UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS, FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES

CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE SAPONINAS EN VARIEDADES DE QUINUA REAL *(Chenopodium quinoa* Willd*)* POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS GC/MS

Por: Carolina Triguero Mamani **carot.m2209@gmail.com** cel:60610721

Tutor: PhD. Yonny Rene Flores Segura **flores.yonny@gmail.com** cel:70158009

Co-Tutora: PhD. Maribel Lozano Palacios **marhilp@gmail.com** cel:76219897

Año de la defensa: Agosto, 2021

CAPITULO 3

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó un método para la cuantificación de saponinas en semillas de quinua, mediante Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas (GC/MS), estableciendo un factor de conversión de sapogenina a saponina.

Para ello, se aisló e identificó las sapogeninas mayoritarias del Mojuelo de quinua, que fueron empleados como estándares, posteriormente mediante la reacción de sililación, se obtuvo derivados Trimetilsilil de cada sapogenina, a partir del cual se preparó soluciones estándar de diferentes concentraciones, que fueron analizados por GC/MS, se construye las curvas de calibración por regresión lineal mediante la relación del área bajo el pico versus la concentración.

Asimismo, se obtuvo los extractos de sapogeninas de las siete variedades de quinua, para ello una porción de semillas de quinua (10 g) fue sometido a diferentes extracciones con el fin de obtener un extracto rico en saponinas, el mismo fue empleado para la hidrólisis ácida, seguida de la reacción de derivatización, los derivados Trimetilsilil fueron analizados por GC/MS, y se determinó la concentración de Sapogeninas individuales a partir de la curva de calibración.

Adicionalmente se obtuvo un extracto purificado de saponinas, el mismo que permitió establecer la siguiente relación: %Saponina=8,471 x %Sapogenina.

El contenido de saponinas en las siete variedades de quinua se obtuvo a partir de la relación sapogenina a saponina, se determinó que el contenido de saponinas osciló entre 0,8 y 1,4 %, niveles muy elevados según lo establecido por la Norma Boliviana NB NA 0038 (< 0,12 %), por lo tanto, estas muestras de quinua requieren pasar por un proceso de beneficiado, para cumplir los requisitos calidad.

CAPITULO 4

1. INTRODUCCIÓN

La Quinua es un cultivo originario de las zonas altas de los Andes en América del Sur, donde Bolivia es uno de los países considerado como centro de origen y domesticación, por tener la mayor diversidad genética (Gandarillas,1979), todavía es producida predominantemente por agricultores tradicionales y asociaciones en las tierras altas de los Andes, Bolivia y Perú son los mayores productores mundiales de quinua, junto con Ecuador (IBCE, 2021)

Se cultiva ampliamente bajo condiciones muy adversas en el Altiplano Boliviano, que comprende terrenos habitados entre los 2500 hasta 4000 m.s.n.m, con baja temperatura de hasta -4ºC y una humedad relativa del 40% (Aroni,2020)**,** bajo estas condiciones y debido al alto estrés ambiental, se genera como mecanismo de defensa diversos metabolitos secundarios entre ellos se encuentra las saponinas (Lozano,2014).

Químicamente las saponinas son una mezcla compleja de glucósidos triterpenicos que consisten en un oligosacárido hidrofilico enlazado a la aglicona hidrofóbica, estudios previos han identificado agliconas mayoritarias de la quinua, Ácido oleanólico, ácido serjanico, hederagenina, y ácido fitolacagénico (Lozano et al.,2013; Medina et al.,2016).

Las saponinas son el principal factor anti nutricional de las semillas de quinua, se encuentran en la cáscara del grano y son las responsables del sabor amargo. Su contenido permite distinguir las variedades de quinua (Gómez et al.,2014).

Por esta razón la quinua previa, a consumo debe pasar por un proceso de “beneficiado”, que consiste en la eliminación del pericarpio del grano mediante dos procesos: el primero se basa en la fricción de los granos por acción mecánica (escarificado), y el segundo es un proceso de lavado con agua para eliminar el epispermo restante (Lozano,2014).

