro de plomo.</p>	<p>Hemólisis de los globulos rojos in vitro, toxicas para peces y anfibios. Antiinflamatorias, antibióticas, antineoplásicas, cardioestimulantes, anticonceptivas, antinutricionales, antihelmínticas in vitro, antilipénicas, baja los niveles de colesterol, tóxicas cuando se administran con drogas, detoxificantes (de estricnina en ratones), insecticidas, termiticidas, deprimen la proliferación de levaduras, inhiben enzimas proteolíticas. Previenen el efecto adverso de los corticoides. Contra la lepra, para el tratamiento de úlceras gástricas y dermatitis. Promueve la germinación de semillas a bajos niveles y los inhibe a altos. Contribuye con la "espuma de inchamiento" de los gases de fermentación en la patogénesis de rumiantes, fungistática, depresión en la producción de huevos y en la velocidad de crecimiento de pollos.</p>

burbujas de los gases de fermentación a través de alimentos ingeridos (MaCandlish, 1937; Olson, 1944 y Quin, 1943; citados por Birk 1969). Otros autores han mencionado que las saponinas tienen propiedades antiinflamatorias (Lallouette et al 1969; citado por Augusto, 1979), antibióticas (Schlosser, 1976; Wolters 1968; citados por Augusto, 1979), antineoplásicas (Pettit 1976; Powell 1976; citados por Augusto, 1979), cardioestimulantes (Sokolov, 1971; citados por Augusto, 1979), anticoncepcionales (Cheke 1976 y Cho, 1977; citados por Augusto, 1979). Ghosal et al (1981) también menciona que una saponina triterpénica aislada de *Justicia simplex*, la designada con el nombre ácido oleanólico-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-4-O-ferrulate puede ser un potente agente antifertilizante. La Literatura también menciona a las saponinas como sustancias antinutricionales (Cheeke, 1971; Wasiky, 1943; Wolf, 1969; Birk, 1963; citados por Augusto, 1979). Cabe reiterar lo que menciona Birk, (1963): "desde que la mayoría de las caracterizaciones de saponinas fueron hechas sobre extractos de saponinas en vez de que se haya hecho sobre sustancias puras, es posible que ciertas propiedades las cuales fueron atribuidas a las saponinas resulten de sustancias acompañantes".

Basú (1967), menciona que las saponinas, en general, bajan la tensión superficial y poseen propiedades emulsificantes, ello tiende a alterar la permea-

bilidad de la pared celular y por lo tanto ejerce una toxicidad general sobre todo los tejidos organizados. Su actividad hemolítica y antilipémica (Lipemia = presencia de grasa en la sangre) y su capacidad de bajar los niveles de colesterol en el suero pueden ser consideradas como una de sus características más importantes.

Basú(1967), menciona que aunque la mayoría de las saponinas son pobremente absorbidas en el tracto digestivo, está aparentemente establecido que la administración de al menos algunas de ellas simultáneamente con drogas incrementaría la absorción de las últimas en el intestino. Ciertas saponinas exhiben propiedades específicas, algunas han sido tratadas como insecticida y siendo no tóxicas para humanos y animales, éstas pueden ser usadas como polvos, emulsiones o en forma de solución. El efecto antihelmíntico in vitro de ciertas saponinas fueron buenos, pero éstos no podrían ser usados debido a su marcada irritación de la mucosa. La saponina de Kalopanax de remarcable acción termiticida es responsable de la resistencia a las termitas de la madera. Las saponinas de Altriplex promueven la germinación de las semillas a una concentración de 0.1% ; pero actúa como un inhibidor a los niveles de 1.5%. La saponina de Pittosporum deprimió la proliferación de levaduras.

La habilidad de la saponina para reducir la

tensión superficial a sido utilizada para hacer estabilizadores de emulsiones y los resultados han sido comparados con las sales de los ácidos grasos. Las saponinas de Ruscus aculeatus han sido presentadas como agentes espumantes o como detergentes. Sus poderes humectán y acción detergente ha sido comparada con detergentes comerciales y resultados favorables han sido obtenidos. Su uso como protector de coloides en secado por atomización de materiales saborizantes en polvo han sido investigados y se ha establecido que es igual a la goma arábica. Algunas saponinas han sido empleadas en bebidas para producir un efecto espumante.

Las saponinas han sido evaluadas clínicamente. Asiaticoside ha sido reportada con remarcado efecto curativo contra la lepra. GLYCYRRHIZIN (ácido glicirrízico) ha sido usada en el tratamiento de úlceras gástricas y dermatitis: Las saponinas reducen la hipercolesteremia y su acción mineralocorticoides glucocorticoides, así como su efecto antiinflamatorio, ha sido establecido sin lugar a duda. Presenta propiedades hipertensivas y efectos detoxificantes en ratones envenenados con Nitrato de estriquina.

Birk, 1963 (citado por Gestettner, 1963) menciona que las saponinas de soya pueden inhibir, in vitro, ciertas enzimas proteolíticas.

Kodata et al(1981) aisla saponinas y menciona que previenen el efecto adverso de los corticoides.

## 2.2.4 Métodos para la identificación y determinación cuantitativa de saponinas y de ácido aleanólico.

### 2.2.4.1 Consideraciones Generales.

Birk, (1969) menciona que los métodos para la detección, identificación y determinación cuantitativa están basados en sus propiedades características, normalmente su actividad hemolítica y habilidad para formar espuma estable en soluciones acuosas.

El hecho de que el aglicón de la molécula de saponina es uno u otro, triterpenoide o esteroidal, sirve de base para para las reacciones características de color con reactivos tales como Liebermann-Burchard (una mezcla de ácido sulfúrico y anhídrido acético) y  $SbCl_3$  o  $SbCl_5$ . Desde que estas reacciones son más bien de una baja especificidad, reacciones de color positivas pueden ser llevadas a cabo con otras sustancias que no son saponinas, especialmente cuando se tienen preparaciones crudas, es decir, con la presencia de coextractivos. Es por lo tanto esencial el uso de varios criterios para la identificación de una saponina. La determinación de la composición química de una saponina por el análisis de la molécula del carbohidrato y del aglicón, procedentes de los hidrolizados ácidos, es el método más seguro para la identificación y definición. Ello puede realizarse por análisis de la cromatografía de papel y gas, por reacciones de los grupos químicos específicos, y por espectros de absorción ultravioleta

(UV) e infrarojo (IR), también como por Resonancia Magnética Nuclear (NMR) características para las tri-terpenoides y esteroidales.

Según Gestetner et al (1966) en una fracción de saponinas de soya, la denominada fracción e, se ha encontrado una relación 3:1 (p/p) relación sapogenina/-azúcar, lo que equivaldría a una relación molar 1:1. Esto permitiría inferir el tenor de saponinas mediante un factor, el mismo que multiplicaría a las sapogeninas. Esto, empleando la determinación de sapogeninas en harina de soya como un método equivalente para la determinación de saponinas en general. El método e hidrólisis utilizado, fué reflujar una suspensión de harina de soya desgrasada en 1N de  $H_2SO_4$  en dioxano-agua(1:3) por 8 hrs, seguidas por la extracción de la sapogenina con eter, cromatografía sobre óxido de aluminio y la posterior determinación con el reactivo Lieberman-Burchard. Es de esperar que el método sugerido para la determinación de saponina de soya, sea también aplicable a la saponinas de otras fuentes.

#### 2.2.4.2.- Detección e Identificación.

Birk (1969), en su revisión de literatura menciona que el sabor amargo, formación de espuma estable en soluciones acuosas, la habilidad de hemolizar los glóbulos rojos y producir la muerte de anfibios y peces en soluciones muy diluidas son propiedades en las cua-

les se basan los métodos de identificación y detección de saponinas.

Como se ha discutido anteriormente, es más conveniente la identificación, detección y cuantificación por la evaluación de las saponinas en sí, que por sus propiedades, no sólo por el hecho de que la obtención de saponinas puras es difícil y las propiedades que se le podría atribuir a éstas podrían deberse a materiales acompañantes (coextractivos); sino que, estas propiedades se ven afectadas por factores de pH (en la formación de espuma), presencia de grupos polares como OH y COOH (que afectan la hemólisis) y que en términos generales no ha habido una buena correlación entre dos de los métodos más conocidos que aprovechan sus propiedades, como son el afrosimétrico y el hemolítico.

Respecto al sabor amargo, Abela, citada por Zavaleta et al(1982), realizó un estudio para determinar el mínimo detectable de saponinas en la quinua y en sus productos. Este mínimo detectable ha sido determinado para el caso de la quinua "real" en un rango de 0.06 a 0.12% en base seca, mediante las pruebas de análisis sensorial. Cabe indicar que Abela y Zavaleta, hacen este estudio en el marco de los proyectos Andinos de Desarrollo Tecnológico, en un esfuerzo conjunto para el desarrollo de una tecnología de desamargado de la quinua, y es muy probable que los tenores de saponinas entregados al panel de degustación hayan sido determi-

nados por un método volumétrico desarrollado por Zavallata, et al(1982) el cual presenta algunas limitaciones que se discutirán más adelante.

Birk (1969), menciona algunos métodos para la separación, no sólo de los coextractivos de las saponinas, sino de las saponinas entre sí; es decir, de sus congéneres. Los métodos de separación (de coextractivos y congéneres), generalmente son basados en la cromatografía en capa fina y los métodos de detección se realizan generalmente por reacciones químicas o, en menor medida, aprovechando sus propiedades físicas como su poder hemolítico. Así, Birk(1969) menciona que las separaciones cromatográficas sobre papel fueron hechas por Pasich en 1961, y las de capa fina, por Van Dweren en 1962, para la detección de saponinas en extractos crudos, lo que permitió una concentración parcial y separación de saponinas y remoción de sustancias acompañantes. Diferentes métodos de revelado han sido empleados para su identificación sobre los cromatogramas. Así, Coulson (1958) usó el reactivo Carr-Price (una solución saturada de tricloruro de antimonio en cloroformo), Van Atta y Guggolz (1958) el reactivo de Liebermann-Burchard. Pasich(1961), en un segundo documento científico, estableció que un 25% de solución etanólica de ácido fosfotúngstico fué más satisfactoria, mientras que Kazerovskis(1962) reportó que una suspensión de sangre-gelatina(gel) fue muy útil en la detección de

saponinas sobre cromatografía en papel.

Huayuan et al(1981), trabajando con un método colorimétrico, previa purificación y separación de las saponinas por cromatografía en capa fina, localizó las saponinas con vapores de Yodo, raspó las bandas correspondientes a las saponinas y las hizo reaccionar con una solución recientemente preparada al 5% de vainillin en ácido acético y 0.8 ml de ácido perclórico, siendo la mezcla calentada en un baño de agua a 60°C por quince minutos. Posteriormente enfriada, se adicionó 5 ml de ácido acético glacial, se mezcló bien la solución, se centrifugó y la solución sobrenadante fue leída colorimétricamente a 560 nm frente a un blanco.

#### **2.2.4.3.- Determinación Cuantitativa de Saponinas y de ácido oleanólico.**

La saponina de estructura química triterpenoide, semejante a las saponinas de quinua, han sido extraídas con metanol:Agua, eliminado el metanol y extraídas del medio acuoso con cloroformo:butanol(Gromova et al, 1981). Así mismo, la extracción de saponinas de medios acuosos ácidos, se ha realizado con una mezcla cloroformo:butanol(Honerlagen y Tretter, 1979). Estos tratamientos no permiten la eliminación completa de coextractivos y, desde el momento que los reactivos para la formación del color no son específicos, se hace necesaria una purificación suplementaria. Es así, que

haciendo uso de la cromatografía en capa fina se obtiene no sólo la eliminación de coextractivos, sino también la separación individual de saponinas (Pasich, 1963 y Huayuan et al, 1981).

El ácido oleanólico es la principal sapogenina de quinua (Augusto, 1979, Burnouf-Radosevitch y Delfel, 1984) y este hecho sumado al que a la fecha no se ha elucidado la estructura química de alguna saponina de quinua que podría servir como standard, conduce a la alternativa de cuantificar saponinas en forma indirecta mediante el uso de un factor, el cual transforme a saponinas, el ácido oleanólico, el mismo que ha sido cuantificado previamente.

Este factor de transformación se puede encontrar a partir de saponinas puras, las cuales se hidrolizan y se determina el tenor de ácido oleanólico, de tal modo que se tendría:

**Saponinas = (f) x (Acido Oleanólico);** "f" es el factor de transformación. Esta misma expresión se podría expresar en porcentaje; así, Augusto (1979) encontró la siguiente relación:

**% saponinas = 42.4405 x % Acido Oleanólico.**

Esta expresión fué determinada a partir de extractos crudos de saponinas; es decir, saponinas semipurificadas, en las cuales hay presencia de coextractivos y por lo tanto el factor podría ser sobrevaluado. Este intento de cuantificar saponinas mediante ácido oleanólico

será de mayor trascendencia en la medida en que el factor hallado sea a partir de saponinas puras.

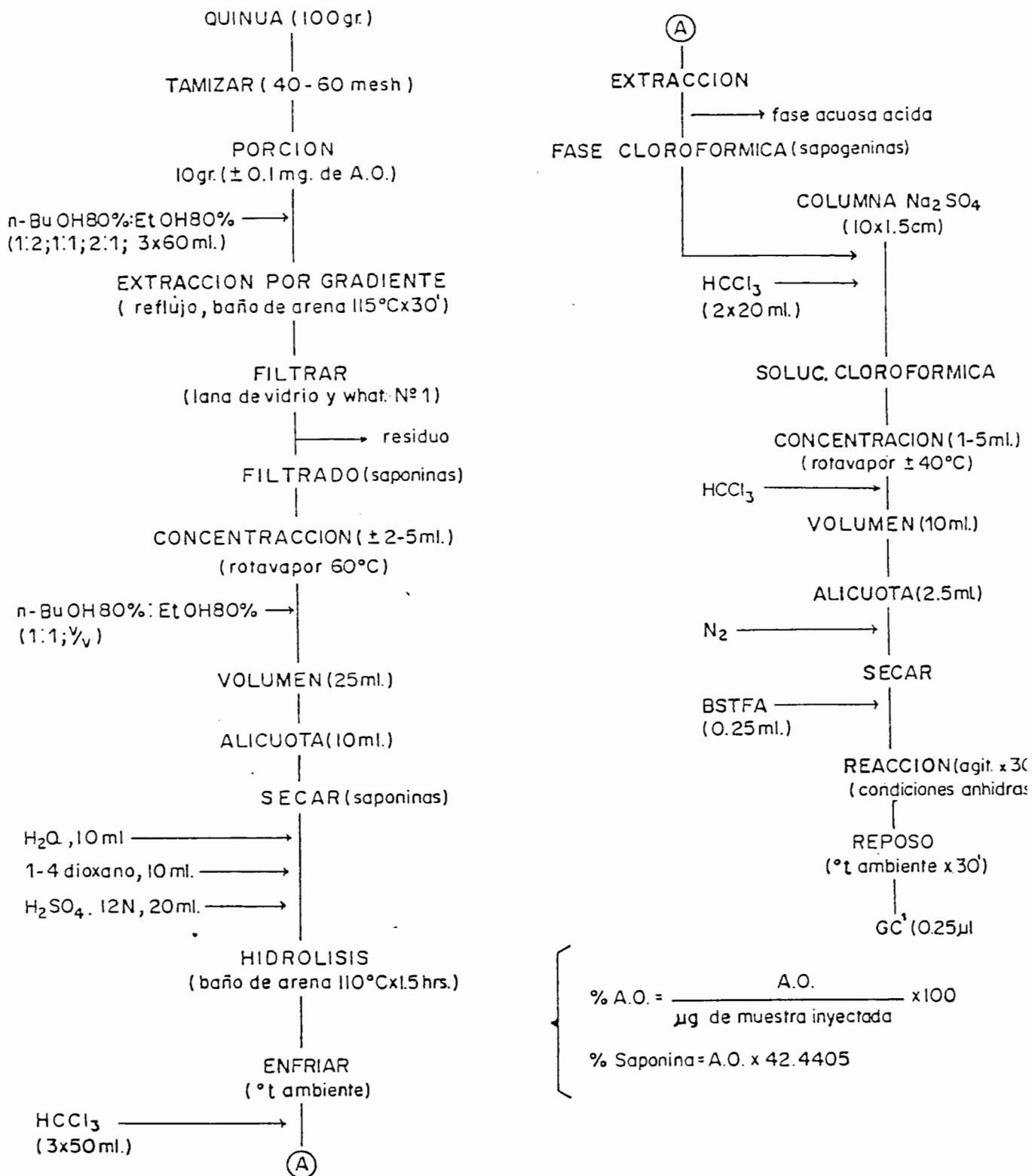
La identidad del ácido oleanólico, junto con la de otra sapogenina: La hederagenina, ha sido confirmada por espectrometría de masa (Meyer et al 1983; citado por Burnouf-Radosevitch y Delfel, 1984) estando presente no sólo en los granos, sino también en las raíces de la planta de quinua (Burnouf-Radosevitch, y Paupardin 1983).

Por otro lado, existe un método (Figura 14) para cuantificar ácido oleanólico por cromatografía de gas (previa formación de su trimetil silil TMS derivado) para posteriormente inferir el tenor de saponinas mediante un factor, el mismo que fué obtenido a partir de saponinas semipurificadas (Augusto 1979). La dificultad radica en obtener una mezcla de saponinas de elevada pureza, las mismas que nos permitan inferir el tenor real de saponinas.

Otro análisis cuantitativo por cromatografía de gas (GC) ha sido llevado a cabo, mediante la volatilización de ácido oleanólico por formación de su metil ester derivado con diazometano (Kernan et al 1973). También, sapogeninas de quinua (ácido oleanólico y hederagenina) han sido analizadas por cromatografía líquida de elevada performance (HPLC), sin necesidad de derivatización (Burnouf-Radosevitch y Delfel 1984).

Adicionalmente a los métodos mencionados, existe

FIGURA 14: FLUJO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO OLEANOLICO (A.O) POR CROMATOGRAFIA DE GAS (GC).



<sup>1</sup> CONDICIONES GC: 3% SE 30 6' x  $\frac{1}{8}$ " sobre Chrom W AW DMCS. Columna: 285°C. FID.: 320°C H<sub>2</sub>: 25 ml./min Aire  $\pm$  250 ml./min. N<sub>2</sub>: 65 ml./min. atenuación: x80x10 A.O. patrón:  $\pm 30 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

un método volumétrico de requerimientos sencillos en cuanto a reactivos y equipos, que titula con hidróxido de sodio los extractos liposolubles de sapogeninas disueltas en alcohol de 96%(Zavaleta et al, 1982). La dificultad de este método radica en que es poco notorio el viraje del indicador de fenolftaleina, no sólo por el hecho de que tanto la soda como la fenolftaleina, siendo hidrosolubles no tienen difusibilidad inmediata estando en un medio liposoluble; sino por el hecho de que el viraje, adicionalmente, es encubierto por los pigmentos presentes.

A esto se agrega que la soda no sólo valoraría el ácido oleanólico; sino también, otras sapogeninas de carácter ácido, como la hederagenina, así como posibles coextractivos que también presenten carácter ácido.

En términos comparativos, entre el método volumétrico y el gas cromatográfico, este último presenta ventaja, no sólo por los inconvenientes que se mencionó para el primer método; sino, por que el método gas cromatográfico permite la separación individual de sapogeninas para la cualificación del ácido oleanólico y su posterior cuantificación, por lo que fué elegido para la evaluación de la exactitud del presente método espectrofométrico.

Por otro lado, Honerlagen y Tretter H.(1979) reportan un método espectrofotométrico para la determinación cuantitativa rutinaria del total de saponinas en

Raíces de Ginseng Panax y extractos, en este método, no se analiza ácido oleanólico por lo que no se procede a hidrolizar las saponinas (Figura 15).

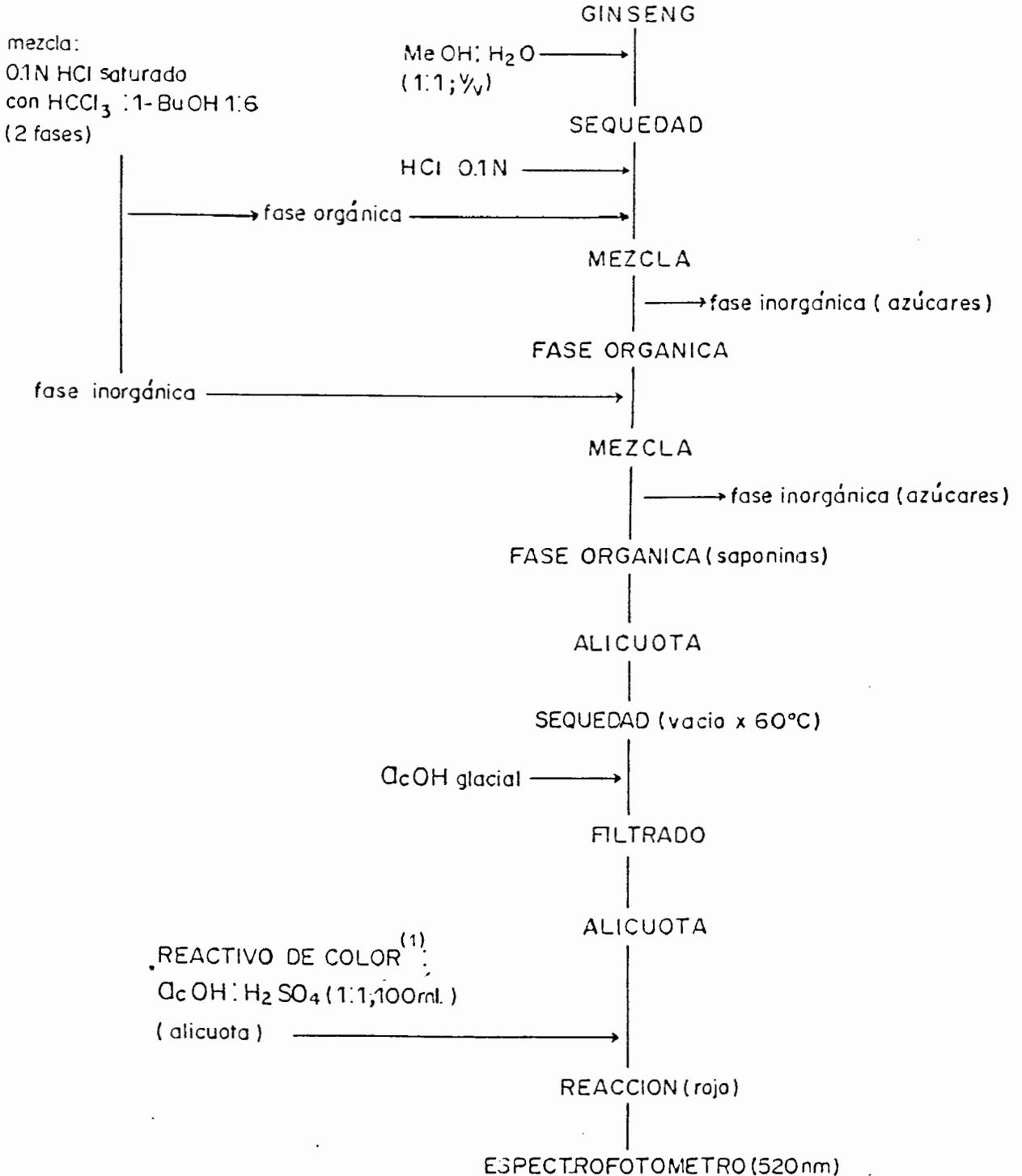
Respecto a la hidrólisis, en análisis cuantitativos de saponinas triterpénicas, el medio usado ha sido dioxano: agua (Kernan et al, 1973 y Cundif 1964); es el que según algunos autores (Larry et al 1970 y Cundif 1964) proporciona las mejores condiciones. Este mismo medio ha sido usado por Augusto (1979) en el caso de la hidrólisis de saponinas de quinua, las cuales fueron tratadas con 12N de ácido sulfúrico en un sistema dioxano:agua(1:1) por 1.5 hrs, para extraer las saponinas posteriormente con cloroformo.