El contendido de saponina varía de acuerdo con el ecotipo, entre 0-3 % p/p en granos secos, granos muy amargos se clasifican entre 1 a 3%, granos de contenido medio entre 0,1 y 1% y variedades dulces de 0,0 a 0,1% (Candia & Olaguivel, 2016).

Por otro lado, existen varios estudios sobre la separación y aislamiento de saponinas en quinua, asi como cuantificación utilizando técnicas Cromatografía Liquida de alta resolución HPLC, métodos semi-cuantitativos de espuma, capacidad para formar complejos con los esteroles de los eritrocitos de la sangre, ensayo hemolítico, métodos Colorimétricos. En los que se existe un continuo interés en la implementación de métodos más precisos y rápidos

para la cuantificación de saponinas en quinua. En el presente trabajo se realizará la evaluación del contenido de saponinas en variedades de quinua real, mediante la implementación de un método por Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas (GC/MS).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Origen e importancia de la Quinua

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd*)*, originaria de la región andina Sudamericana, es una especie perteneciente a la familia *Amaranthaceae,* originaria de la región Sur de América, principalmente de países como Perú, Ecuador, Chile, Bolivia y Colombia, caracterizada por ser la base económica, social y alimentaria de pueblos indígenas desde hace 2000 años a.C. (Andrews, 2017).

Los grandes conglomerados humanos asentados en las estribaciones de la Cordillera de los Andes valoran su importancia por tres razones: 1) Rusticidad del cultivo (es posible cultivarla en terrenos no aptos para otros cultivos, además no requiere de sofisticada tecnología para la siembra, cuidados culturales y cosecha); 2) Capacidad de resistir y/o tolerar condiciones climáticas adversas (sequias, heladas, radiaciones solares intensas, temperaturas altas y bajas, otros), 3) Alto valor nutritivo (dado su alto contenido de proteínas, pero fundamentalmente la calidad de estas) (Rea, 1979).

La quinua se ha convertido en una de las principales estrategias agroalimentarias de diferentes regiones del mundo, dado su contenido de proteína de 12-21 % (Comai et al.,2007), grasa de 2-9,5 % (Garcia et al.,2018) y fibra de 8,8-14,1 % (Navruz et al.,2016), así como a la presencia de todos los aminoácidos esenciales y la ausencia de gluten (Nowak et al.,2016), además de expresar buenos resultados de adaptabilidad a condiciones extremas de clima y suelo, lo que ha permitido colonizar zonas improductivas (Carrasco, 2016).

Asimismo, la quinua se ha clasificado en variedades dulces y amargas, de acuerdo al contenido de saponinas (Vega et al.,2010).

2.2. Producción de quinua a nivel Mundial

Durante el periodo 2015-2019, Perú es el principal exportador de quinua a nivel mundial, habiendo exportado anualmente un valor promedio aproximado de US$ 125,0 millones, seguido de Bolivia (US$ 89,2 millones) y Países Bajos (US$ 16,0 millones). Cabe señalar en el caso de este último país, este constituye un exportador que redistribuye a los principales distribuidores de otros países de Europa.

En Bolivia las exportaciones de quinua durante el 2020 alcanzaron un total de 92 millones de dólares equivalentes a 37,7 mil toneladas, asimismo las ventas de quinua al exterior para los 3 primeros meses del 2021 totalizaron poco más de 16 millones de dólares por poco más de 7 mil toneladas del producto (IBCE, 2021).

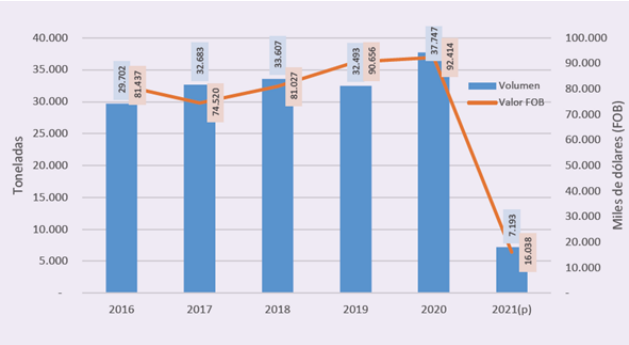


Figura 1. Exportaciones de quinua en Bolivia, 2016-2021(p), expresado en volumen (toneladas) y valor FOB (miles de dólares).

Fuente: INE; Instituto Boliviano de Comercio Exterior, 2021.

Las exportaciones de quinua, a pesar de haber tenido una tasa de crecimiento baja, resalta la diversificación y alcance que el producto boliviano ha podido ingresar en al menos 60 países del mundo. Los 10 principales países de destino de la quinua representan el 93% del total exportado en el 2020, siendo Estados Unidos el principal destino, donde las ventas de 44 millones de dólares por 18 mil toneladas a este país crecieron en 13% en valor y 28% en volumen comparado al 2019; asimismo, las ventas a Alemania, Países Bajos, Canadá, Italia y Bélgica principalmente también se mostraron crecientes entre este periodo (IBCE, 2021).

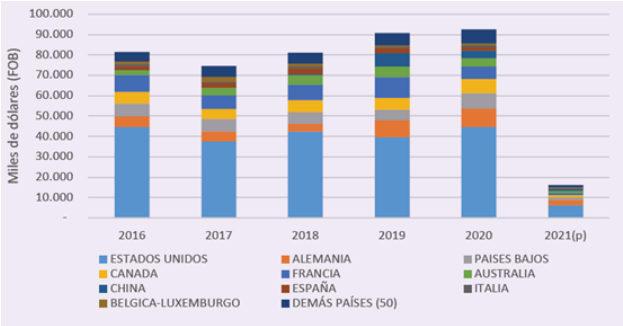


Figura 2. Exportadores de Quinua, 2016-2021(p) expresado en FOB (miles de dólares).

Fuente: IBCE, 2021.

2.3. Producción de quinua en Bolivia

En Bolivia se registró más de 67 mil toneladas de producción de quinua en el 2019, habiendo mostrado un decrecimiento del 4% comparado al 2018, dentro de una superficie de cultivo de

116 mil hectáreas. En el cual casi el 85% de la producción proviene de los Departamentos de Oruro y Potosí. Se registró una disminución, consecuencia del cambio climático habiendo zonas con bastante sequía, una falta de implementación tecnificada para la siembra y cosecha, y una disminución de los precios internacionales desincentivando esfuerzos en incrementar la producción (IBCE, 2021).

Por otro lado, Bolivia se mantiene líder del mercado internacional en cuanto a producción de Quinua Real y productor de quinua orgánica, factores destacables en el mercado internacional. En el 2020, se obtuvo el reconocimiento de declaración de "Marca de Certificación" para la "Quinua Real del Altiplano Sur de Bolivia" para la protección de las Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas, designando a la quinua Real un producto originario de Bolivia, a fin de diferenciar y promocionar a los productores y actores involucrados de la cadena productiva, para que puedan obtener mejores precios, ingresar a mercados internacionales (IBCE, 2021).

2.4. Aspectos botánicos

2.4.1. Descripción botánica de la planta de Quinua

La quinua es una planta herbácea de crecimiento anual, llegando a medir entre 0,30 a 3,0 metros de altura dependiendo de las condiciones medioambientales y genotipo. de las condiciones ambientales donde crece y de la fertilidad de los suelos (FAO & la Alimentación UNA, 2001).

Según (Tapia, 1997) la quinua es una planta de tamaño muy variable, según los ecotipos, las razas y medio ecológico donde se cultiven, describen a la quinua de la siguiente forma:

- **Raíz**: Es pivotante, vigorosa, llegando a tener una profundidad de 0,5 a 2,8 m, bastante ramificada y fibrosa, la cual posiblemente le de resistencia a la sequía y buena estabilidad a la planta.
- **Tallo:** La altura del tallo puede variar según la variedad que va desde 0,5 hasta 2,0 m, el color puede ser verde, verde con axilas coloreadas, verde con rayas coloreadas o púrpuras, o completamente rojo.
- **Hojas:** Las hojas son alternas y de carácter polimorfo por que las hojas basales son romboidales, mientras las hojas superiores, alrededor de la inflorescencia son lanceoladas, son dentadas en el borde, la coloración varía de verde a rojo con diferentes tonalidades, las hojas inferiores pueden medir hasta 15 cm de largo y 12 cm de ancho.