#### 2.2.4.3.1.- Sililación.

Este término se mencionó anteriormente en el método descrito por Augusto (1979) para la cuantificación de ácido oleanólico.

La Applied Science Laboratories Inc. (1977), dice al respecto: La Trimetilsililación es el proceso donde un átomo de hidrógeno activo en una molécula, es reemplazado por un grupo Trimetilsilil  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$  ("TMS"). Todos los compuestos conteniendo grupos hidroxilos (-OH), amino (-NH<sub>2</sub>, -NHR), y sulfidrilos (-SH) pueden, en teoría, ser Trimetilsililados. Los derivados resultantes son generalmente más volátiles que sus compuestos originales y poseen mayor estabilidad térmica. Es-

FIGURA 15.- FLUJO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA RUTINARIA DEL TOTAL DE SAPONINAS EN RAICES DE GINSENG.



NOMENCLATURA :

Me OH = metanol  
nBuOH = n-Butanol  
 $\text{CHCl}_3$  = cloroformo  
AcOH = Acético

(1) REACTIVO DE COLOR : se mezcla bajo agitación y enfriamiento con corriente de agua fría y se deja reposar dos hrs. El AcOH es glacial y el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, ambos reactivos con una pureza  $\geq$  a 96%

tas propiedades han permitido el amplio empleo de trimetilsilil derivados en la cromatografía de gas.

El reactivo más ampliamente usado para la Trimetilsililación de grupos hidroxilos son combinaciones de hexametildisililano ("HMDS") y clorotrimetilsilano ("CTMS"), en solventes tales como piridina, N-N-dimetilformamida y dimetilsulfóxido.

El N, O-Bis(Trimetilsilil) acetamida ("BSA") es un reactivo trimetilsililante potente para ambos grupos: hidroxil y amino. Es también un excelente solvente para compuestos polares. Un compuesto relacionado, N-(trimetilsilil) acetamida ("TMSA") es útil para la trimetilsililación de compuestos hidroxilos, particularmente carbohidratos.

El N, O-Bis(Trimetilsilil)Trifluoro acetamida ("BSTFA"), el fluorinado análogo al BSA es también un reactivo trimetilsililante potente y puede ser empleado en las mismas aplicaciones en que el BSA. Una valorable propiedad del reactivo es su mayor volatilidad comparada con el BSA. Sus productos, N-(Trimetilsilil) trifluoro-acetamida y trifluoro acetamida son también más volátiles que los productos correspondientes al BSA.

El N-(Trimetilsilil) dimetilamina ("TMSDMA") es un reactivo superior para la trimetilsililación de aminas y aminoácidos. En presencia de catálisis de CTMS, puede también ser usado para la trimetilsililación de grupos hidroxilos.

El N-(Trimetilsilil)imidazol se presenta como el mejor reactivo para la trimetilsililación de compuestos hidroxilados en la presencia de agua. Carbohidratos, por ejemplo, pueden ser trimetilsililados en jarabes y aún en soluciones acuosas conteniendo 50% o más de agua.

Según el manual de los laboratorios Pierce(1983): El agua descompone a ambos, a los reactivos TMS y a los derivados, así que excesiva humedad debería ser evitada. La hidrólisis de los reactivos TMS o productos derivados produce hexametildisiloxano  $[(CH_3)_3SiOSi(CH_3)_3]$  el cual es inerte y no interfiere en la actividad del reactivo en pequeñas cantidades.

La reacción puede ser muy rápida pero algunas requieren tiempos largos, estas últimas deberían chequearse hasta que no haya incremento en el pico del producto sililado.

Aunque los TMS derivados son estables térmicamente, la sensibilidad a la humedad varía considerablemente. Por ejemplo, TMS azúcares son completamente estables al agua a temperatura ambiente; pero TMS aminoácidos se hidrolizan más rápidamente. En general la estabilidad hidrolítica es como sigue: TMS-eter > TMS-ester > TMS-aminas.

Muchos TMS reactivos son inflamables. Deben observarse con cuidado. Se debe evitar el contacto con la piel, particularmente los ojos, y evitar la inhalación

de los vapores. Las propiedades tóxicas no han sido completamente investigadas.

Klebe et al 1966 (citado por Augusto, 1979) menciona que la trimetilsilil derivatización del ácido oleanólico puede ser como se muestra en la Figura 16.

Stalling et al 1968 (citado por Augusto 1979) dice que entre los reactivos sililantes que tienen buenos resultados está el BSTFA, por la volatilidad de sus productos de reacción y el menor depósito de  $\text{SiO}_2$  en el detector de ionización de llama FID, y que tiende a minimizar el error causado por la pérdida de sensibilidad del detector.

El BSTFA, como todo reactivo sililante, debe ser utilizado en condiciones anhidras por que es sensible al agua, pudiendo ser degradado como se muestra en la Figura 17.

#### **2.2.5. Espectrofotometría de saponinas, sapogeninas y ácido oleanólico**

Genkina et al (1977) hace un estudio espectrofotométrico de glicósidos de ácido oleanólico y hederagenina en ácido sulfúrico concentrado. Menciona que el desarrollo de métodos analíticos es de considerable interés debido a que algunos glicósidos triterpénicos son de uso medicinal y que los glicósidos de ácido oleanólico y hederagenina son los más extensamente distribuidos (más de la mitad de los compuestos descubiertos) y que la estructura de cerca de 200 compuestos ha

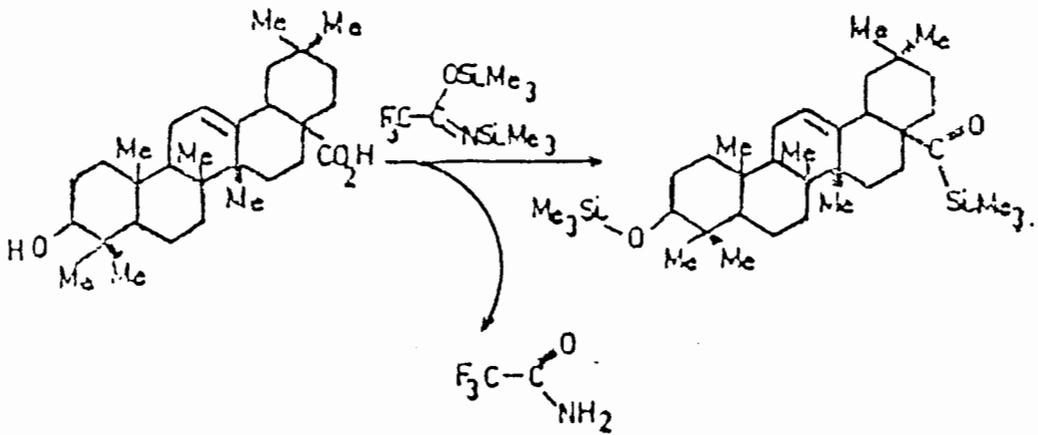


FIGURA 16.- Trimetilsilil derivación del ácido oleanólico  
Fuente : Klebe et al 1966, citado por Augusto 1979.

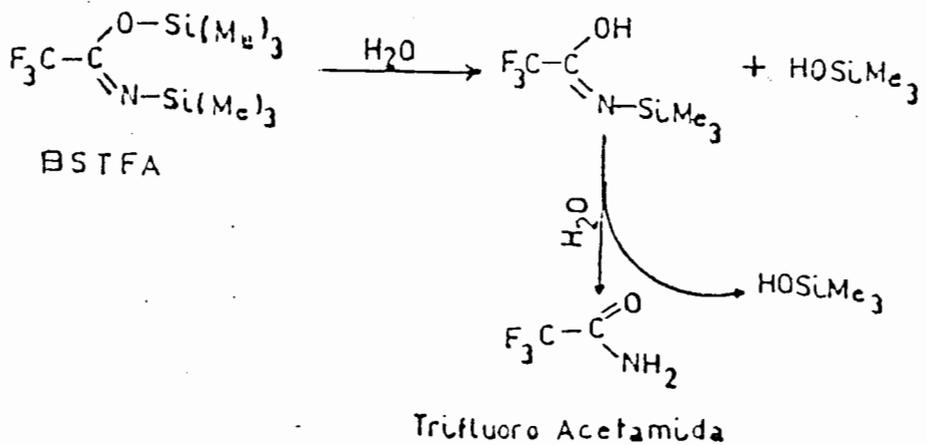


FIGURA 17.- Degradación del BSTFA mediante el agua  
Fuente : STALLING et al 1968, citado por Augusto 1979

sido elucidada.

Triterpenoides con un aislado doble enlace tienen una absorción máxima en la región ultravioleta del espectro en el rango entre 193 y 205 nm (Ollington, Meakins, 1960; citado por Genkina et al, 1977). Desafortunadamente, esta región del espectro es inconveniente para la determinación cuantitativa de triterpenoides y sus glicósidos. La reacción halocrómica en ácido sulfúrico concentrado ha sido usada para la identificación y cuantificación de esteroides y triterpenoides. Con ácido sulfúrico concentrado, los últimos presentan picos de absorción característicos en la región UV del espectro electrónico, el cual puede ser usado para la determinación analítica. Ha sido establecido que para obtener resultados reproducibles, las principales condiciones de reacción (concentración de ácido sulfúrico, tiempo de reacción y temperatura), deben ser estrictamente controladas.

Semenchenko et al(1977) y Karting et al(1972) citados por Genkina et al(1977) concluyeron que las condiciones óptimas para esta reacción son calentar la mezcla reaccionante a 70°C x 60'.

La reacción en ácido sulfúrico concentrado depende de la estructura del compuesto ha ser determinado. Es imposible postular que el máximo a 310 nm es característico sólo de los triterpenoides y no para esteroides.

La velocidad de formación de los productos de reacción, su estabilidad y, en adición a esto, la posición o intensidad de los picos de absorción depende sobre todo de la concentración de ácido sulfúrico. Con un incremento en la concentración, el pico extremo cambia a longitudes de ondas mayores, la reacción toma lugar más rápidamente, y se incrementa la estabilidad de los productos formados. Genkina et al(1977) usó una concentración de 94 % de ácido sulfúrico.

En los trabajos de Genkina et al (1977) trabajando en ácido sulfúrico concentrado, se demostró que los triterpenoides presentan una absorción específica en la forma de dos bandas intensas, a 300-320nm y 400-405nm. El espectro de ácido oleanólico contiene dos máximos, en la región de 300-306nm y 375-380nm.

El espectro de los monosacáridos individuales, los cuales están formando parte de los glicósidos triterpénicos, tomados bajo las mismas condiciones, muestran que su absorción máxima es generalmente superpuesta sobre la primera banda de las sapogeninas en la región de los 300-306nm.

En la Figura 18 se muestra el espectro de absorción del ácido oleanólico cuando es tratado en ácido sulfúrico concentrado.

Por otro lado, un método cuantitativo para la determinación de sapogeninas de soya es descrito por Gestetner et al(1966), el cual está basado en el uso del

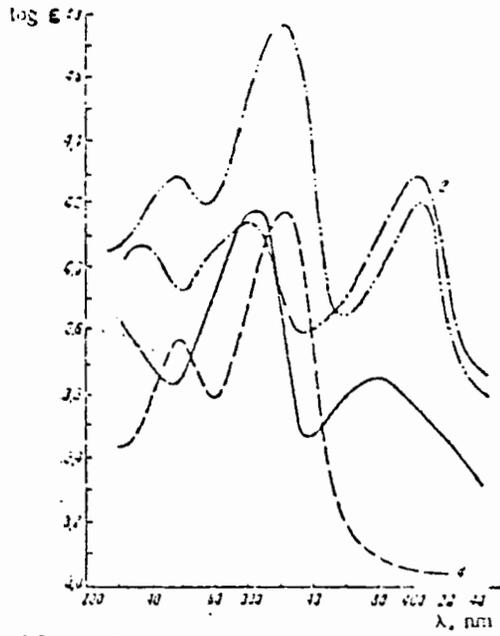


FIGURA 18.- ESPECTROS DE ABSORCION EN ACIDO. SULFURICO CONCENTRADO DEL ACIDO OLEANOLICO (1), HEDERAGENINA (2), GLICOSIDO DE HERERAGENINA (3) Y UNA MEZCLA MODELO DE LOS AZUCARES DEL GLICOSIDO ANTERIOR (4). TOMADOS EN SU RELACION MOLAR.

reactivo de Liebermann-Burchard modificado. El uso de este reactivo tiene ciertas limitaciones desde que no es específico para sapogeninas, ya que puede reaccionar con esteroides acompañantes y sustancias relacionadas y también la presencia de ácido sulfúrico en elevadas concentraciones en la mezcla reaccionante puede conducir a reacciones de color interferentes con otras sustancias orgánicas. Estas dificultades han sido vencidas por introducción de un paso de cromatografía en columna para la purificación de sapogeninas de soya. Este paso, el cual no resulta en ninguna pérdida de sapogeninas, ha sido establecido que es esencial, no sólo para determinar el contenido de sapogeninas en hidrolizados ácidos de harina de soya, sino, también para los extractos relativamente puros de saponinas de soya.

Gestetner et al(1966) también determinó una relación de 1:1 para la sapogenina/azúcar, lo cual fué establecida como típica para varios extractos de saponina de soya de diferentes variedades y puede ser usado como un factor de conversión del contenido de sapogeninas a saponinas.

Gestetner et al(1963) menciona que el reactivo original de Lieberman-Burchard consiste en una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y anhídrido acético, el cual da un color inestable e irreproducible con extractos de saponinas de soya. Blandon (citado por Gestetner

et al, 1963) recomienda ácido acético glacial para la dilución de la mezcla reaccionante en vez del anhídrido. El reactivo así modificado es usado por Gestetner et al (1966) previo paso de purificación por cromatografía en columna de las saponinas; así como por Honerlagen y Tretter (1979) en extractos crudos de saponinas.

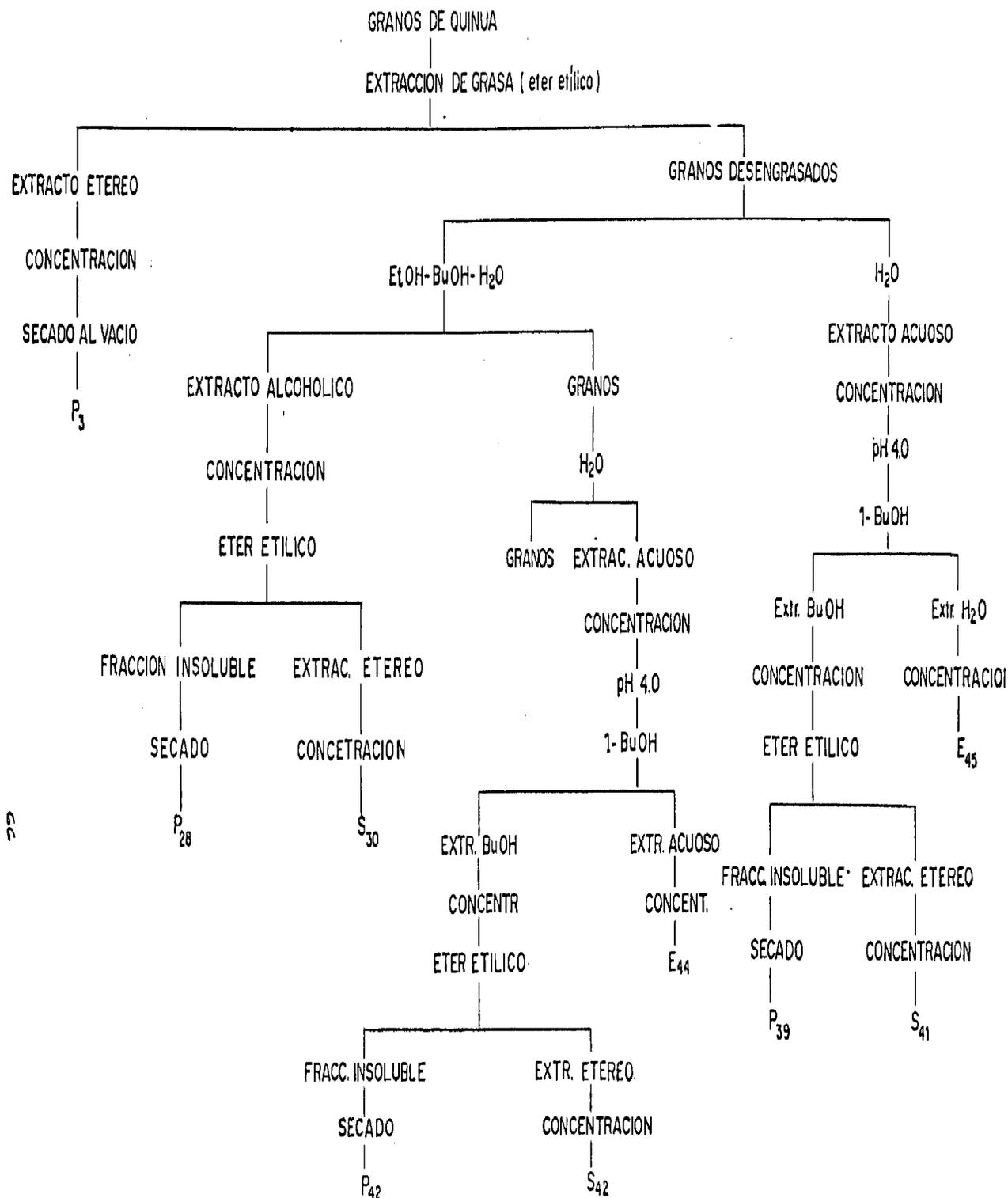
Como se ha expuesto anteriormente, por la falta de especificidad del reactivo de Leiberman-Burchard, que no solamente puede reaccionar con saponinas sino también con materiales acompañantes, es recomendable realizar una previa purificación, ya sea por cromatografía en columna como lo hace Gestetner et al(1966) para la purificación de saponinas, o en cromatografía en papel para la purificación de extractos crudos de saponinas(Pasich, 1963). Huayuan et al(1981), también trabaja en extractos crudos de saponinas y las purifica por cromatografía en capa fina.

#### **2.2.6.- Aislamiento de Saponinas.**

Anteriormente se ha discutido la conveniencia de obtener saponinas puras para efectos cuantitativos, las mismas que podrían servir como standard. En la actualidad no se ha elucidado la estructura de ninguna saponina de quinua; pero si se sabe que la principal saponina es el ácido oleanólico.

Por otro lado, se ha discutido la posibilidad de

FIGURA 19... FLUJO PARA LA PURIFICACION PRELIMINAR DE SAPONINAS DE QUINUA



(P<sub>28</sub> + P<sub>42</sub>) = saponinas purificadas totales.

FUENTE : AUGUSTO (1979)

cuantificar indirectamente saponinas, mediante la cuantificación directa de ácido oleanólico, el cual mediante un factor de transformación, se expresaría en saponinas. Para hallar este factor, se tendría que partir de una saponina pura o una mezcla de saponinas .

Augusto(1979), realizó una purificación preliminar de saponinas, tratando los granos de quinua como se muestra en la Figura 19, donde las saponinas totales están dadas por la suma de  $P_{229} + P_{442}$ . El ácido oleanólico es cuantificado por cromatografía de gas, partiendo de un peso conocido de estas saponinas totales, hallando la siguiente relación:

$$\% \text{ Saponinas} = (42.4405) \times (\% \text{ Acido Oleanólico}).$$

Cabe indicar que mientras menos puro sea el extracto de saponinas, más grueso será el factor, alejándose así del tenor real de saponinas. Así mismo, encontró que el ácido oleanólico corresponde al 79.5% de las sapogeninas de quinua Kancolla:

$$\% \text{ Sapogeninas Totales} = (1.2579) \times (\text{Acido Oleanólico}).$$

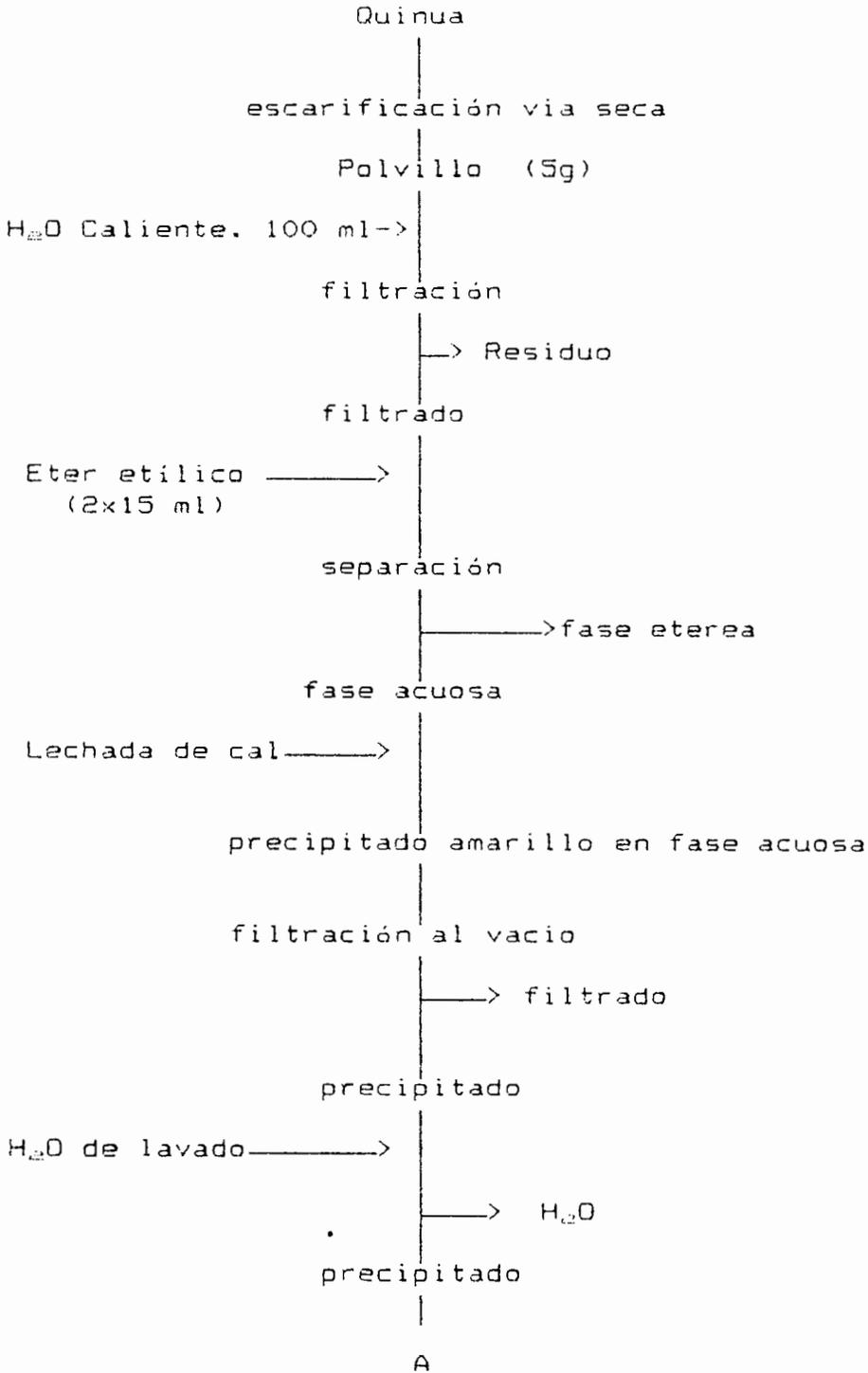
Dividiendo ambas relaciones tenemos :

$$\text{Saponinas /sapogeninas} = 33.7392.$$

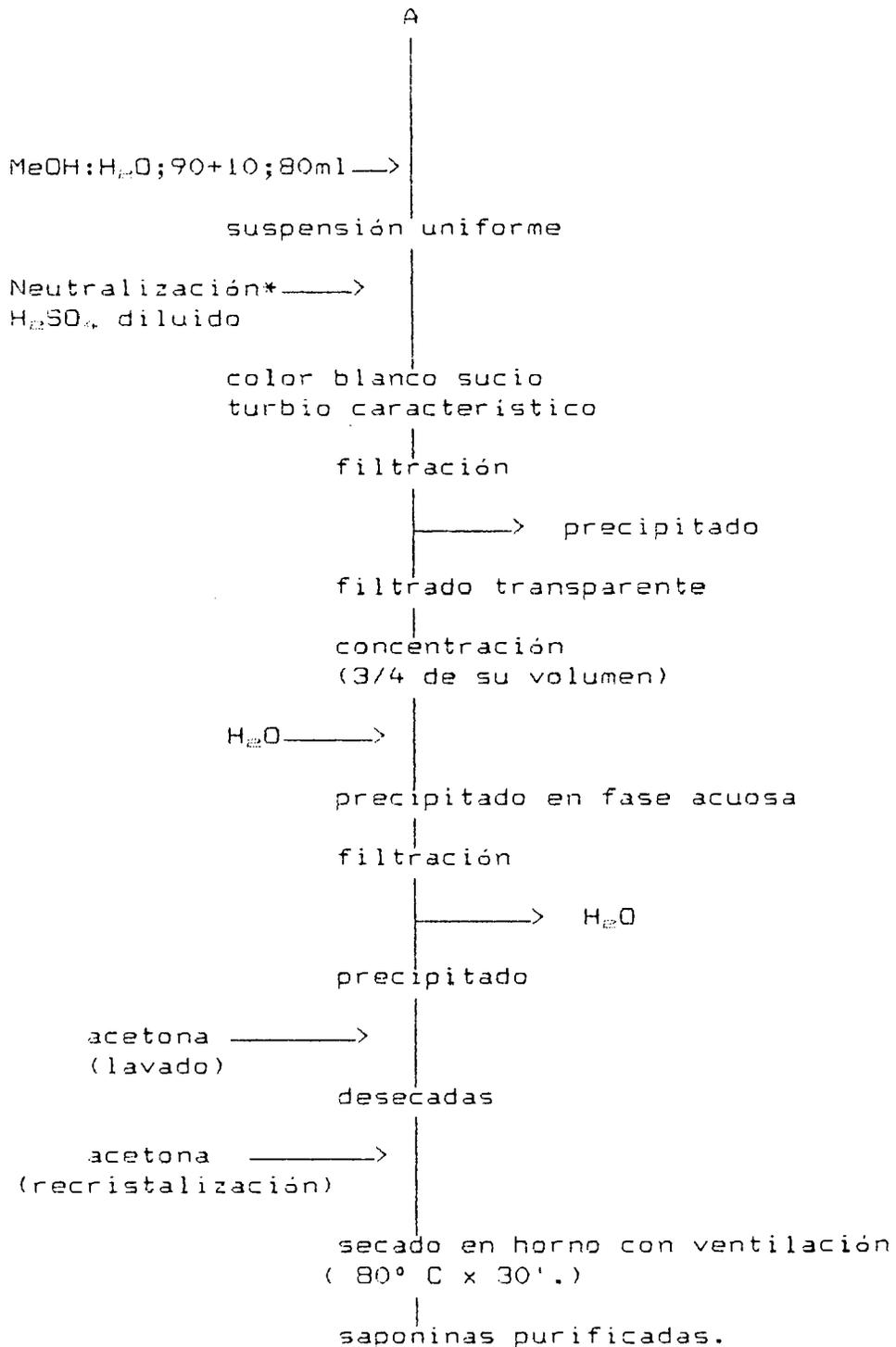
El factor 33.7392 es muy elevado frente al que encontró Zavaleta et al(1982) en quinua siguiendo el método de Birk et al(1969) para la soya, el cual es 1.96 (p/p). Esto está en mayor concordancia con lo que establece Gestetner et al(1965) para saponinas de soya: **saponinas/sapogeninas = 2**. Cabe indicar que ninguna de

las sapogeninas de soya (Soyasapogenol A,B ó C) tienen carácter ácido, por lo cual es de esperarse que las saponinas aisladas por Zavaleta et al (1982) tampoco posean carácter ácido. En los Diagramas 20 y 21 se muestran, los flujos seguidos por Zavaleta et al (1982) para las saponinas y sapogeninas.

Figura 20 Método para la extracción y purificación de saponinas de quinua Real.

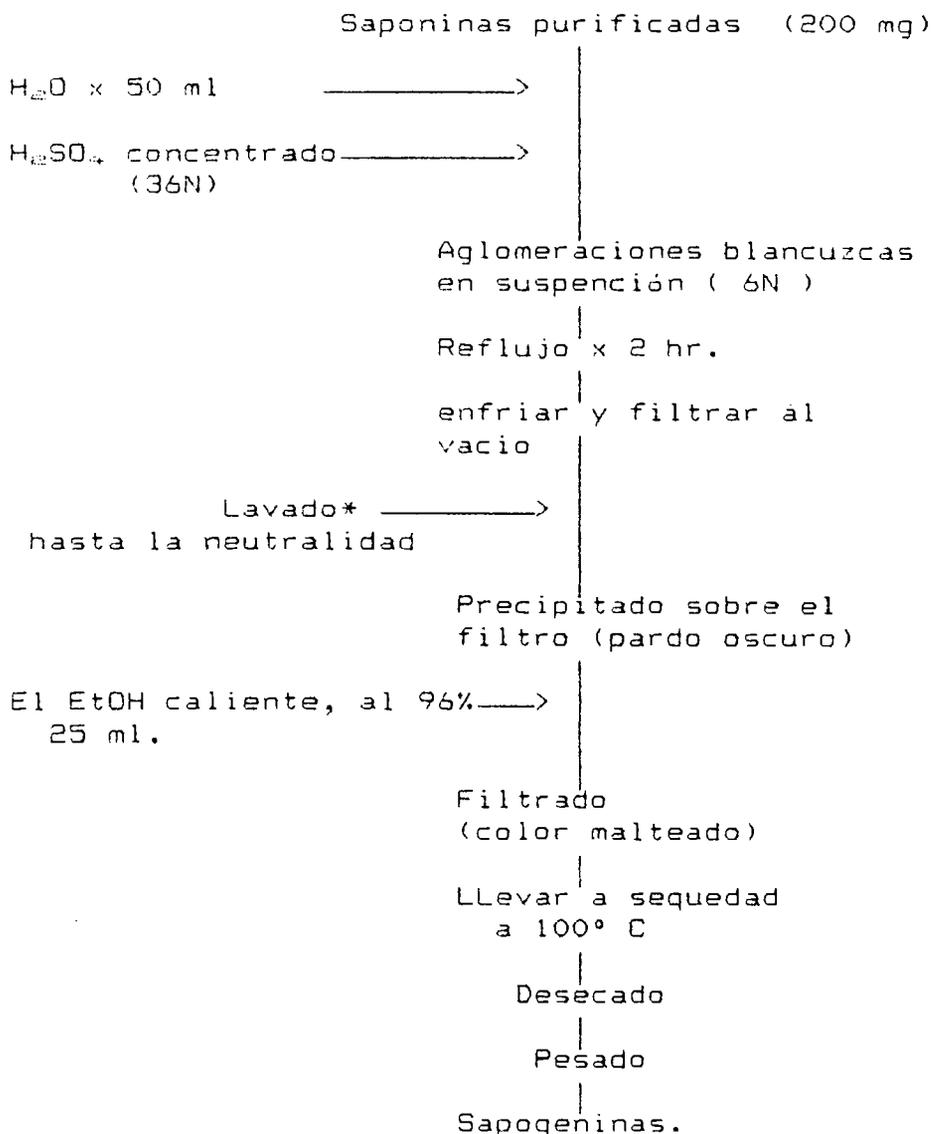


Fuente: Zavaleta et al (1982)



\* La neutralización se alcanza cuando desaparece completamente el color amarillo característico cálcico de las saponinas.

Figura 21. Método para la obtención de sapogeninas de Quinoa Real a partir de saponinas purificadas, para (hallar la relación la relación saponina/sapogenina).



FUENTE:ZVALETA et al 1982.

\* Se comprueba con papel tornasol y titulando 10 ml de filtrado en un tubo de ensayo, con solución 0.5 N de NaOH con fenolftaleína, aceptándose como neutra la solución que vira con una gota de NaOH.

En general, las saponinas pueden ser aisladas por métodos diferentes, de los cuales hace una recopilación Basu y Rastogi (1967). Así, el uso de electroforesis en papel para la purificación de saponinas usando buffers, boratos acuosos y de geninas usando butanol: ácido acético: agua (1:1:1.25) han sido reportados; pero los resultados más fructíferos han sido obtenidos por el empleo de intercambiadores iónicos. Así, Aralósido A es adsorbido sobre Dowex 1 eluido con 10% de ácido acético seguido por alcohol al 90%. En el caso de saponinas ácidas se ha sacado ventaja por la precipitación de saponinas crudas como sodio o sales de amonio o esterificación del grupo carboxílico con diazometano, previa a la cromatografía de partición. Aunque algunos reportes sobre la cromatografía de saponina en alúmina-ácida lavada son aprovechables, generalmente la purificación es mejor ejecutada por cromatografía en partición sobre celulosa o silica gel. Procesos que han sido también patentados por la extracción a gran escala de saponina de Betavulgaris y licorice (Glycyrrhia glabra).

Kadota et al (1981), patentó el uso de una resina adsorbente de poliestireno macromolecular (por ejemplo Amberlite XA D-2) para aislar saponinas (saiko-saponins) de un extracto acuoso o alcalino de B. falcaturn o B. longeradiatum. Así, 2 kg. de rizomas de B. falcaturn fueron desgrasados y extraídos con 99% de MeOH. El extracto disuelto en 300 ml de agua, pasado a través de

una columna de Amberlita XAD-2, y la columna eluida con MeOH para dar 20 Grs. de saponinas sólidas.

### III.- MATERIALES Y METODOS

#### 3.1.- **Materia Prima.**

Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.; variedad kancolla) procedente de Puno.

#### 3.2.- **Equipos, Materiales y reactivos**

##### 3.2.1.- **Equipos y Materiales**

.Espectrofotómetro UV-visible. Marca VARIAN DMS-90, con cambio automático de lámpara UV a visible a los 350 nm. Rango de 190 a 750 nm.

.cromatógrafo de gas PERKIN ELMER serie 3920 con detector de ionización de llama (FID).

.aplicador automático de muestras para cromatografía en capa fina (TLC) marca CAMAG, modelo LINOMAT III.

.equipo para revestimiento de placas en TLC: tablero guía, placas de vidrio, alimentador de adsorbente.

.Balanza Analítica marca Mettler, sensibilidad  $\pm 0.1$  mgrs.

.Estufa marca MEMMERT.

.Evaporador rotatorio marca BÜCHI.

.Bomba de vacío marca SARGENT.

.Tamizador marca RETSCH.

.Materiales de vidrio.

##### 3.2.2.- **Reactivos.**

.Metanol (MeOH)

- .n-Butanol (n-BuOH)
- .Cloroformo ( $\text{HCCl}_3$ )
- .Etanol (EtOH)
- .1-4 Dioxano
- .Sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- .Piridina
- .N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoro acetamida (BSTFA).
- .Acido Acético Glacial (AcOH glacial)
- .Acido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).
- .Acido Clorhídrico (HCl).
- .Eter de petróleo (ETEPE).
- .Acetona.
- .Benceno.
- .Yodo.
- .Hidroxilamina hidrocioruro.
- .N-(trimetilsilil)imidazol (TMSI).
- .Nitrógeno ( $\text{N}_2$ )
- .Aire.
- .Hidrógeno ( $\text{H}_2$ ).
- .Standard de saponina Merck.
- .Standard de ácido oleanólico (A.O).

### 3.3.- METODOLOGIA SEGUIDA

Para llegar a la obtención del método espectrofotométrico para determinación de ácido oleanólico, se tomaron como base los trabajos de Honerlagen y Tretter

(1979) y Agosto (1979).

El método definitivo propuesto fue el resultado de un procedimiento de aproximaciones sucesivas, en el cual las conclusiones de una etapa previa sirven de base para las acciones posteriores.

#### IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

##### 4.1.- APLICACION EN QUINUA DEL METODO DE HONERLAGEN Y TRETTER (1979).

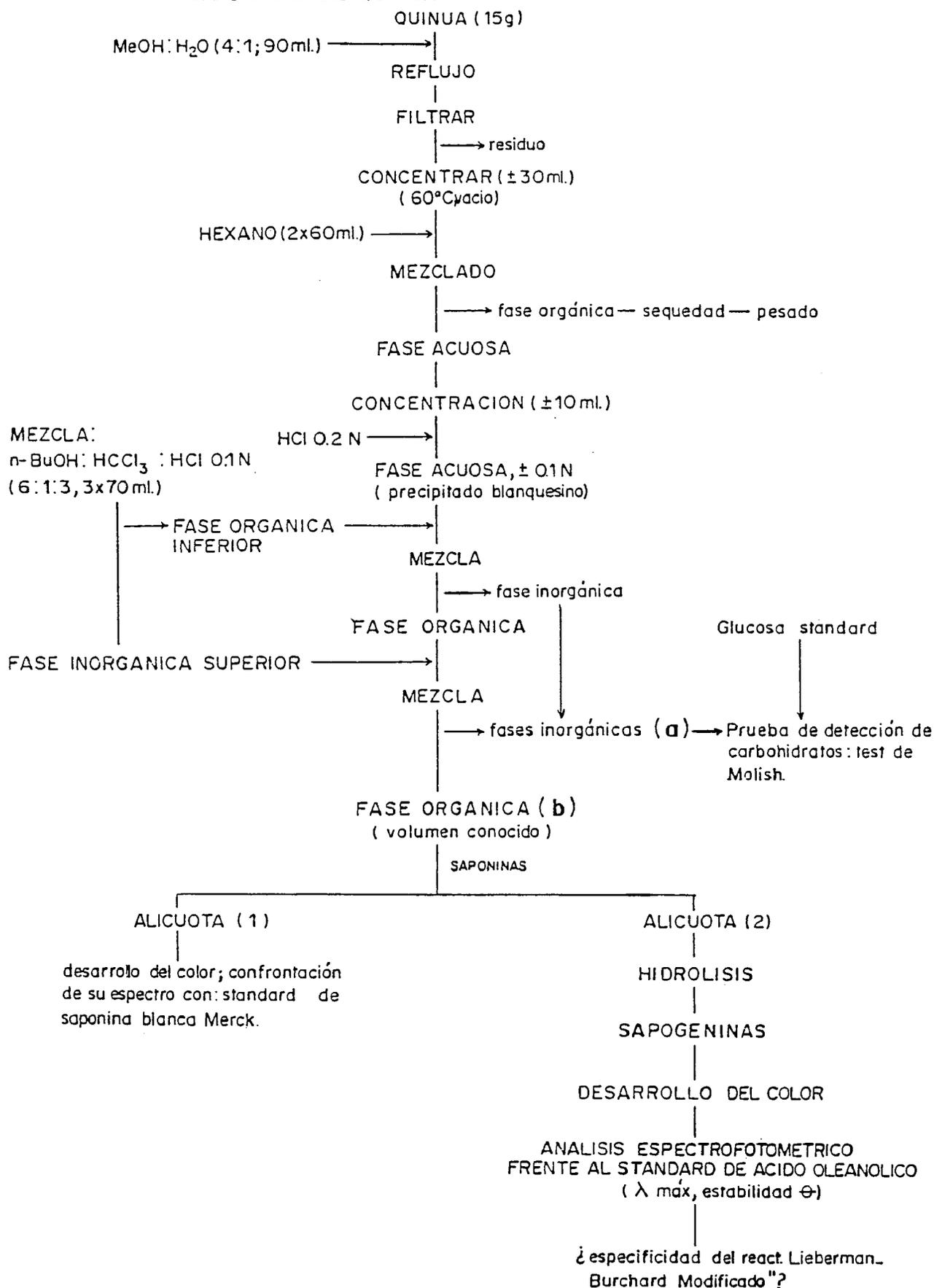
El método de Honerlagen y Tretter(1979) permite cuantificar espectrofotométricamente el contenido de saponinas triterpénicas en raíces de Ginseng.

A fin de ensayar este método en la extracción de saponinas de quinua se procedió, en primer lugar, a utilizar la proporción de 4:1 en los solventes de la mezcla extractante(MeOH:H<sub>2</sub>O), siguiendo lo reportado por Gromova et al(1981).

El extracto crudo de saponinas así obtenido fue hidrolizado según el método de Augusto(1979) y los espectros de absorción tanto de las saponinas como de las sapogeninas fueron hallados. El ácido oleanólico de las sapogeninas así obtenidas fue analizado al espectrofotómetro para lo cual fue necesario hacer un estudio del standard de ácido oleanólico(lambda máximo, estabilidad de la reacción de color, curva de calibración).

La Fig. 22 esquematiza el procedimiento seguido, incluyendo las modificaciones hechas al flujo de Honerlagen y Tretter(1979). Se nota que después de un procedimiento único para la obtención de un extracto de saponinas, este extracto es dividido en dos alícuotas, la primera para la obtención de un espectro de absorción de saponinas y la segunda para obtener sapogeninas

FIGURA 22.- APLICACION CON LIGERAS MODIFICACIONES DEL FLUJO DE HONERLAGEN Y TRETTER (1979), A LA EXTRACCION DE SAPONINAS DE QUINUA



y su posterior estudio espectrofotométrico.

#### **.Obtención de un Extracto de Saponinas**

Muestras de quinua Kancolla(15gr) fueron extraídas a reflujo por una hora, tres veces, con mezcla de metanol-agua(4:1; 90 ml), obteniéndose un extracto que después de filtrado se concentró en el rotavapor con presión reducida a  $60 \pm 1$  °C, hasta aproximadamente 30 ml observándose un sobrenadante de apariencia liposoluble, por lo que el concentrado se lavó dos veces con porciones de 10 ml de hexano. Para determinar si el hexano extrajo algún compuesto liposoluble contaminante, esta fase orgánica fue llevada a sequedad y el residuo fue pesado (13.9 mg). El residuo acuoso se volvió a concentrar hasta 10 ml.

Con la finalidad de disminuir la solubilidad de las saponinas en el residuo acuoso anterior, se adicionó ácido clorhídrico 0.2N de tal manera que el extracto final fue aproximadamente 0.1N, observándose la aparición de un notorio precipitado blanquecino. Se transfirió a un embudo de separación, lavando el recipiente contenedor por dos veces con porciones de 5 ml de ácido clorhídrico 0.1N. Se agitó 3 veces el contenido del embudo con la fase orgánica inferior de una mezcla de n-butanol:cloroformo:HCl 0.1N(6:1:3:3x70ml), desapareciendo el precipitado blanquesino (el mismo que se solubilizó en la fase orgánica), después de cada agitación se dejó en reposo por lo menos 15 minutos.

Se unieron las fases orgánicas y se agitó dos veces con porciones de 30ml de la fase inorgánica superior de la mezcla descrita anteriormente, dejándose en reposo por 15 minutos, obteniéndose así dos fases: una (a) inorgánica y otra orgánica (b).

La fase inorgánica(a) que se descartó fue sometida a una prueba de detección de carbohidratos como se describe en la sección 4.1.2.

La fase orgánica(b) de saponinas, se llevó a volumen conocido y se tomaron dos alícuotas:

1º La alícuota "1" desecada, se desarrolló el color y se obtuvo un espectro de absorción.

2º La alícuota "2" de volumen conocido, fue hidrolizada según Augusto(1979) y el extracto crudo y seco de saponinas así obtenido fue pesado y analizado espectrofotométricamente, previa reacción de color con el reactivo de "Lieberman Burchard Modificado".

#### 4.1.2.- Detección de carbohidratos

Para asegurarse de que en el método seguido, se está efectivamente eliminando impurezas como carbohidratos, se procedió a detectarlos en las fases inorgánicas.

Se procedió de la siguiente manera: una alícuota de aproximadamente 50ml de la fase inorgánica (a) (figura 22), fue neutralizada con Na(OH) 6N y posteriormente concentrada en baño maría a 70°C hasta un quinto de su volumen original, enfriada y clarificada como sigue: a

10 ml de solución acuosa se le adicionó 3 ml de solución saturada de acetato de plomo (10%) y 0.2gr. de oxalato de sodio, se dejó reposar por 10 minutos y luego se filtró en papel Whatman Nº1. Una alícuota del filtrado se sometió al test de Molish y el resto del filtrado se dejó reposar toda la noche. Al día siguiente aparecieron algunos cristales pequeños en el fondo del recipiente del resto del filtrado, los mismos que no fueron analizados.

Test de Molish: a 2 ml del filtrado se le adicionó 0.2 ml del reactivo (20% de 1-naftol en etanol) y, escurriendo por las paredes del tubo, se adicionó 2 ml de ácido sulfúrico, inmediatamente se observa la aparición de un anillo, en la interfase, de color marrón oscuro que desapareció aproximadamente al minuto de reacción, quedando anillos verdes que lentamente van coloreando la fase superior. Así mismo, en forma paralela se efectuó la misma prueba con glucosa anhidra, comportándose del mismo modo que la muestra. Se demuestra que hay presencia de carbohidratos en la fase inorgánica que se eliminó, lo que está de acuerdo con lo que menciona Kochetkov et al (1961): "la fracción de saponinas (glicósidos de ácido oleanólico), obtenida mediante el tratamiento con metanol de las raíces de Aralia manschurica, contenían una cantidad significativa de compuestos de carácter fenólico y de azúcares".

#### 4.1.3.-Estudio Espectrofotométrico de los extractos de saponinas y sapogeninas.

El espectro de absorción del extracto de saponinas obtenido (alícuota 1 de la Figura 22) fue confrontado con el espectro del standard de saponina "blanca Merck" adquirido en el comercio (Figura 23) mostrando ser diferentes, deduciendo así su estructura y procedencia también diferentes.