- **Inflorescencia:** La inflorescencia es una panoja típica, constituida por un eje central, secundario, terciario y pedicelos que sostienen a los glomérulos, así como la disposición de las flores, puede ser laxa (Amarantiforme) o compacta (Glomerulada).
- **Flores:** Son pequeñas, incompletas, sésiles y desprovistas de pétalos, pueden ser hermafroditas, pistiladas (femeninas) y androestériles.
- **Fruto:** El fruto de la quinua es un aquenio; el perigonio cubre una sola semilla y se desprende con facilidad al frotarlo. A su vez la semilla está envuelta por un epispermo casi adherido.

Figura 3. Quinua Real (*Chenopodium Quinoa* Willd).

Fuente: http://laquinua.blogspot.com/2014/04/panoja-amarantiforme-de-quinua -real.html

2.5. Taxonomía

Tabla 1. Descripción taxonómica de la Planta.

Reino	**Vegetal**
División	Fanerógamas
Clase	Dicotiledoneas
Orden	Angiospermas
Familia	Chenopodiaceas
Género	*Chenopodium*
Sección	Chenopodia
Especie	*Chenopodium quinoa,* Willd

Fuente: Mujica, 2002.

2.6. Propiedades nutricionales

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2011).

Tabla 2. Propiedades Nutricionales de la Quinua.

VALOR NUTRICIONAL	
Análisis físico/químico (g/100 g de muestra)	
Humedad (%)	8,44
Proteínas (%)	16,19
Fibra (%)	1,84
Cenizas (%)	2,00
Grasa (%)	5,20
ELN (%)	66,33
Energía (kcal/100g)	372,1

Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

La quinua es una excelente fuente de proteínas, además de contener lípidos e hidratos de carbono, dado que el embrión ocupa una mayor proporción de la semilla, en comparación a otros cereales comunes, además sus contenidos grasos estan libres de colesterol.

A diferencia de otros cereales la quinua garantiza la cobertura completa de los requerimientos alimenticios diarios, debido a la presencia elevada aminoácidos como la metionina, treonina, lisina y triptófano, ya que los mismos son limitados (IICA, 2020).

2.7. Saponinas

Las saponinas son una clase de metabolitos secundarios de elevado peso molecular (600 a 2000 Da) (Makkar et al.,2007). Son un grupo de glucósidos amorfos coloidales hidrosolubles que producen espuma cuando se agitan la solución acuosa y son excelentes emulsionantes, tienen un sabor acre y en polvo producen estornudo. Muchos de estos glucósidos tienen la fórmula general $(C_nH_{2n-8}O_{10})$. Por lo general, las saponinas ejercen una acción hemolítica sobre los eritrocitos (Gennaro, 2003).

Se sintetiza a partir de la biosíntesis de ácido acético que se transforma en ácido mevalónico, tras pasar a farnecil pirofosfato y formar una molécula de escualento, que es capaz de convertirse en una sapogenina triterpénica o sapogenina esteroidal (Szakiel et al.,2011), es así como la estructura de compuestos sapogénicos se encuentra constituido de una molécula de aglicona unida mediante un enlace glucosídico a un azúcar figura 4, (Ahumada et al.,2016) generando cerca de treinta diferentes saponinas que son construidas mediante la combinación de azúcares y agliconas presentes en tallos, hojas, semillas, panojas y flores, e influenciadas por las condiciones de suelo y clima, que son determinantes de la cantidad de estos compuestos y que permiten la adaptabilidad a factores bióticos y abióticos (Apaza et al.,2016).

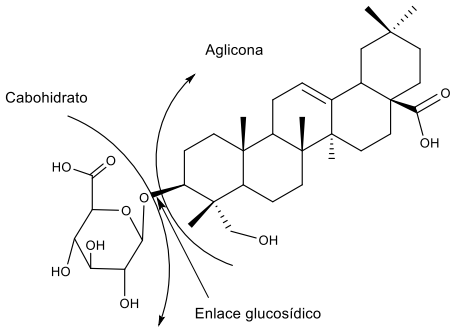


Figura 4. Estructura general de una Saponina.

Fuente: Ahumada et al.,2016.