Adicionalmente, se obtuvo un espectro de absorción de la glucosa (Figura 24) como representante de los carbohidratos que podrían estar presentes tanto en la estructura de la molécula de saponinas como en forma de coextractivos. Arrojó un pico entre los 375 y 475 nm, en este mismo rango aparece un pico en el espectro de absorción del extracto de saponinas.

Por otro lado, fueron comparados los espectros de absorción, tanto de las sapogeninas (alícuota 2 de la Figura 22) como del standard de ácido oleanólico, mostrando ser iguales (Figura 25).

Para comprobar la especificidad del reactivo de Lieberman Burchard modificado, el peso del extracto crudo y seco de sapogeninas fue comparado con la cantidad de ácido oleanólico que arroja su análisis espectrofotométrico. Los resultados fueron 1.99 y 2.01% respectivamente, lo que estaría indicando la falta de especificidad de este reactivo, ya que el peso del extracto crudo de sapogeninas que está constituido por:

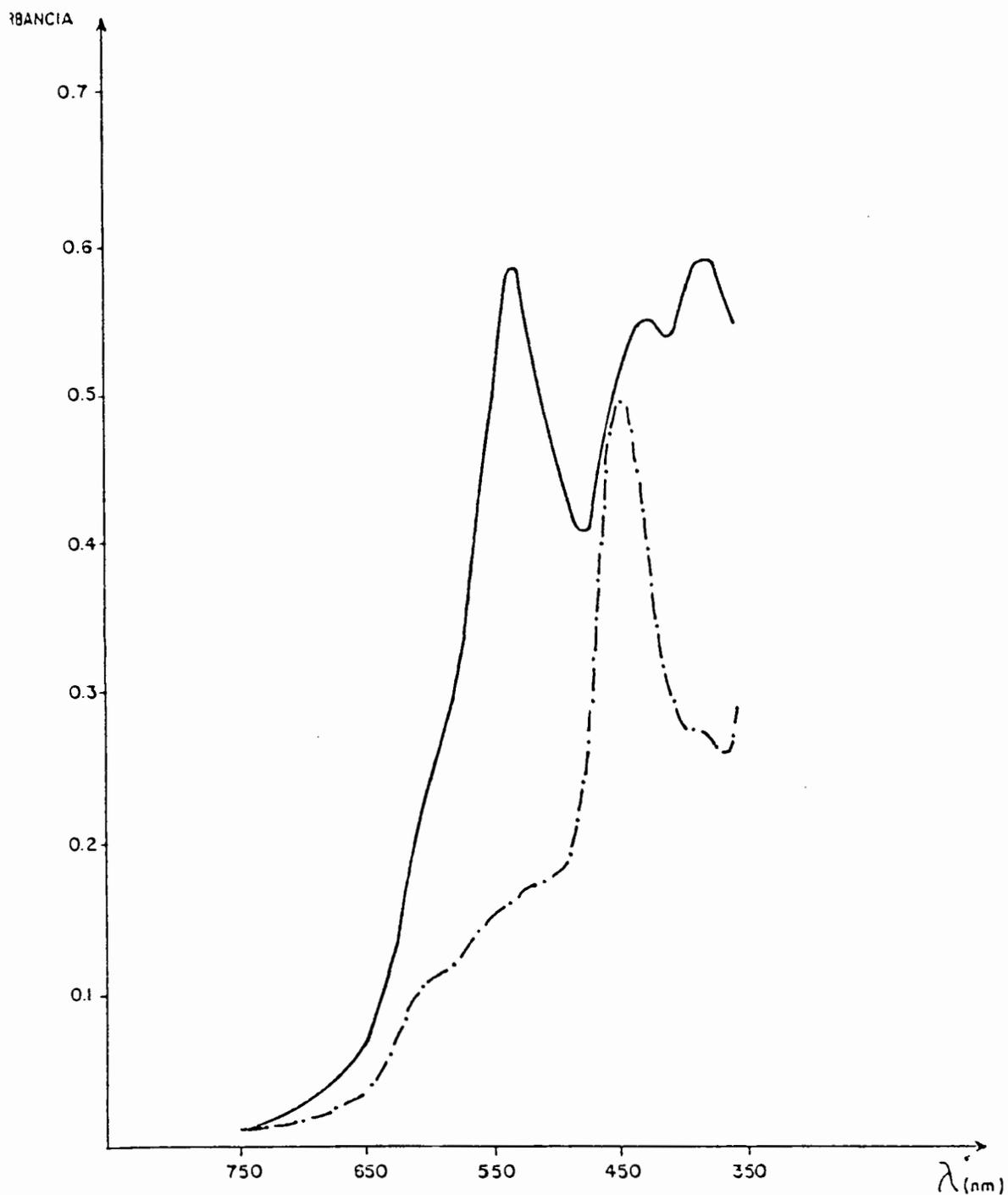


FIGURA 23 : ESPECTROS DE ABSORCION DEL STANDARD DE SAPONINA BLANCA MERCK(-·-) Y DEL EXTRACTO CRUDO DE SAPONINAS DE QUINUA (—).

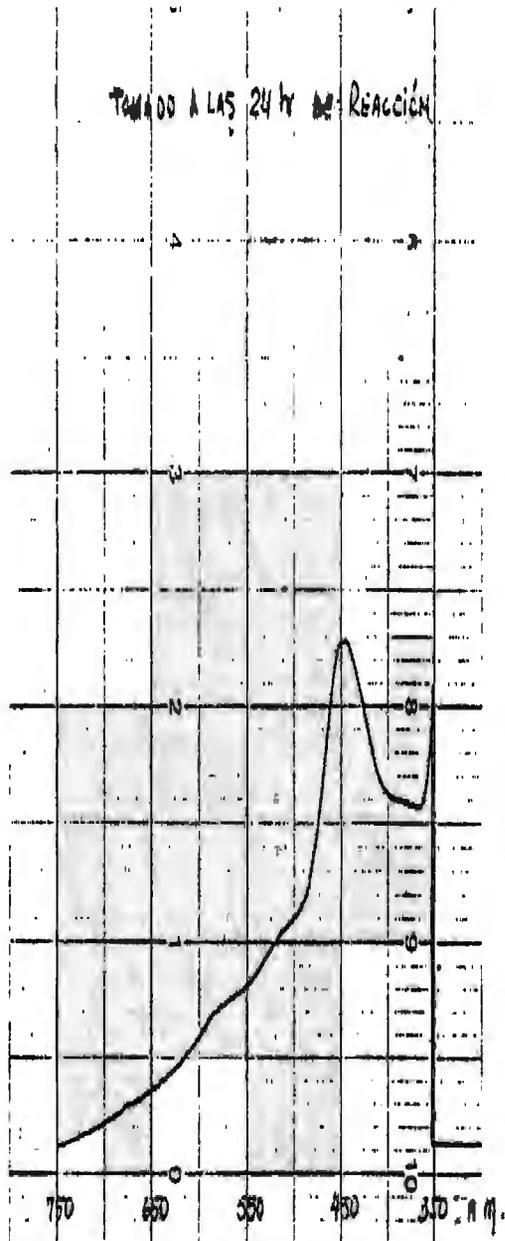
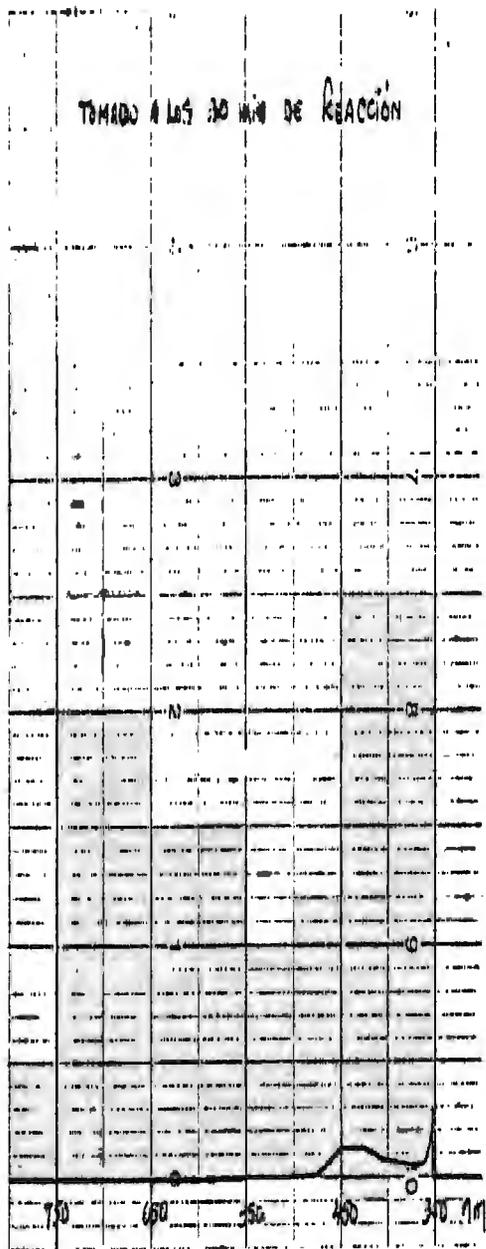


FIGURA 24 : ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL STANDARD DE GLUCOSA ANHIDRA

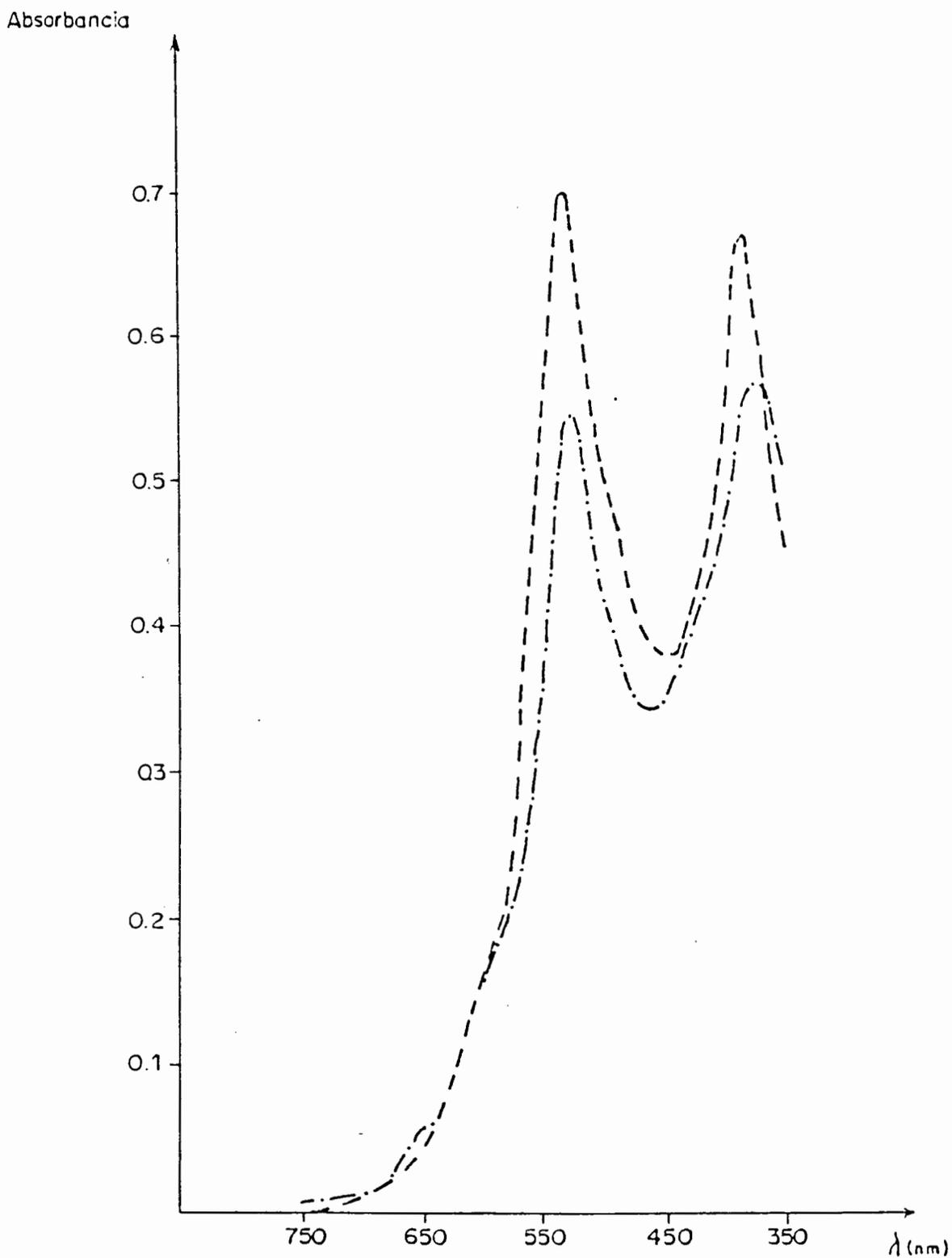


FIGURA 25 : ESPECTROS DE ABSORCION DEL STANDARD DE ACIDO OLEANOLICO (---) Y DEL EXTRACTO CRUDO DE SAOGENINAS (-.-).

ácido oleanólico + otras saponinas + coextractivos no puede ser menor al tenor que arroja el resultado espectrofotométrico. Esto se muestra en el siguiente esquema:

Quinoa	100.00
extracto crudo de saponinas	3.22
extracto crudo de saponinas	1.99
reacción de color (reactivo de Lieberman Burchard modificado)	
cuantificación espectrofotométrica de ácido oleanólico	2.01

#### 4.1.4.- Estudio Espectrofotométrico del Standard de Acido Oleanólico.

Se estudió el standard de ácido oleanólico con la finalidad de determinar su  $\lambda$  máximo, la estabilidad de la reacción de color, el rango de concentración dentro del cual cumple la ley de Lambert y Beer, así como su absorptividad específica ( $E_{1\%}^{1cm}$ ).

El espectro de absorción del ácido oleanólico arrojó dos máximos de absorción, a 355 y a 527nm. El segundo pico (527nm) presentó mayor estabilidad en el tiempo (hasta 150 minutos, ver cuadro 6 y figura 26). El stan-

## CUADRO 6

Variación de la absorbancia en función del tiempo, determinada a 527 nm. Muestra: 339.5 microgramos de ácido oleanólico.

Tiempo <sup>1</sup> (minutos)	Absorbancia
40	0.460
60	0.460
75	0.461
90	0.461
105	0.461
120	0.461
150	0.466

---

<sup>1</sup> El tiempo es contado, desde el momento que se realiza la reacción incluye los 25 minutos de calentamiento a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ , así como el tiempo de enfriamiento a temperatura ambiente.

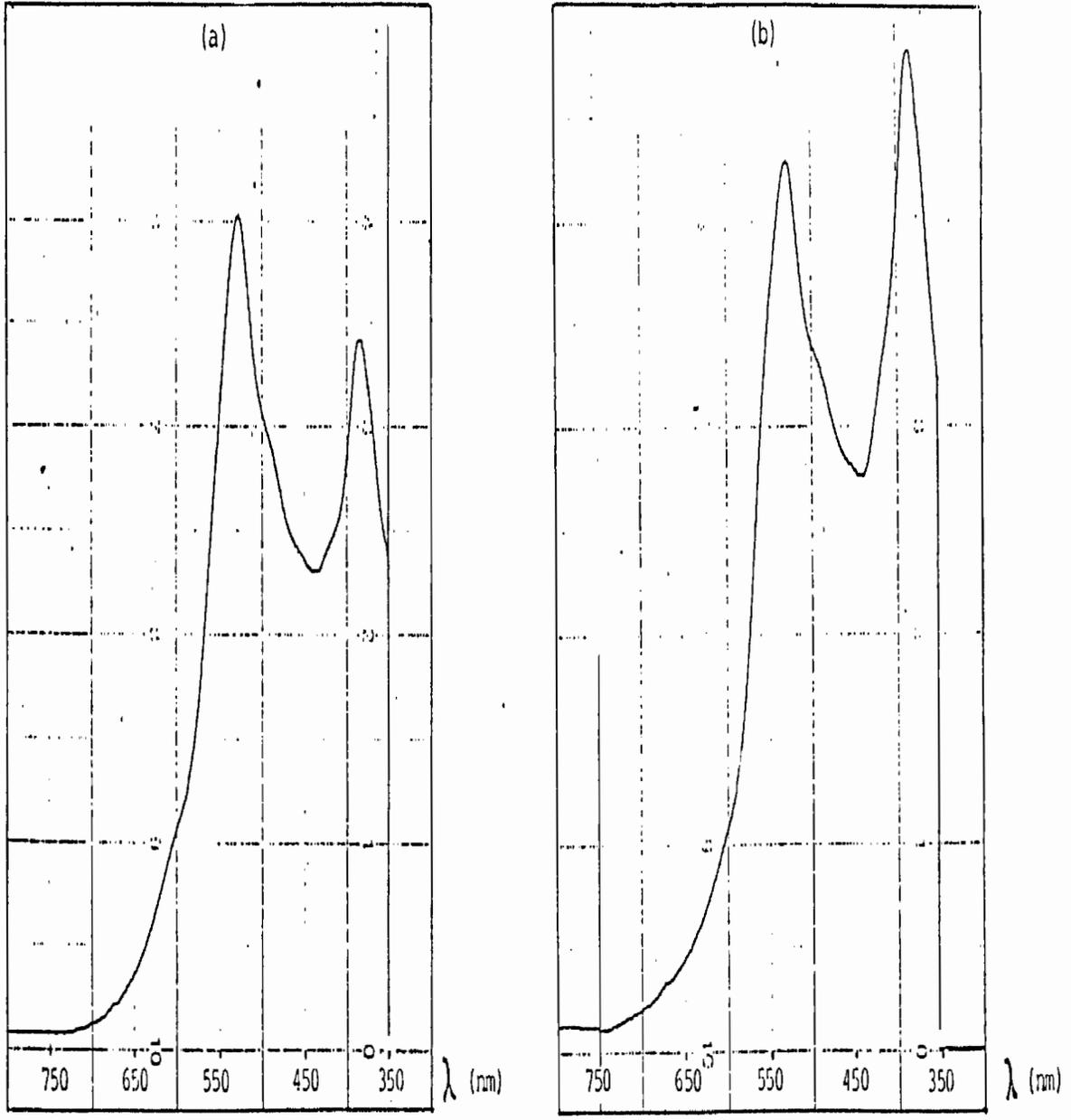


FIGURA 26 : ESPECTROS DE ABSORCION DEL STANDARD DE ACIDO OLEANOLICO A LOS 55 minutos (a) Y A LAS 24 hrs. (b), DESPUES DE LA REACCION DE COLOR.

dard de ácido oleanólico mostró una linealidad en el rango de 60 a 480 microgramos.

Adicionalmente, se determinó su absorptividad específica  $E_{1\%}^{1\text{cm}}_{527\text{nm}} = 67.80$  (ver Apéndice 5) a partir de los datos que se muestran en el cuadro 7 (sólo los 6 primeros datos), cuando se ajustan los valores que relacionan absorbancia y concentración en una recta que pasa por el origen (Apéndice 6 y Figura 27):

$$E_{1\%}^{1\text{cm}} = b = \frac{\sum XY}{\sum X^2} = 67.80$$

Se determina así la ecuación de la recta:  $A = 67.80c$ , cuando "C" está dado en grs/100ml.

#### 4.1.5.- Conclusiones.

1º No se recomienda el uso como standard de la saponina blanca Merck.

2º El método de Honerlagen y Tretter (1979) sufrió algunas modificaciones:

a.- Fue usada la proporción 4:1 y no 1:1 del sistema extractante MeOH:H<sub>2</sub>O

b.- Se adicionó la extracción con hexano para la separación de compuestos liposolubles.

c.- Se utilizó HCl 0.2N en vez de 0.1N para precipitar las saponinas.

3º El ácido oleanólico presente en el extracto crudo de saponinas, debe ser previamente purificado antes del análisis espectrofotométrico.

4º El lambda máximo de 527 nm es el recomendado pa-

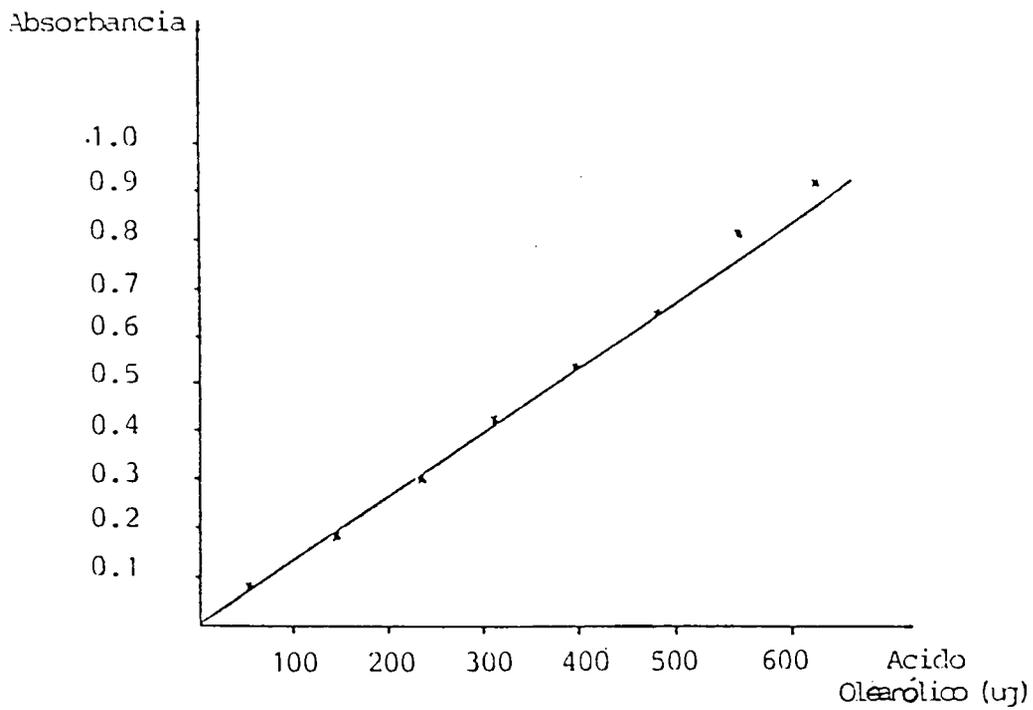


Figura 27: CURVA STANDARD DE ACIDO OLEANOLICO ,  
DETERMINADA POR ESPECTROFOTOMETRIA

CUADRO 7

Curva de calibración del standard de ácido oleanólico, una vez efectuada la reacción de color. Leídas a 527 nm.

	Volumen tomado (ul)	Cantidad <sup>1</sup> (ug)	Concentración(X) (gr/100ml)	Absorbancia(Y)	Absorbancia <sup>2</sup> Corregida
1	12	60	12x10 <sup>-4</sup>	0.083	0.083
2	29	145	29x10 <sup>-4</sup>	0.197	0.198
3	47	235	47x10 <sup>-4</sup>	0.317	0.319
4	62	310	62x10 <sup>-4</sup>	0.424	0.421
5	79	395	79x10 <sup>-4</sup>	0.537	0.535
6	96	480	96x10 <sup>-4</sup>	0.648	0.650
7	113	565	113x10 <sup>-4</sup>	0.814	0.765
8	130	650	130x10 <sup>-4</sup>	0.919	0.880

1 Esta cantidad proviene de tomar los volúmenes respectivos de una solución de standard de ácido oleanólico (5mg/ml de cloroformo), en la cual se desarrolló el color con ácido sulfúrico:ácido acético glacial, siendo el volumen final 5ml.

2 Considerando sólo las cantidades de 60 a 480 microgramos, donde el coeficiente de correlación es mayor (r=0.9999). Cuando se considera de 60 a 650 microgramos, el coeficiente de correlación baja a (r=0.9988).

ra la cuantificación de ácido oleanólico.

5º El ácido oleanólico cumple la ley de Lambert y Beer en un rango de 60 a 480 microgramos.

6º Se ha determinado un  $E_{1\%}^{1\text{cm}}_{527\text{nm}} = 67.80$  para el standard de ácido oleanólico.

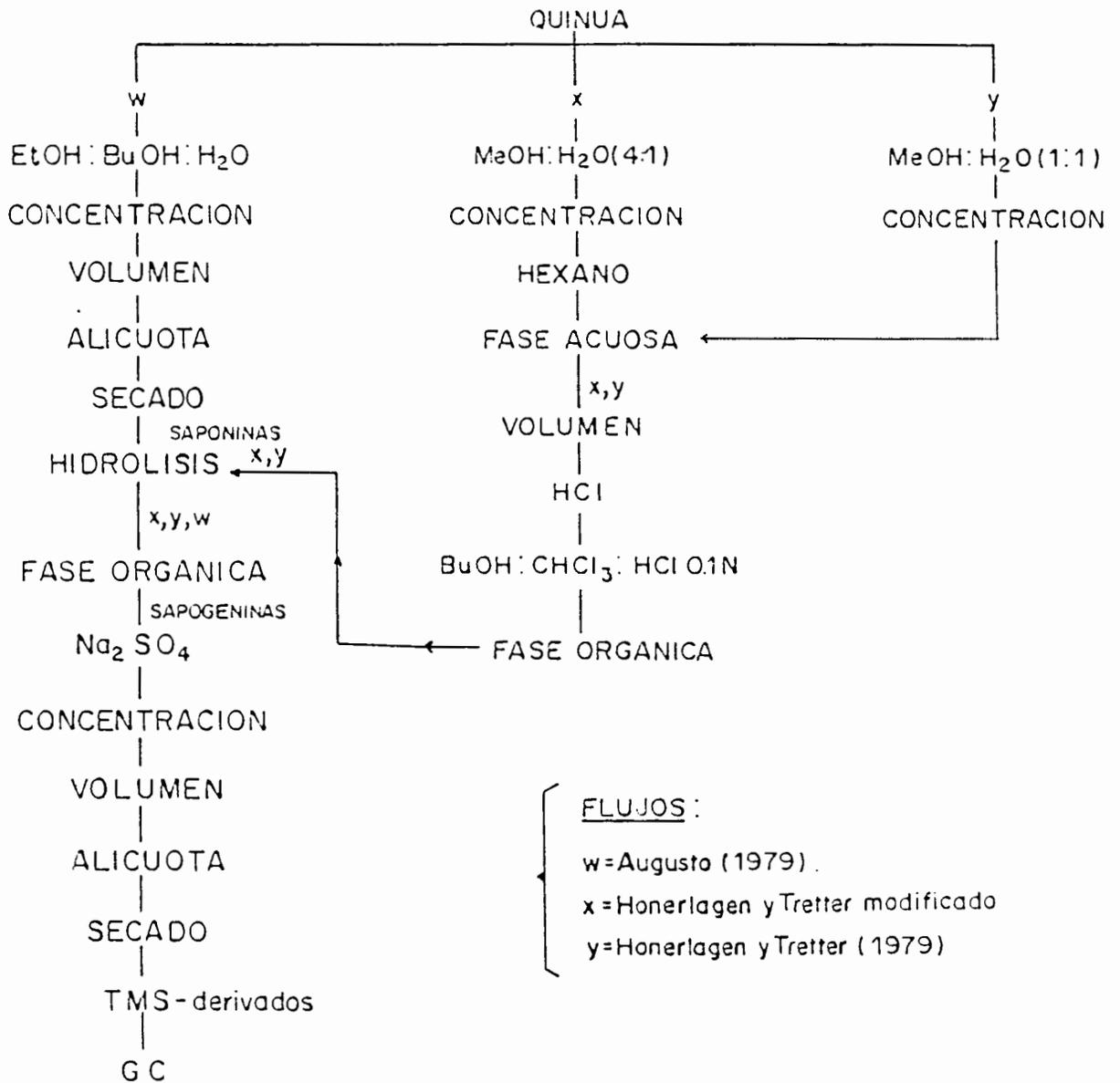
7º Se recomienda confrontar la recuperación de éste método con otros y elegir el de mayor recuperación de ácido oleanólico.

#### 4.2.- EVALUACION DE LA RECUPERACION DE ACIDO OLEANOLICO EN TRES FLUJOS EXTRACTIVOS.

Con la finalidad de elegir un método que ofrece mayor recuperación de ácido oleanólico, se evaluó tres flujos extractivos: 1º el de Augusto (1979) 2º el de Honerlagen y Tretter (1979) modificado y 3º sin modificar. El segundo flujo ya fue detallado en la sección 4.1. El primer flujo es el único que utiliza hidrólisis para transformar saponinas a sapogeninas, por lo que éste mismo procedimiento de hidrólisis será aplicado a cada uno de los tres extractos crudos de saponinas obtenidos. El ácido oleanólico de las sapogeninas resultantes será evaluado por cromatografía de gas (según Augusto 1979) y el método de mayor recuperación será elegido como parte del flujo de un método espectrofotométrico que se propondrá posteriormente.

En la Figura 28 se presenta el esquema de los tres flujos seguidos: el de Augusto 1979(W), el de Honerlagen y

FIGURA 28. - FLUJOS PARA LA DETERMINACION DE ACIDO OLEANOLICO EN QUINUA Y LA EVALUACION DE LOS MISMOS POR CROMATOGRAFIA DE GAS (GC).



NOMENCLATURA:

- MeOH = metanol
- EtOH = etanol
- BuOH = butanol
- CHCl<sub>3</sub> = cloroformo
- ETEPE = éter de petróleo
- Na<sub>2</sub>SO = sulfato de sodio
- HCl = ac. clorhídrico
- H<sub>2</sub>O = agua
- TMS = trimetil silil
- GC = cromatografía de gas.

Tretter 1979 modificado (X) y sin modificar (Y). Obsérvese de que los extractos crudos de saponinas sufren el mismo proceso de hidrólisis en cada uno de los flujos, independientemente, para finalmente analizar el tenor de ácido oleanólico por cromatografía de gas en cada extracto de sapogeninas.

Se procedió de la siguiente manera:

Se obtuvo extractos de sapogeninas procedentes de cada uno de los tres flujos. Los extractos crudos de saponinas resultantes fueron tratados según Augusto 1979. Así, las saponinas fueron hidrolizadas y los TMS-derivados de las sapogeninas resultantes fueron inyectados a un cromatógrafo de gas para la determinación de ácido oleanólico.

TMS-derivados de sapogeninas: Se tomó una alícuota (equivalente a un gramo de muestra) de cada uno de los extractos de sapogeninas anteriores para proceder a la formación de los trimetilsilil TMS-derivados. Para tal efecto, un volumen conocido del extracto de sapogeninas fue secado con flujo de nitrógeno puro, luego fue hecho reaccionar, bajo condiciones estrictamente anhidras, por adición de 0.2 ml del reactivo silanizante, el N,O-bis(trimetilsilil)trifluoro acetamida BSTFA, para posteriormente adicionar 0.2 ml de piridina (destilada con perlas de hidróxido de potasio), la mezcla se refluxó (en presencia de  $\text{CaCl}_2$  como desecante en el extremo del refrigerante para evitar el ingreso de humedad ambien-

tal) en baño maria a 60°C x 15 minutos, con agitación magnética y se enfrió mediante chorros exteriores de agua fría para llevarlo rápidamente a la temperatura ambiente.

#### Cromatografía de gas de los TMS-derivados:

Los TMS-derivados fueron inyectados (equivalente a  $\pm$  1mg de quinua) en un cromatógrafo de gas marca Perkin Elmer 3920, cuyas condiciones de operación se muestra en el Cuadro 8. El TMS-derivado del standard de ácido oleanólico también fue obtenido bajo las mismas condiciones descritas para la muestra. La confirmación de la identidad del pico correspondiente a ácido oleanólico se realizó por adición de standard a cada uno de los extractos de sapogeninas; el standard se sobrepuso al pico de mayor magnitud.

Los tenores de ácido oleanólico que arrojaron cada uno de los tres flujos fueron evaluados. En el Cuadro 9 se puede observar que el flujo "W" es el que ofrece la mayor recuperación, siendo el flujo "Y" el que ofrece la menor. De esto se puede deducir que a medida que se incrementa la porción de solvente orgánico al sistema de extracción; la recuperación es más eficiente, esto hasta llegar a la polaridad que arroja el sistema n-BuOH 80%: EtOH 80%(1:2;1:1;2:1).

En el Cuadro 10 se incluyen los datos de las repeticiones de los tres métodos, con la finalidad de realizar un análisis de varianza y evaluar si las diferen-

## CUADRO 8

Condiciones gas cromatográficas seguidas para la determinación de los TMS-derivados de saponinas usando una columna de vidrio 3% SE-30 en Chron.W AW BMCS 80/100 5' x 1/4".

Condiciones	
Temperatura de la columna	285°C
Temperatura del inyector	330°C
Temperatura del detector FID*	315°C
Gas de arrastre, nitrógeno	65 ml/min.
Atenuación	x16
Rango	x100

\* Detector de ionización de llama (Flame Ionization Detector=FID).

CUADRO 9

Porcentaje de ác. oleanólico (A.O) determinado por GC, que arroja cada uno de los tres flujos extractivos (promedio de tres extracciones)

Método	% de A.O	% de saponinas (=% A.O. x 8.5208)
Y	0.06	0.51
X	0.22	1.87
W	0.32	2.73

$$\% \text{ A.O.} = \frac{\text{A.O.}}{Q} \times 100$$

donde:

A.O. = cantidad de A.O. obtenido de curva standard, en microgramos.

Q = cantidad de quinua en el volumen inyectado, en microgramos.

8.5208 es el factor obtenido a partir de saponinas semi-purificadas en nuestro laboratorio.

cias son significativas entre las cantidades obtenidas con cada flujo extractivo.

En el Cuadro 11 están considerados los valores para calcular las varianzas, las cuales se han determinado, considerando las sgtes. relaciones:

a) Grados de libertad.

. entre tratamientos (flujos extractivos) =  $a-1$

. dentro de tratamientos (repeticiones de cada flujo) =  $a(n-1)$

. total =  $an-1$

donde "a" es el número de tratamientos (flujos extractivos) y "n" es el número de observaciones por tratamiento (repeticiones de cada flujo).

b) Suma de cuadrados

. entre tratamientos (entre flujos), haciendo  $G =$

$\sum t = \sum EX$  (sumando tanto hileras como columnas).

Donde t designa un total de clase típica (repeticiones en un mismo flujo) y G representa el gran total. El primer paso consiste en calcular la "corrección para la media",

$$C = G^2 / an$$

La suma de cuadrados entre tratamientos, estará dada por:  $(\sum t^2 / n) - C$

. dentro de tratamientos (dentro de cada flujo)

$$\sum (EX^2) - \sum (EX^2 / n)$$

c) Cuadrado Medio =  $\frac{\text{suma de cuadrados}}{\text{grados de libertad}}$

Así tendremos que para la suma de cuadrados entre tratamientos (tomando la fila de "ΣX" del Cuadro 10):

	Y	X	W	total
ΣX	0.18	0.5750	0.96	G=Σt=ΣΣX=1.815 Σt <sup>2</sup> =1.409625 (Σt <sup>2</sup> )/n=0.469875

para "c" tenemos:

$$C = \frac{G^2}{an} = \frac{(1.815)^2}{3 \times 3} = 0.356025$$

entonces:

$$\frac{(\Sigma t^2)}{n} - C = 0.469875 - 0.356025$$

= 0.10385 que es la suma de cuadrado entre flujos.

Con estos datos elaboramos el Cuadro 11.

Para determinar la significación de la diferencia de los resultados, se realizó la prueba de la razón de variancia, F:

$$F = \frac{0.051925}{6.9087 \times 10^{-4}} = 751.59$$

En la tabla A 14 de distribución de F (Snedecor y Cochran, 1971), con  $f_1=2$  y  $f_2=6$  grados de libertad, se tiene  $f_{0.05}=5.14$ . Como  $f_{0.05}$  es menor a  $f$  calculado, podemos afirmar que hay diferencias significativas entre los porcentajes de ac. pleonálico que arrojan los flujos con distintos tratamientos.

CUADRO 10

Tratamiento estadístico del porcentaje de ácido oleanólico que arroja cada uno de los tres flujos extractivos y las tres repeticiones de cada flujo.

FUJOS --> REPETICIONES	Y	X	W	TOTAL
I	0.06210	0.2358	0.3322	
II	0.05742	0.2205	0.3152	
III	0.06048	0.21870	0.3126	
ΣX	0.18	0.6750	0.96	G=Σt=ΣΣX=1.815
X	0.06	0.2250	0.32	
ΣX <sup>2</sup>	0.01081130	0.15205158	0.30742664	ΣΣX <sup>2</sup> =0.47028952
(ΣX) <sup>2</sup> /n	0.0108	0.151875	0.3072	Σ(ΣX) <sup>2</sup> /n=0.469875
ΣX <sup>2</sup> -(ΣX) <sup>2</sup> /n	1.13×10 <sup>-3</sup>	1.7658×10 <sup>-2</sup>	2.2664×10 <sup>-2</sup>	Σ   ΣX <sup>2</sup> -(ΣX) <sup>2</sup> /n   = 4.1452×10 <sup>-2</sup>
GL	2	2	2	

CUADRO 11

Análisis de varianza de los porcentajes de ác. oleanólico.

Fuente de variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio
Entre flujos	2	0.10385	0.051925
Dentro de los flujos	6	4.1452×10 <sup>-2</sup>	6.9087×10 <sup>-3</sup>
TOTAL	8	0.10426452	0.013033065

**Porcentaje de ácido oleanólico respecto a las sapogeninas totales:**

Se determinó por Normalización Interna, el porcentaje de ácido oleanólico respecto a las demás sapogeninas; que arroja el cromatograma (Fig. 29). En este método de Normalización Interna, se asume que a iguales cantidades de dos sustancias diferentes, la respuesta (area) es la misma bajo las mismas condiciones de operación.

Aplicando la Normalización Interna en el cromatograma de sapogeninas de la Figura 29 se puede determinar la cantidad de sapogeninas totales conociendo sólo una de ellas, el ácido oleanólico. Así, identificando a cada una de las sapogeninas de la Figura 29 como X, Y, W, Z (de izquierda a derecha) siendo sus areas:  $A_x$ ,  $A_y$ ,  $A_w$ ,  $A_z$  respectivamente, podremos hallar el porcentaje de ácido oleanólico, respecto a las demás sapogeninas

$$\%X = \frac{A_x}{A_x + A_y + A_w + A_z} \times 100$$

donde %X es el porcentaje en peso de ácido oleanólico referido a las areas, pero como hay una relación directa entre pesos y areas se tendrá:

$$\begin{aligned} \% \text{ Ac. Oleanólico} &= \frac{6.965}{6.965+1.14+0.21+0.175} \times 100 \\ &= 82.04 \% \end{aligned}$$

Este 82.04% es el porcentaje en peso de ácido oleanólico respecto a las sapogeninas totales, donde se deduce la siguiente relación:

$$\text{Acido Oleanólico} \times 1.2189 = \text{Sapogeninas.}$$

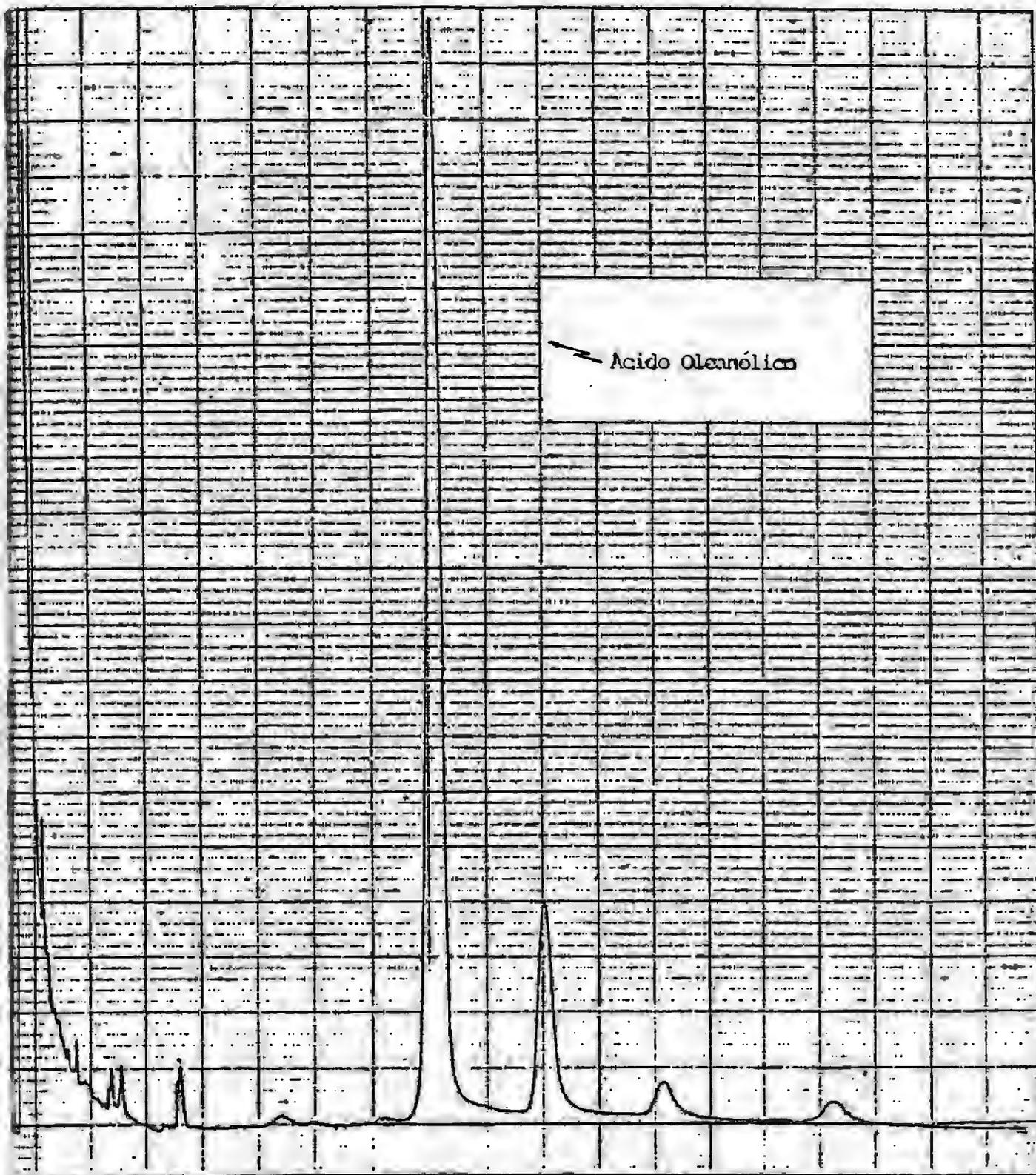


FIGURA 29 : CROMATOGRAMA DE LOS TMS-DERIVADOS DE LAS SAPOGENINAS DE QUININA

#### 4.2.1.- CONCLUSIONES

1º. El flujo de Augusto 1979 ofrece la mayor recuperación de ácido oleanólico (0.32%).

2º. El flujo de Honerlagen y Tretter 1979 modificado ofrece una recuperación intermedia (0.22%) y el sin modificar la más baja recuperación (0.06%).

3º. El análisis de varianza arrojó que hay diferencias significativas entre los flujos aplicados.

4º. El ácido oleanólico constituye un 82.04% de las sapogeninas totales. Este resultado es similar al obtenido por Augusto 1979 (79.5%).

5º. Se determinó un factor de transformación de ácido oleanólico a sapogeninas:

$$\text{Acido oleanólico} \times 1.2189 = \text{Sapogeninas.}$$

#### 4.3.- PURIFICACION DE ACIDO OLEANOLICO Y PROPUESTA DE UN METODO ESPECTROFOTOMETRICO DEFINITIVO.

Los extractos crudos de sapogeninas del flujo que ofrece mayor recuperación de ácido oleanólico fueron tratados por cromatografía en capa fina preparativa en un sistema de solventes no reportado anteriormente para estos fines. El ácido oleanólico así purificado fue analizado por espectrofotometría, previa reacción de color con el reactivo Lieberman Burchard modificado. Finalmente, se propone un método analítico definitivo y se confronta con el gas cromatográfico de Augusto (1979), para hallar el porcentaje de error del primero

frente a este último.

Para expresar los resultados en términos de saponinas, se purificará éstas a partir de quinua, se tomará un peso conocido y se evaluará por cromatografía de gas su tenor de ácido oleanólico. Así se podrá hallar un factor "f" dentro de la siguiente relación:

$$\text{ácido oleanólico} \times f = \text{saponinas.}$$

Las acciones descritas anteriormente se sustentan básicamente en dos hechos:

1º Que el flujo de mayor recuperación de ácido oleanólico es el de Agosto 1979 y 2º que fué establecido que el reactivo de color Lieberman Burchard modificado no ofrece especificidad por lo que era necesario purificar el ácido oleanólico presente en los extractos crudos de sapogeninas obtenidos, como un paso previo al análisis espectrofotométrico. La cromatografía en capa fina presenta una magnífica alternativa de purificación.

El flujo resumido se muestra en la Figura 30 y el detallado en la Figura 31. En el flujo resumido se muestra adicionalmente la evaluación gas cromatográfica en los extractos de sapogenina obtenidos, obsérvese que cuando se trata de un método espectrofotométrico es necesaria una purificación previa por cromatografía en capa fina (TLC), máxime si el reactivo de color no es específico. La cromatografía de gas sí separa los compuestos (inclusi<sup>ve</sup> las sapogeninas entre sí) por lo que

Figura 30: Flujo espectrofotométrico definitivo resumido (—); así como su evaluación gas cromatográfica GC(-x-x-)

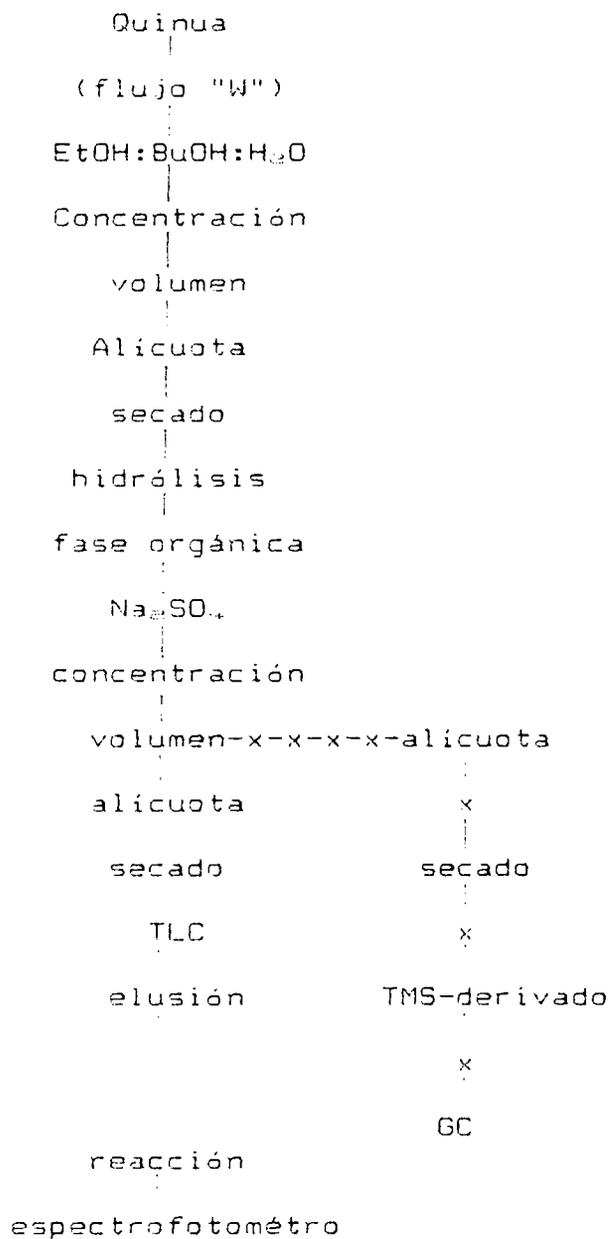
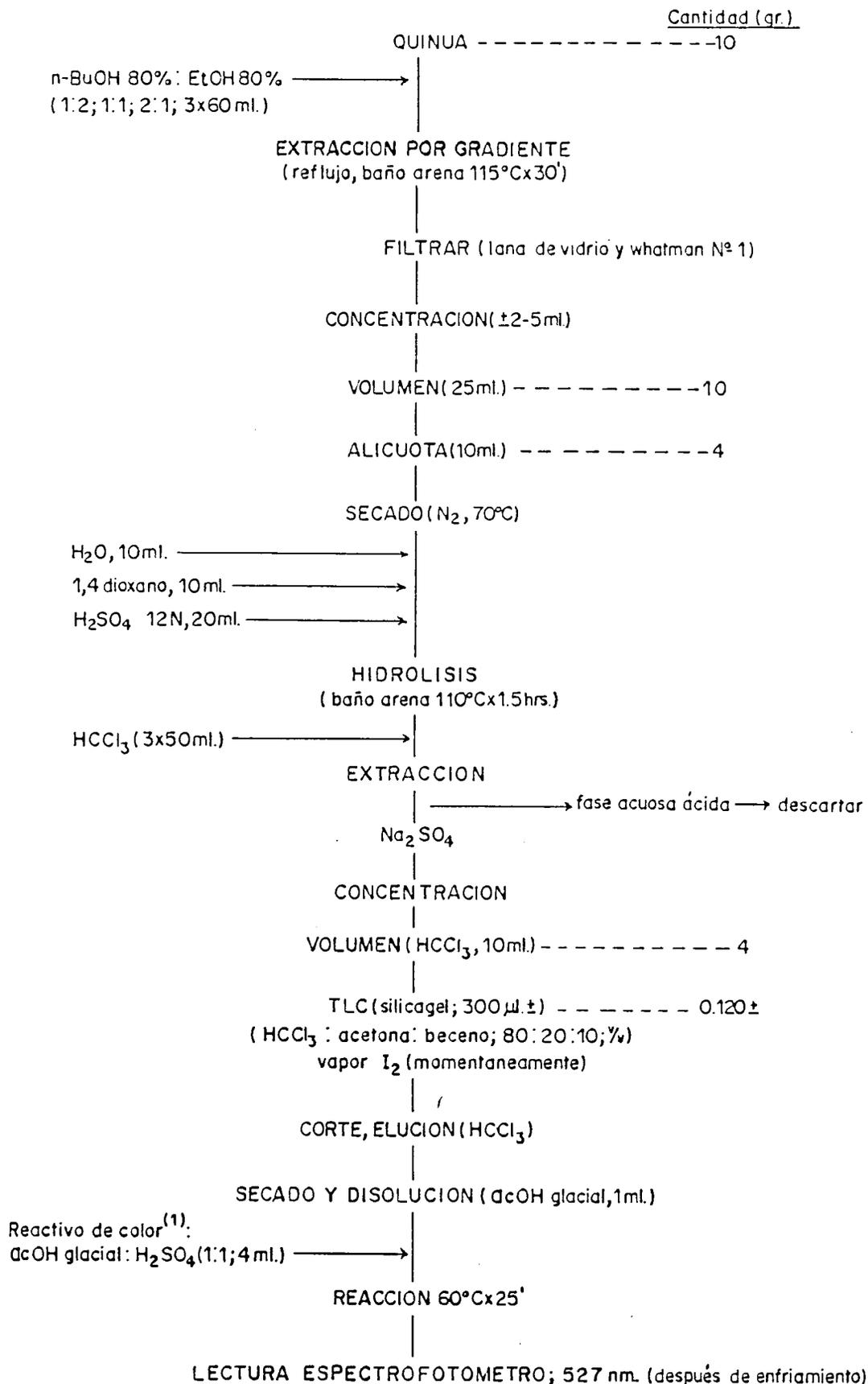


FIGURA 31 -- FLUJO ESPECTROFOTOMETRICO DEFINITIVO PARA LA CUANTIFICACION DE ACIDO OLEANOLICO



<sup>(1)</sup> Previo reposo de 2 hrs.

no necesita purificación previa pero sí; reacciones de derivatización para volatilizar las sapogeninas (ácido oleanólico entre ellas) dado su elevado peso molecular y la presencia de hidrógenos activos en los grupos polares (carboxilo e hidroxilo).

Se procedió del siguiente modo:

Para la obtención de un extracto crudo de sapogeninas se aplicó el método de Augusto (1979).

Para la eliminación de impurezas mediante cromatografía en capa fina (TLC), algunos microlitros (equivalentes a 12 mg de quinua) del extracto crudo de sapogeninas anterior, se sembraron en bandas de 5cm frente a un standard de ácido oleanólico, empleando un equipo para tal fin marca CAMAG, modelo LINOMAT III, sobre placas de vidrio recubiertas en el laboratorio con 0.5 mm de espesor de Silicagel G marca Merck. Se ensayó el sistema de desarrollo cloroformo:acetona:benceno(80:-20:10;v/v) y el revelado se realizó por exposición a los vapores de Yodo.

Localizadas las manchas (Figura 32) y eliminado el yodo remanente con corriente de aire forzado, la banda con Rf correspondiente al del ácido oleanólico (cuyo standard fué sembrado paralelamente fue cortada y eluída con 15 ml de cloroformo sobre una columna de 1.2 cm de diámetro interno, para posteriormente realizar su determinación espectrofotométrica.

Solvente : Cloroformo-Acetona-Benzol (80:20:10)  
 Adsorbente : Silicagel G (Tipo 60), 0.5 mm.  
 Revelador : Vapores de Iodo

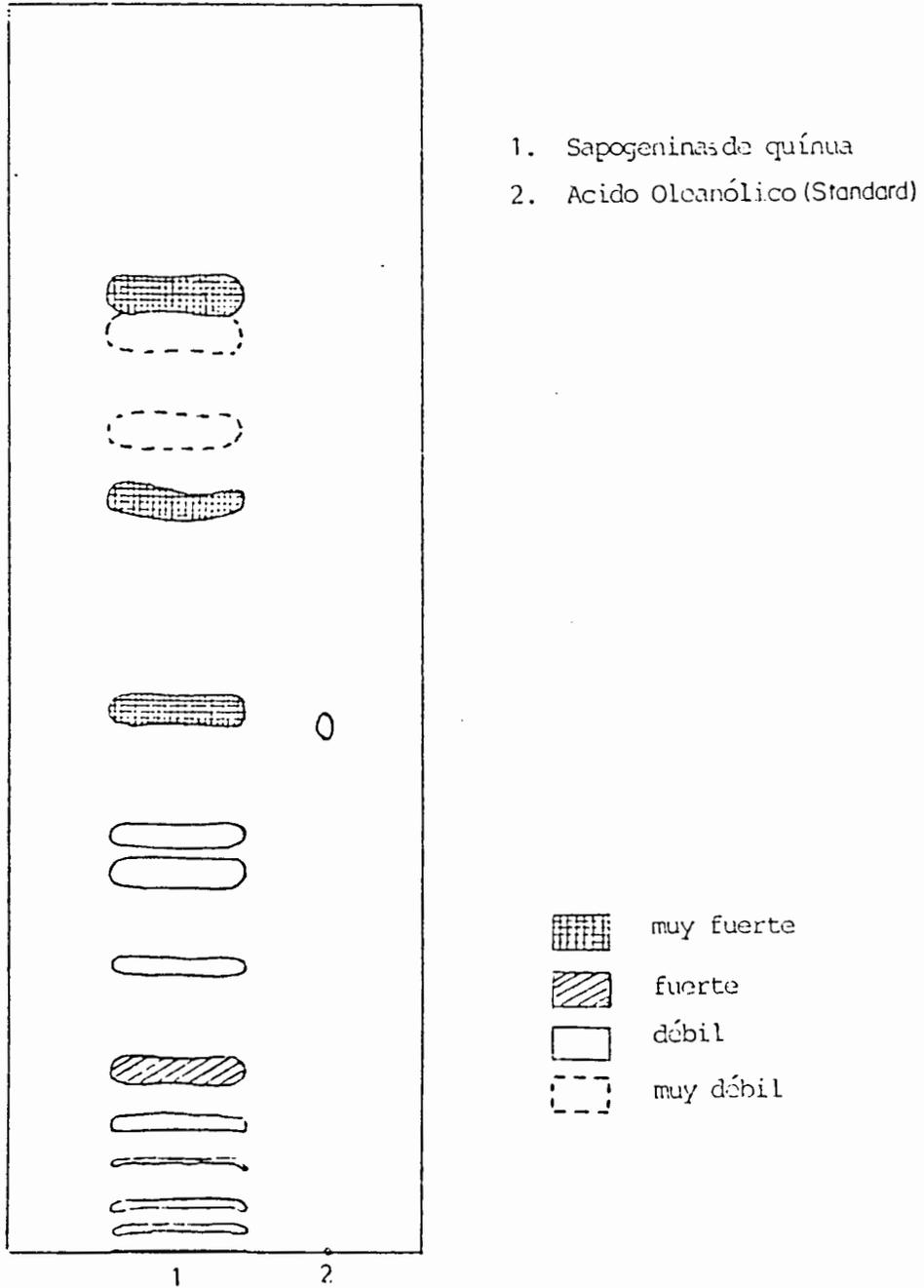


FIGURA 32 : CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC) DE SAPOGENINAS DE QUINUA.

#### 4.3.1.- DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA:

1º Reactivo del color: 50ml de ácido acético glacial, por lo menos de 96% de pureza, se diluyeron cuidadosamente en 50 ml de ácido sulfúrico, por lo menos de 96% de pureza, con agitación suave y bajo corriente de agua. Después de la mezcla, el reactivo se agitó energicamente y después de dos horas de reposo estuvo listo para ser usado.

2º Solución standard de ácido oleanólico: 2 mg de ácido oleanólico (punto de fusión 298-301°C), se disolvieron en 1ml de ácido acético glacial de pureza no menor de 96%.

3º Reacción de color: una alícuota de la solución standard se diluyó a 1ml con ácido acético glacial y se le adicionó 4 ml de reactivo de color, se mezcló bien y se calentó por 25 minutos a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ . Como blanco se utilizó una mezcla tratada en forma igual, compuesta por 1ml de ácido acético glacial y 4ml de reactivo de color.

En la muestra, la banda cuyo  $R_f$  corresponde al del ácido oleanólico (Figura 32), fue llevada a sequedad y el residuo disuelto en 1ml de ácido acético, prosiguiéndose como en el caso del standard. Al adicionar el reactivo de color se observa una coloración amarilla tenue, que lentamente va virando a púrpura.

Enfriadas las muestras a temperatura ambiente, la medida del color púrpura desarrollado se efectuó en

espectrofotómetro VARIAN DMS-90 UV-VISIBLE, programable, con cambio automático de longitud de onda y con registrador. Se obtuvieron espectros de absorción entre 351 y 750 nm; tanto del ácido oleanólico como de la banda cuyo Rf corresponde al del ácido oleanólico (Figura 33).

Se determinó la media (X), desviación standard (S) y coeficiente de variabilidad (C.V.) en cinco repeticiones (cuadro 12).

El porcentaje de ácido oleanólico en quinua, se halla mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acido oleanólico} = \frac{A_{22} \times C_1}{A_1 \times C_{22}} \times 100$$

donde:  $A_1$  = valor promedio de tres absorbancias del standard de ácido oleanólico.

$A_{22}$  = valor promedio de tres absorbancias de la muestra

$C_1$  = concentración del standard, en ug/ml.

$C_{22}$  = concentración de la muestra en el extracto analizado, en ug de quinua/ml.

Se determinó el porcentaje de ácido oleanólico que arroja el presente método (0.286%) estableciéndose un error de  $\pm 9.44\%$  en la precisión. La exactitud fué evaluada por cromatografía de gas en alícuotas del extracto crudo de sapogeninas (Figura 30), determinándose un error en defecto del método espectrofotométrico respecto al gas cromatográfico de  $-10.6\% = \frac{0.286 - 0.32}{0.32} \times 100$

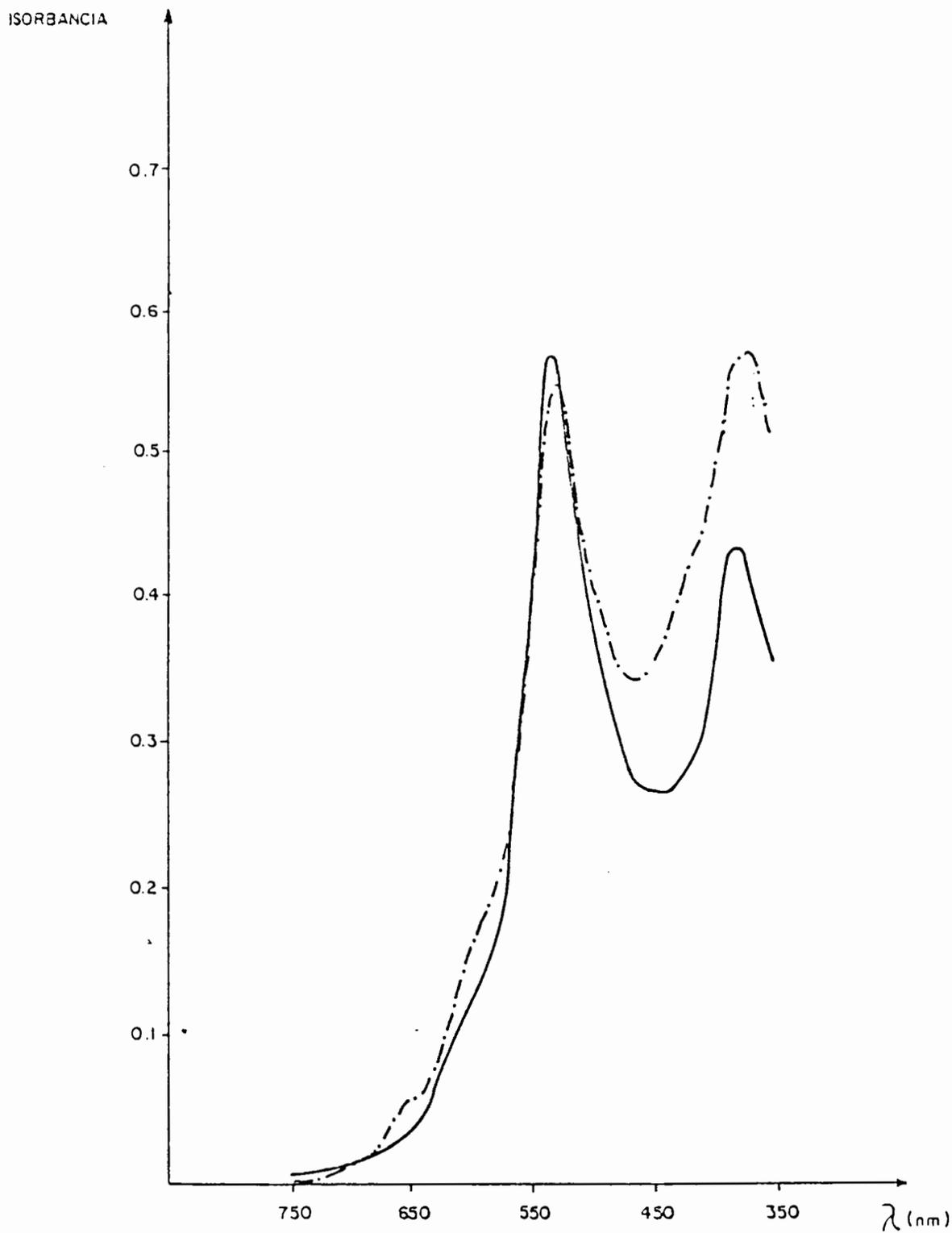


FIGURA 33 : ESPECTROS DE ABSORCION DEL STANDARD DE ACIDO OLEANOLICO (---) Y DEL ACIDO OLEANOLICO DEL FLUJO "X" (—).

CUADRO 12

Media(X), desviación standard (S) y coeficiente de variabilidad (C.V.) del contenido de ácido oleanólico, determinados en cinco repeticiones.

Repeticiones	Acido Oleanólico (%)
1	0.259
2	0.258
3	0.312
4	0.288
5	0.313
Media (X)	0.286
Desviación standard (S)*	0.027
Coeficiente de variabilidad (C.V.)*,%	9.44

$$* S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$* C.V.(%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

#### 4.3.2.- Expresión de ácido oleanólico en términos de saponinas. Obtención de saponinas semipurificadas.

El tenor de ácido oleanólico es un indicador de los niveles de saponinas presentes; pero se puede llegar a expresar los resultados en términos de las saponinas mismas. Es así que se semipurificarán éstas, se tomará

un peso conocido ( $P_1$ ) y se analizará el tenor de ácido oleanólico ( $P_2$ ) por cromatografía de gas para hallar un factor ( $f = \frac{P_1}{P_2}$ ) que permita la transformación  $P_2$  de ácido oleanólico a saponina:

$$\text{Acido Oleanólico} \times f = \text{saponinas.}$$

Fué necesario purificar saponinas a partir de la misma quinua ya que anteriormente se concluyó que no se podía utilizar saponina blanca Merck del comercio por ser de procedencia y estructura diferente al de las saponinas de quinua.

Para los trabajos de purificación se tomó como base el trabajo de Ghosal et al (1981).

En la Figura 34 se esquematiza el procedimiento seguido, el cual básicamente consiste en partir de un polvillo rico en saponinas, tratarlo al soxhlet con eter de petróleo para eliminar impurezas liposolubles y extraer el residuo con etanol. Las saponinas semipurificadas son obtenidas mediante la concentración del extracto etanólico para su posterior precipitación.

El porcedimiento en detalle es como sigue:

los granos de quinua fueron escarificados en licuadora por tres segundos. El escarificado resultante fue extractado al soxhlet con eter de petróleo (40-60°C por 50 hrs. y luego con etanol absoluto (50 hrs.). Los dos extractos fueron separadamente procesados.

El extracto de eter de petróleo (ETEPE) fue concentrado y luego de estar en almacenamiento, presentó algunos cristales bastante notorios al cabo de un tiem-

un peso conocido ( $P_1$ ) y se analizará el tenor de ácido oleanólico ( $P_2$ ) por cromatografía de gas para hallar un factor ( $f = \frac{P_1}{P_2}$ ) que permita la transformación de ácido oleanólico a saponina:

$$\text{Acido Oleanólico} \times f = \text{saponinas.}$$

Fué necesario purificar saponinas a partir de la misma quinua ya que anteriormente se concluyó que no se podía utilizar saponina blanca Merck del comercio por ser de procedencia y estructura diferente al de las saponinas de quinua.

Para los trabajos de purificación se tomó como base el trabajo de Ghosal et al (1981).

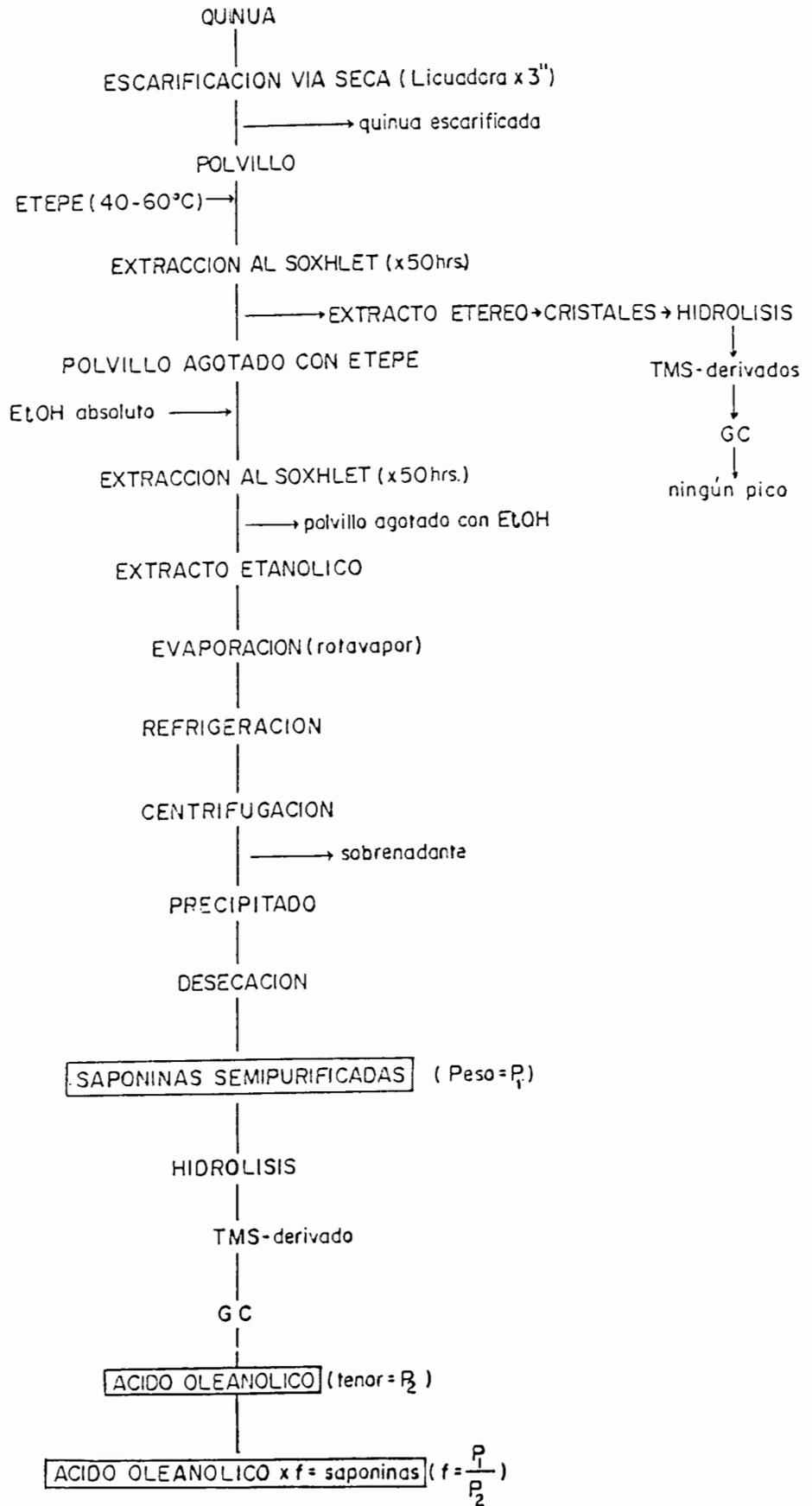
En la Figura 34 se esquematiza el procedimiento seguido, el cual básicamente consiste en partir de un polvillo rico en saponinas, tratarlo al soxhlet con eter de petróleo para eliminar impurezas liposolubles y extraer el residuo con etanol. Las saponinas semipurificadas son obtenidas mediante la concentración del extracto etanólico para su posterior precipitación.

El porcedimiento en detalle es como sigue:

los granos de quinua fueron escarificados en licuadora por tres segundos. El escarificado resultante fue extractado al soxhlet con eter de petróleo (40-60°C por 50 hrs. y luego con etanol absoluto (50 hrs.)). Los dos extractos fueron separadamente procesados.

El extracto de eter de petróleo (ETEPE) fue concentrado y luego de estar en almacenamiento, presentó al-

FIGURA 34.- FLUJO PARA LA OBTENCION DE SAPONINAS SEMIPURIFICADAS



gunos cristales bastante notorios al cabo de un tiempo, los mismos que sufrieron un proceso de hidrólisis y silanización para su posterior inyección al cromatógrafo de gas. Los cromatogramas no mostraron ningún pico, esto estaría indicando la ausencia de grupos polares (carboxilos u hidroxilos) sobre los cuales actúa el reactivo silanizante, esta constitución débilmente polar que se deduce está reforzada también por su solubilidad en éter de petróleo.

El extracto etanólico fue concentrado a pequeño volumen y enfriado. La materia insoluble resultante fue separada del sobrenadante por centrifugación, para posteriormente ser desecada y pesada (Peso =  $P_1$ ). Tanto la hidrólisis como la cuantificación por cromatografía de gas del ácido oleanólico (Tenor =  $P_2$ ) fueron efectuadas según Augusto (1979). Así, fué hallado el factor ( $f = P_1 / P_2$ ) que transforma ácido oleanólico a saponinas. Adicionalmente, se obtuvo el espectro de absorción de las saponinas semipurificadas y se confrontó con el extracto crudo de saponinas. Figura 35. Las primeras mostraron mayor pureza debido a un pico menos en su espectro de absorción.

#### **4.3.3.- Relación Sapogenina/azúcar. Ensayos de análisis de azúcares por cromatografía de gas.**

Por otro lado, se realizó paralelamente ensayos para analizar azúcares por cromatografía de gas, con la

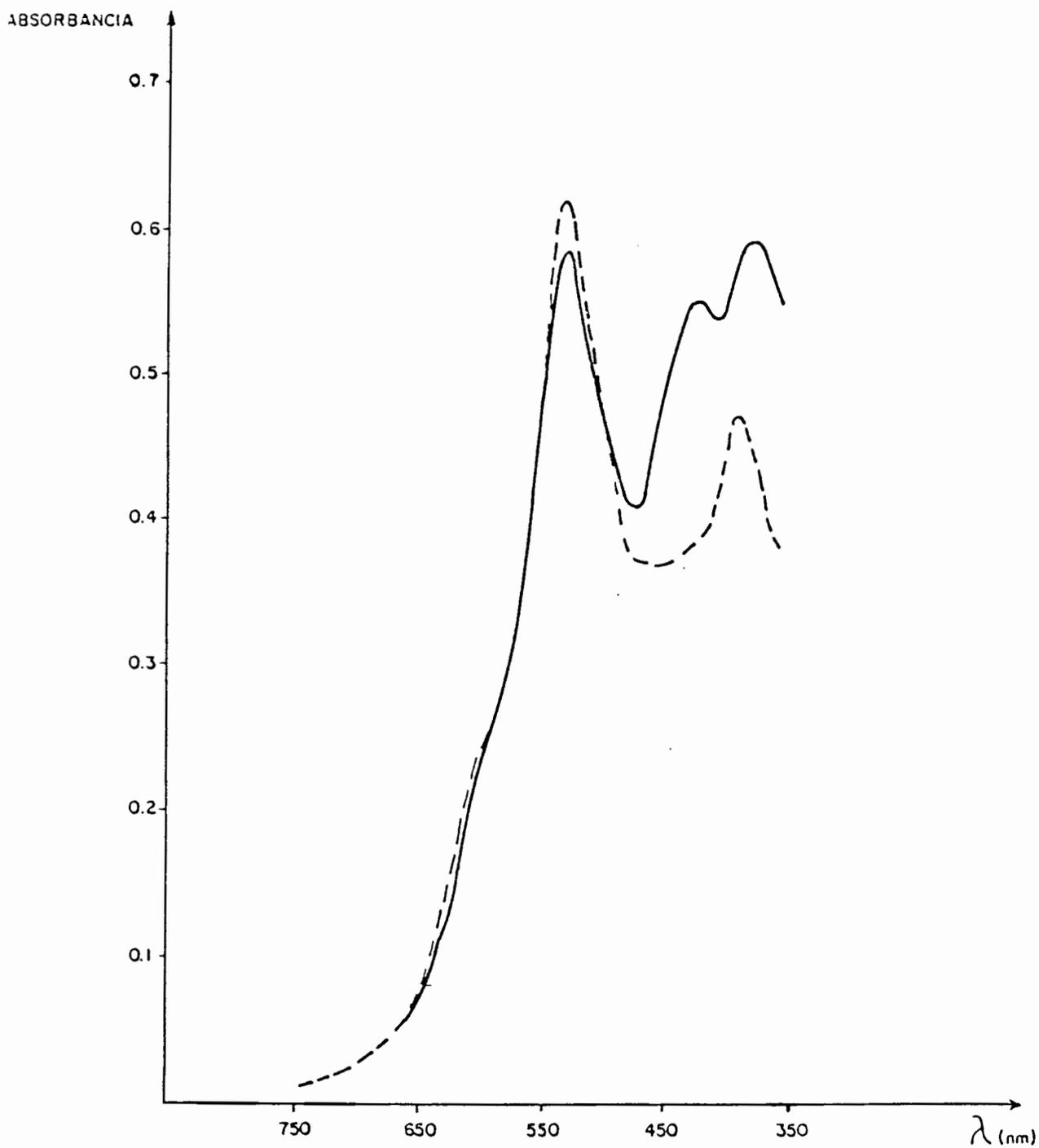


FIGURA 35 : ESPECTROS DE ABSORCION DEL EXTRATO CRUDO DE SAPONINAS DE QUINUA (—) Y DE SAPONINAS SEMIPURIFICADAS (---).

intención de elucidar la estructura de una saponina factible de aislar en ensayos futuros y hallar así la relación sapogenina/azúcar. Así, se trató glucosa standard con hidroxilamina hidrocioruro y la oxima resultante fué convertida a su trimetil silil eter para su posterior análisis gas cromatográfico (Apendice 3).

Para optimizar los resultados de los análisis que se efectuen en el cromatográfo de gas se determinó los flujos en función de la presión para el hidrógeno, aire y nitrógeno (Apendice 1) así como también se optimizó el flujo de hidrógeno (Apendice 2). Por otro lado se procedió a limpiar el detector una vez efectuado el análisis de compuestos silanizados, ya que frecuentemente se acumula Dioxido de Silicio cuando estos compuestos son inyectados al cromatógrafo de gas.

#### 4.3.4.- CONCLUSIONES

1º El método espectrofotométrico propuesto arroja un tenor porcentual de ácido oleanólico de  $0.286 \pm 0.027$  y presenta un error de 10.6% en defecto, respecto a la evaluación gas cromatográfica (0.32%).

2º La eliminación de impurezas del ácido oleanólico mediante la cromatografía en capa fina (TLC) preparativa salva el problema que presenta la falta de especificidad del reactivo de color.

3º La TLC ensayada puede ser también utilizada para obtener standard de ácido oleanólico.

4º El sistema de desarrollo ensayado cloroformo:

acetona: benceno (80:20:10;v/v) permitió una buena resolución.

5º Las saponinas semipurificadas obtenidas arrojaron un tenor de ácido oleanólico de 11.74%, siendo mayor que el obtenido por Augusto, 1979 (2.36%).

6º Aplicando el factor de transformación hallado tendríamos:

$$0.286 \times 8.5208 = 2.44\% \text{ de saponinas.}$$

## V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

1º En estudios de saponinas de quinua, no se recomienda el uso como standard de la saponina blanca Merck.

2º Para análisis cuantitativos de ácido oleanólico, se propone un lambda máximo de 527 nm y la elaboración de una curva de calibración en un rango de 60 a 480 microgramos (1.2 a 9.6 mgr/100ml).

3º Se determinó la absortibidad especifica para el ácido oleanólico:  $E_{1\%}^{1\text{cm}}_{527\text{nm}}=67.80$ . Esta absortibidad especifica permite las cuantificaciones futuras sin necesidad de standard, presentando así el método espectrofotométrico una gran ventaja respecto al gas cromatográfico.

4º El flujo de Augusto(1979), ofrece la mayor recuperación de ácido oleanólico (0.32%).

5º El ácido oleanólico constituye un 82.04% de las sapogeninas totales. Este resultado es similar al obtenido por Augusto, 1979 (79.5%).

6º Se determinó la relación:

ácido oleanólico  $\times$  1.2189 = sapogeninas.

7º El método espectrofotométrico propuesto arroja un tenor porcentual de ácido oleanólico de  $0.286 \pm 0.027$  y presenta un error de 10.6% en defecto, respecto a la evaluación gas cromatográfica (0.32%)

8º La limpieza del ácido oleanólico mediante la

cromatografía en capa fina (TLC) preparativa salva el problema que presenta la falta de especificidad del reactivo de color de Lieberman Burchard modificado.

9º La TLC ensayada puede también ser usada para la obtención de standard de ácido oleanólico.

10º El sistema de desarrollo ensayado, cloroformo: acetona: benceno (80:20:10 v/v) permitió una buena resolución.

11º Las saponinas semipurificadas obtenidas arrojaron un tenor de ácido oleanólico de 11.74%, siendo mayor que el obtenido por Augusto, 1979 (2.36%)

12º Aplicando el factor de transformación hallado tendríamos:

$$0.286 \times 8.5208 = 2.44\% \text{ de saponinas.}$$

## VI BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR, R.; GUEVARA, L.; ALVAREZ, J.(1979). Un nuevo método para la determinación cuantitativa de saponinas y su aplicación a diversas variedades de quinua peruana. Acta Cient. Venezolana 30:167-171.
- AUGUSTO RUIZ, W. Estudio cromatografico des saponinas da quinua (Chenopodium quinoa, Willd; variedad kancolla) Tese Mestrado, FFAA-UNICAMP, Campinas, S.P. Brasil. 1979, 135 págs.
- APPLIED SCIENCE LABORATORIES, INCORPORATED. P.O. Box 440, State College, Pa. 16801 (1977), Catalog. 146 pág.
- BASU, N. and RASTOGI, R. (1967) Triterpenoid saponins and sapogenins. Phytoch, 6(9):1249.
- BIRK Y. "Saponins", in: Toxic Constituents of Plants foodstuffs. I. E. Liener, Ac. Press. 1969, pp. 169-210.
- BURNOUF-RADOSEVITCH, M. et PAUPARDIN C. (1983). Elaboration de saponines triterpéniques par des tissus de Chenopodium quinoa Willd., C.R. Acad. Sc. Paris; 296-:429-432.
- BURNOUF-RADOSEVITCH, M. and DELFEL, N.(1984). High-performance liquid chromatography of oleanane type triterpenes. Journal of chromatography, 292:403-409.
- CARBAJO, G. La quinua y su valor nutritivo. En: Curso de Quinoa. Fondo Simón Bolívar, Ministerio de Alimentación, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Universidad Nacional Técnica del Altiplano. Lima-Perú. 1977.

**CARDOZO, A. (1976).** La quinua y los requisitos como alimento animal. Primera Reunión Binacional sobre Planificación de la Producción de Quinua en Colombia Ecuador, Min. Salud Pública, Pasto, Colombia.

**CARDOZO, A. y TAPIA M.** Valor Nutritivo. En: Quinua y Kañiwa, cultivos andinos, Tapia et al. CIID-IICA. 1979.

**CARREA, G.** El Cultivo de la Quinua y de la Cañigua en el Departamento de Puno. Escuela Nacional de Agricultura (ENA). Tesis ENA Lima, Perú. 1953.

**CORNEJO, G. (1976).** Estructura anatómica de la quinua II. Con. Int. Quen., Potosí, Bolivia, IICA.

**CUNDIF, R. (1964).** Spectrophotometric determination of Glycyrrhizic acid in Licorice extrac. Anal. Chem, 36(9): 1871.

**DE BRUIN, A. (1964).** Investigation of the food value of quinoa and cañihua seed. J. Food Sci., 29:872-876.

**DOMINGUEZ, X.** Métodos de Investigación Fitoquímica, Centro Regional de Ayuda Técnica, AID, Mexico. 1973.

**ELMER, E. (1942).** Quinoa-Chenopodium quinoa. Chem. Abstr. 39:2582.

**GANDARILLAS H.** Producción de Quinua en Bolivia. En: Procesamiento de la Quinua. Memoria de la Mesa Redonda Internacional, sobre Procesamiento de la Quinua. Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria IBTA-FAO 1983.

**GANDARILLAS H.** Botánica. En: Quinua y Kañiwa, cultivos andinos. Tapia, M. et al; Centro Interamericano de Investigaciones para el Desarrollo (CIID)-IICA 1979.

**GENKINA, G. et. al. (1977).** Spectrophotometry of glycosides of oleanolic acid and hederagenin concentrated sulfuric acid. Institute of the Chemistry of Plant Substances, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, tashkent. Translated from khimiya Prirodnikh Soedinenii; №2, pp. 220-227.

**GESTETNER, B.; ISHAAYA, I.; BIRK Y. and BONDI, A. (1963)** Soybean Saponins. III. Fractionation and characterization. Israel J. Chem., Vol. 1, 460-467.

**GESTETNER, B.; BIRK, Y., BONDI, A. and TENCER, Y. (1966)** Soya, Bean saponins VII. A. Method for the determination of sapogenin and saponin contents in soya beans. Phytochemistry, Vol. 5, pp. 803 to 806.

**GROMOVA, A. S. et al. (1981).** Triterpenoid saponin from *Thalictrum minus*. L. Chem. Abstr., 95:183889a.

**HONERLAGEN, V. H. and TRETTER, H. (1979).** Zur routinemäßigen quantitativen gesamt-saponin bestimmung in Radix Ginseng Panax und extrakten. Deutsche Apotheker Zeitung, 119 (38):1483-6.

**HUAYUAN, YANG et al (1981).** Quantitative determination of ginseng saponins in shengmai injection. Chemical Abstr., 95:192465 m.

**JUNGE, I. (1973).** Lupine and quinoa Lab. Bioeng Univ. Concepción, Chile.

**KADOTA, SATOMI, UCHIDA, YOSHIHIRO (1981).** Saikosaponins from *Bupleurum*. Chem. Abst. 95:156574 n.

**KERNAN, J.; COXWORTH, E. and FLEMING, S. (1973).** Micro-determination of triterpene sapogenin content of kochia

scoparia seed using gas-liquid chromatography. J. Agr. Food Chem., 21(2):232.

KERNAN, J. (1984). Flujo para la obtención de ácido oleanólico a partir de kochia. Comunicación personal.

KOCHETKOV, N, JORLIN A., VASIKOVSKY V. y ZHVIRBLIS V.E. (1961). Saponinas de las raíces de Aralia Manschuria. Zhur Obshechi Khim Moscow (Ruso) 31,658-665.

LARRY, D; FULLER, M. and HARRIL, P. (1970). Quantitation of ammonium glycyrrhizinate by gas-liquid chromatography of the silyl ether ester derivative of aglicone. J.A.O.A.C. , 53(4):698.

LINN, O. El valor nutritivo de la quinua. En: Procesamiento de la quinua. IBTA-FAO. 1983.

LUBSEN, C. (1918). Chemical examination of seeds of Ch. quinoa. Chem. Abstr., 12:2390.

MAZZOCCO Y RIETTI (1941). Composición química y valor nutritivo de algunos alimentos sudamericanos. Bol Soc. Química Perú. VII (2):61.

MERCK and Co., Inc. Rahway; N.J., U.S.A. The Merck Index, eight edition (1968), 1713 pp.

NARREA, R. (1976). Cultivo de la Quinua. Bol. Nº5 Min. de Alimentación, Perú.

PASICH, V.B. (1963). Absorptiometrische bestimmungsmethoden des saponingehalts in pflanzen material. Planta Med., 11:16-22.

PIERCE, CHEMICAL COMPANY P.O. Box 117. Rockford, IL 61105. USA. Handbook and General Catalog (1983), 224 pags.

- RIVERO, M. (1941). La quinoa, Cha. Quin., 63(6):703.
- ROMERO, A. Políticas de desarrollo de la producción, agroindustrialización, comercio y consumo de la quinua. En: Procesamiento de la Quinoa. Memoria de la Mesa Redonda Internacional sobre Procesamiento de la Quinoa. Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria IBTA - FAO. 1983.
- ROMERO, M. Posibilidades de incremento de la producción de quinua en la sierra central y norte del Perú. En: Procesamiento de la Quinoa. Memoria de la mesa Redonda Internacional sobre Procesamiento de la Quinoa. IBTA-FAO 1983.
- SEGAL R., MANSOUR M. and ZAITSCHEK D. (1966) Effect of ester groups on the haemolytic action of some saponins and sapogenins. Biochemical Pharmacology, 15:1411-1416.
- SEGAL R., MILO-GOLDZWEIG I., SCHUPPER H. and ZAITSCHEK D. (1970). Effect of ester groups on the haemolytic action of sapogenins. II. Biochemical Pharmacology; 19:2501-2507.
- SIMONSEN, J.; ROSS, W.C.J. The Terpenes Vol. 5 (University Press. Cambridge, 1957), p. 221-285.
- SNEDECOR, G; COCHRAN, W. Métodos Estadísticos (Compañía Editorial Continental S.A. CECSA, 1971) 703 pp.
- VILDOSO, L. (1976). La Quinoa-Problemas Agronómicos en Potosí. II Conv. Inter. Quen, Potosí Bolivia, IICA.
- YANEZ, E. e IVANOVIC D. La Producción e Industria de la quinua en Chile. En : Procesamiento de la quinua. IBTA-FAO. 1983.

ZAVALETA, R.; VERA, C.; TELLERIA, M Y SALAZAR, H. Estudio de tecnología de desamargado de quinua y análisis de saponinas. Proyectos de Desarrollo Tecnológico en el Area de Alimentos. Ministerio de Planeamiento y Coordinación y Junta del Acuerdo de Cartagena. La Paz Bolivia. Pag. 9 a 29, 1982, 185 págs.

VII.- APENDICESAPENDICE 1

Determinación de los flujos F(ml/min.) en función de la presión P(lbr/pulg.<sup>2</sup>) en el cromatógrafo de gas. Curvas de aire, hidrógeno y nitrógeno.

1º ANTECEDENTES.

La literatura que trata sobre cromatografía de gas, generalmente reporta flujo, en ml/min.; pero en el equipo sólo se puede obtener directamente valores de presión, en lbr/pulg.<sup>2</sup> mediante el manómetro del equipo (psig). El flujo se puede obtener a través del medidor de flujo "Bubble- o -Meter" el cual es un dispositivo sencillo de vidrio que se conecta a los conductos; pero esta medición es menos práctica.

El flujo está determinado por la columna, longitud de los conductos, temperatura, etc. Cada columna arrojará pérdida de carga diferentes en función a la densidad de relleno que tenga, así mismo, al variar la temperatura, también varía el flujo.

La columna que se utilizó fue la 3%SE-30 Chrom W-AW-DMCS 80/100, de vidrio, de 6' de largo x 2mm de diámetro interno. La temperatura fue ambiental (equipo apagado) Equipo: Cromatógrafo de gas marca Perkin Elmer, modelo 3920, detector FID.

**2º OBJETIVO.**

Mediante curvas o ecuaciones, deducir los flujos a los cuales se encuentra c/u de los gases, cuando se tiene datos de presión manométricos.

**3º PROCEDIMIENTO.**

Para hallar las curvas de los tres gases mencionados anteriormente, se procedió de sgte. modo: el Bubble - o -Meter se conectó a un dispositivo del detector, el DETECTOR CAP, y para cada presión manométrica (A), se determinó el tiempo (B) que tarda la burbuja en recorrer un volumen determinado, que puede ser de 1,10 ó 100 ml. Con los valores de tiempo y volumen y con ayuda del gráfico NOMOGRAPH se obtiene los valores de flujo (C), en el ml/min.

Ejemplo: para el hidrógeno, se obtuvo los sgtes. valores:

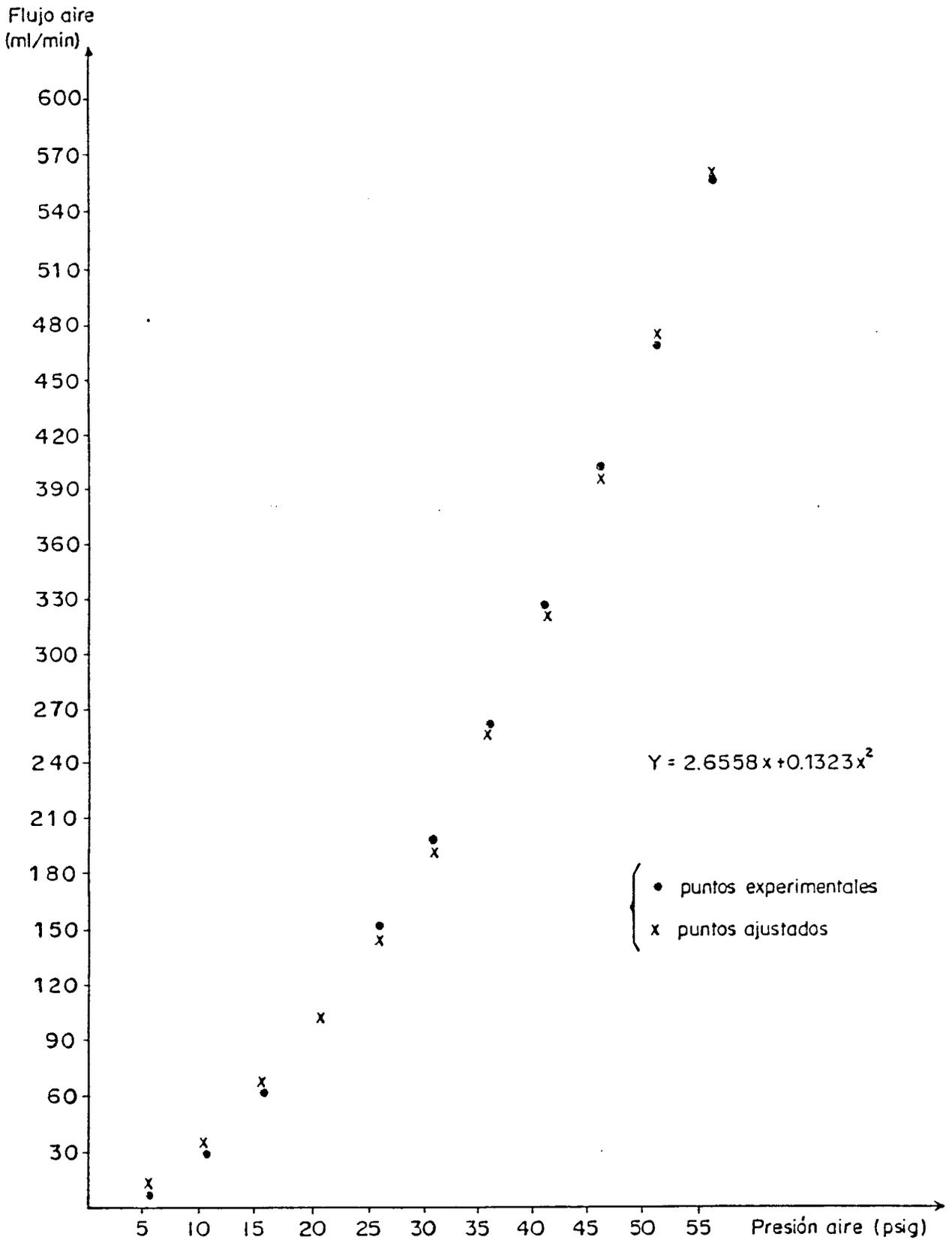
A	Presión (psig)	5	10	15	20	25	30	35	40
B	Tiempo que demora la burbuja en recorrer un volumen	26.3	6.8	2.93	1.81	1.25	0.93	0.73	0.61
C	Flujo (ml/min)	2.3	9.0	20.5	32.0	46.0	62.0	78.0	94.0

Se obtuvo una buena correlación al ajustar una parábola mediante los mínimos cuadrados, de la forma  $Y = a_0 + a_1x + a_2x^2$ , haciendo  $a_0 = 0$  ya que pasa por el origen.

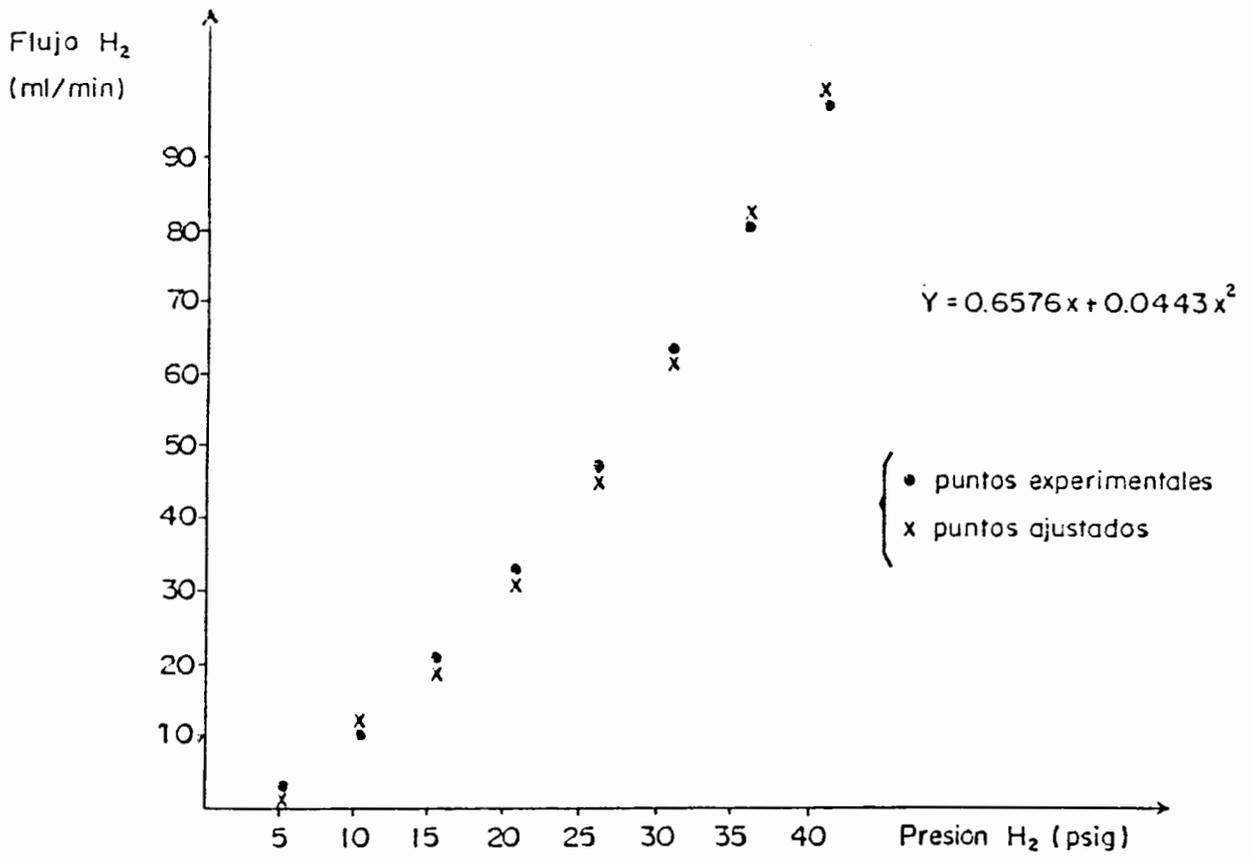
$$\Sigma Y = a_1 \Sigma X + a_2 \Sigma X^2$$

$$\Sigma XY = a_1 \Sigma X^2 + a_2 \Sigma X^3$$

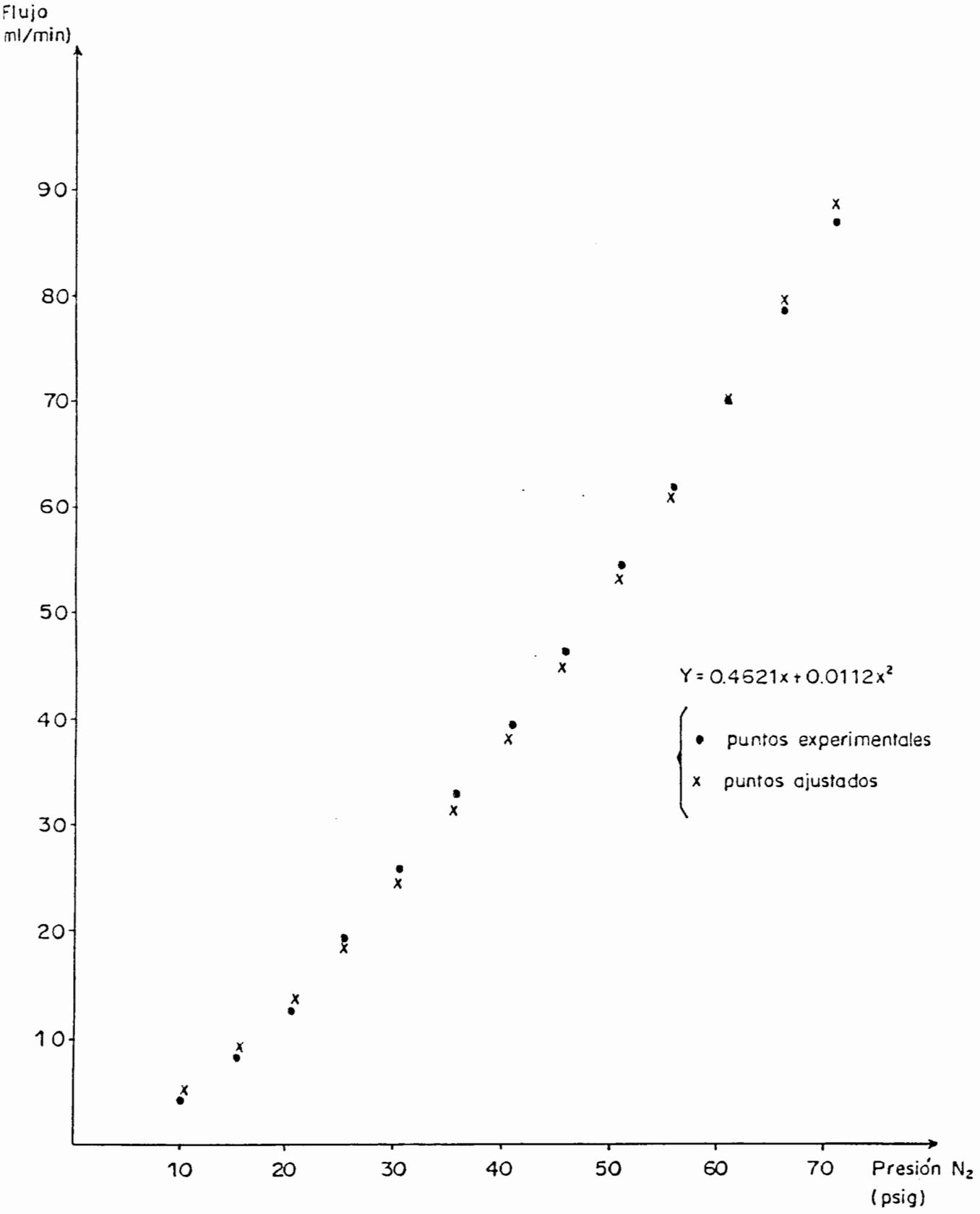
$$\Sigma X^2 Y = a_1 \Sigma X^3 + a_2 \Sigma X^4$$



Flujo de aire en función de la presión de ingreso.



Flujo de hidrógeno en función de la presión de ingreso



Flujo de Nitrógeno en función de la presión de ingreso

## APENDICE 2

### Optimización del flujo de hidrógeno en el detector de ionización de llama(FID) del cromatógrafo de gas.

#### ANTECEDENTES.

Para cualquier flujo dado en el gas de arrastre, hay una velocidad de flujo óptima de hidrógeno y de aire para el Detector de Ionización de Llama al cual la sensibilidad y la linealidad del detector están a un máximo.

La velocidad de flujo óptima para el hidrógeno, está en el punto de máxima respuesta del detector. La velocidad de flujo óptima para el aire en el FID según el manual es 550 ml/min. aprox. y para el equipo en el cual estamos trabajando: Cromatógrafo de gas Perkin Elmer, serie 3920.

#### PROCEDIMIENTO.

Variando las velocidades de flujo del hidrógeno se obtuvo diferentes respuestas del detector, encontrándose la máxima respuesta a 30.9 ml/min. (20 psig) aproximadamente. Previamente se había colocado los flujos de aire y nitrógeno a 546.3 y 23.9ml/min respectivamente. La curva típica que aparece en estos casos es muy similar a la obtenida.

APENDICE 3Análisis de azúcares por cromatografía de gas(GC).**1º Alcances del Método:**

Se puede obtener resultados cuantitativos y reproducibles. Se puede analizar mezclas que contengan de 20 a 30% de agua, esto es ventajoso si tenemos en cuenta que generalmente en este tipo de análisis, las reacciones de silanización se realizan en condiciones estrictamente anhidras.

Se puede analizar jarabes de azúcares, hidrolizados de celulosa (madera) y almidón (maíz) y en general productos fermentecibles para un control en proceso de producción de alcohol.

Así mismo, podría ser utilizado en la elucidación de la estructura de glicósidos, previa hidrólisis. También, disponiendo de estándares, no sólo se podría analizar monosacáridos, sino también disacáridos.

**2º FUNDAMENTO:**

Ha sido establecido que los azúcares pueden ser convertidos cuantitativamente a sus TMS-eteres; pero la mayor dificultad radica en que cada monosacárido libera una mezcla conteniendo anómeros alfa y beta de piranósidos y furanósidos, esto trae como consecuencia no sólo problemas de resolución, sino también, la necesidad de analizar varios picos. Esta dificultad puede ser salva-

da cuando los azúcares son tratados con hidroxilamina hidrocioruro y las oximas resultantes son convertidas a sus trimetil silil éteres.

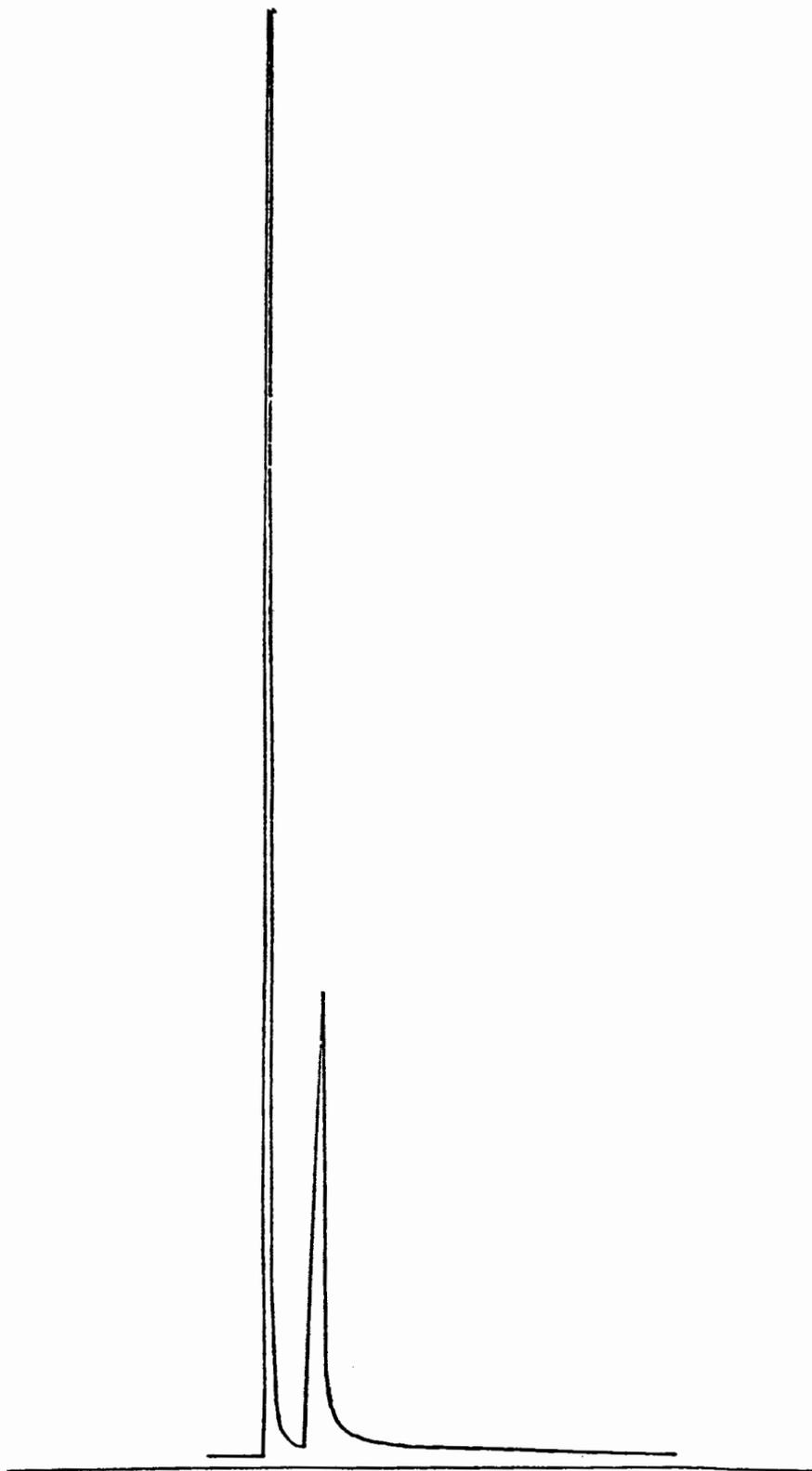
### 3º PROCEDIMIENTO.

La glucosa fue tratada con Hidroxilamina hidrocioruro y la oxima resultante fue convertida a su TMS-eter por adición de Trimetil-sililimidazol TMSI. La Glucosa y la Hidroxilamina hidrocioruro fueron solubilizadas en piridina previamente destilada con  $K(OH)$ . Se inyectó 0.2 microlitros sobre una columna de vidrio de 6'x 1/4" O.D. empaquetada con 5% de SE-30 sobre Anakrom ABS, mesh 80/90. Gas de arrastre:  $N_2$ , 35ml/min. (18psig); hidrógeno: 21 psig; aire: 48 psig. Detector: FID. Velocidad de la carta 20 mm/min. Rango x 16, Atte. x 100. Temperatura de la columna: 125°C; inj.: 240°C; manifold: 260°C. Cromatógrafo de Gas Perkin Elmer, modelo 3920.

### 4º RESULTADOS Y DISCUSION.

El pico resultante es aceptable, se muestra en el cromatograma adjunto, con un tiempo de retención aproximado de 0.9 minutos.

El pico resultante podría mostrar un mejor perfil utilizando la columna recomendada por la literatura: 6'x 1/8" O.D. empaquetada con 2 a 3% de OV-17 sobre chromosorb W(HP) 80/100 mesh.



CROMATOGRAMA DEL TRIMETIL SILIL ETER  
DE LA OXIMA DE GLUCOSA, COLUMNA: 5% SE  
-30 SOBRE ANAKROM ABS.

APENDICE 4Limpieza del detector de ionización de llama (FID) del cromatógrafo de gas.

## ANTECEDENTES.

El equipo prendía difícilmente y presentaba variaciones muy significativas en la respuesta. La revisión de literatura informa de la posibilidad de acumulación de Dióxido de Silicio en el detector lo que obturaría el JET del FID.

Por lo anteriormente expuesto, se procedió a limpiar el detector.

## PROCEDIMIENTO.

Al desamblar el FID, se observó en el electrodo un polvillo blanco, semejante al descrito por la literatura, el cual también se encontraba en el JET obturando el canal de salida de los gases. El electrodo fue limpiado con una escobilla y posteriormente lavado con Metanol. Se intentó limpiar el JET "in situ", con un mondadien-tes y flujo de nitrógeno, lo que no dió resultado favorable, por lo que se procedió a cambiarlo por uno nuevo.

## RESULTADOS.

Con el JET nuevo del detector (FID), el equipo no mostraba dificultad al momento de ser prendido y los picos mostraban reproducibilidad.

## APENDICE 5: TERMINOS USADOS EN ESPECTROFOTOMETRIA

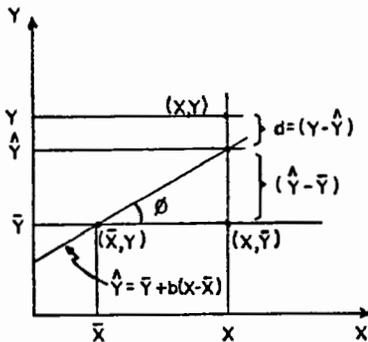
TERMINO	SIMBOLO	DEFINICION	OTROS NOMBRES	INTERPRETACION
Absorbancia	A	$A = \lg_{10} \frac{I_0}{I}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>• Logaritmo en base 10 de la relación de intensidad de la radiación incidente respecto a la transmitida.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Densidad óptica, extinción (E).</li> </ul>	
Absortibilidad	a	$a = \frac{A}{lc}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>• Absorbancia por unidad de concentración y longitud de celda. Donde:</li> <li>l = longitud del paso de absorción de la celda, cm.</li> <li>c = concentración, gr./litr.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coeficiente de extinción absorción específica, índice de absorbancia, <math>E_{1cm}^{1\%}</math>.</li> </ul>	
Cociente de absorción molar	E	$E = \frac{A}{c}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>• Absorbancia de una solución conteniendo 1 mol/litr.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coeficiente de extinción molar.</li> </ul>	
Ley de Lambert y Beer	—	$A = alc$ (1) <p>Es generalmente aplicable a concentraciones inferiores a <math>10^{-2}</math> mol/litr. Se recomienda hacer las lecturas en un rango de absorbancia de 0.1 a 0.7 (80 a 20% de T.)</p>	—	
Transmitancia	T	$T = \frac{I}{I_0}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>• Relación del poder radiante transmitido por la muestra respecto al poder radiante incidente sobre la muestra <math>A = \lg_{10} \frac{1}{T}</math> (donde T esta dada en tanto por uno).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transmisión</li> </ul>	

Cuando una luz monocromática de intensidad  $I_0$  incide sobre una sustancia ( contenida en una cubeta) experimenta una descomposición :  $I_0 = I_r + I_d + I_a$ , donde:  $I_r$  = reflejada,  $I_d$  = dispersada y  $I_a$  = absorbida. Tratándose de soluciones diluidas puede eliminarse  $I_r$  llevando a cabo una medida de comparación con disolvente puro bajo las mismas condiciones,  $I_d$  puede eliminarse procurando una absoluta claridad. El cociente  $\frac{I}{I_0}$  se llama transparencia, y el logaritmo decimal de su inversa,  $\log_{10} \frac{I_0}{I} = A$ , absorción.

**APENDICE 6: REGRESION LINEAL DE "Y" SOBRE "X" Y COEFICIENTE DE REGRESION**

$\hat{Y} = a + bx$  ----- ecuación de regresión  
 donde:

$$b = \frac{\sum_i (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_i (X_i - \bar{X})^2} = \frac{\sum XY - \frac{(\sum X)(\sum Y)}{n}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}} = \frac{SP \text{ de } XY}{SC \text{ de } X}$$
 ----- coeficiente de regresión  
 $a = \bar{Y} - b\bar{X}$  ----- término constante de regresión



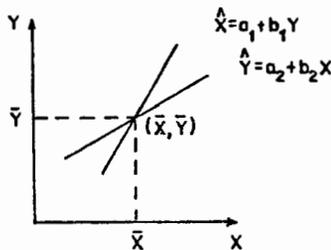
$$\text{tag } \phi = \frac{dY}{dX} = b = \frac{(\hat{Y} - \bar{Y})}{(X - \bar{X})}$$

$\hat{Y} = \bar{Y} + b(X - \bar{X})$  ecuac. de regresión

$$\hat{Y} = (\bar{Y} - b\bar{X}) + bX$$

$$\hat{Y} = a + bX$$

$\hat{Y}$  = "valor esperado" estimado mediante la ecuc. de regresión.



DEDUCCION DE FORMULAS :

$a = \bar{Y} + b\bar{X}$  (ya que a  $\bar{X}$  le corresponde  $\bar{Y}$ ) ----- ①

$\frac{d}{dx} \sum (Y - \hat{Y})^2 = 0$  (para que sea mínimo) ----- ②

$\hat{Y} = \bar{Y} + b(X - \bar{X})$  (del gráfico) ----- ③

$\hat{Y} = a + bx$  (de ① en ③) ----- ④

$\frac{d}{dx} \sum [(y - bx) - a]^2 = 0$  (de ④ en ②) ----- ⑤

$\sum (y - bx - a) = 0$  (derivando y eliminando términos) ----- ⑥

$\sum [(y - \bar{y}) - b(x - \bar{x})] = 0$  (de ① en ⑥) ----- ⑦

$b = \frac{\sum (y - \bar{y})(x - \bar{x})}{\sum (x - \bar{x})^2}$  (multiplicando ambos miembros por  $(x - \bar{x})$  y despejando "b")

$b = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$  Cuando pasa por el origen (haciendo  $a=0$  y multiplicando por "x" en ⑥).