Dentro de sus usos y propiedades, en estado puro la mayor parte glucósidos conocidos son incoloros o blancos, tienen actividad óptica y son solubles en alcohol, diluido o no (Gennaro, 2003). Tienen una gran importancia por sus actividades biológicas como: antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria, analgésicas, antiulcerante, cicatrizante, citotoxicidad, espasmolítica y expectorante (Romo, 2006).

2.7.1. Clasificación de las saponinas

Las saponinas estructuralmente están constituidas por un anillo terpenoide o esteroidal, conocidos como aglicona o sapogenina, considerado como la parte apolar de la molécula; la aglicona, se encuentra sustituido por oligosacáridos a través de enlaces glucosídicos que les confieren un carácter anfifílico, considerado como la parte polar de la molécula (Heng et al.,2006).

Se clasifican de acuerdo al tipo de agliconas que conforman como:

a) Glicósidos triterpénicos
b) Glicósidos esteroidales
c) Glicósidos alcaloidicos esteroidales (Hostettamann & Marston, 1995)

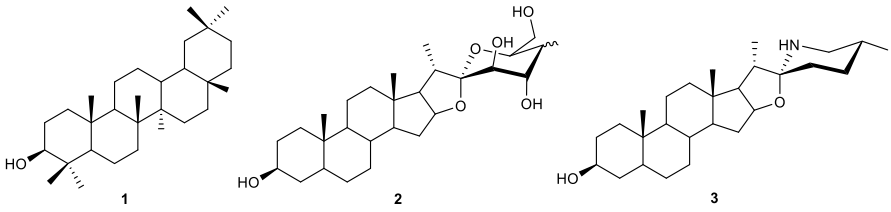
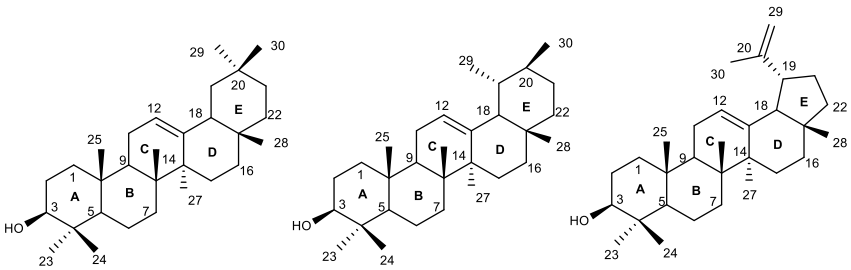


Figura 5. Tipos de esqueletos de agliconas 1) Glicósidos triterpénicos, 2) Glicósidos Esteroidales y 3) Glicósidos alcaloídicos esteroidales.

Fuente: Hostettamann & Marston, 1995.

2.7.2. Saponinas triterpenicas

Las saponinas triterpénicas están caracterizadas por tener como sapogenina un triterpeno pentacíclico y se dividen en tres grupos principales dependiendo del tipo de esqueleto: Oleanano, que presentan un esqueleto β–amirin, con dos grupos metilo en el carbono C–20; Ursanos, que presentan un esqueleto α–amirin con un metilo en el carbono C–20 y otro en el carbono C–19 y Lupanos, que presentan un esqueleto tipo Lupeol que difiere de los otros dos en la estereoquímica trans entre los anillos D/E, además que el anillo E es pentacíclico y no hexagonal como en los otros casos (Connolly, 1989). Las saponinas del tipo β–amirin (oleananos) y α–amirin (ursanos) presentan una estereoquímica en los anillos A/B, B/C y C/D trans; y entre D/E cis (Simões, 2001).



β-Amirin tipo Oleanano **α-Amirin tipo Ursano** **Lupeol tipo lupano**

Figura 6. Estructuras de triterpenos pentacíclicos.

Fuente: Flores, 2013.

Las saponinas triterpénicas tienen en común la unión de una o más cadenas de azúcar en diferentes posiciones de la aglicona y de acuerdo con el número de sustituciones, se pueden encontrar agliconas mono, di o triglicosiladas, También denominadas mono, di o tridesmosídicas.

Las monodesmosídicas tienen un oligosacárido unido al C-3; las bidesmosídicas tienen dos cadenas de carbohidratos, uno de ellos unido mediante un enlace éter al C-3, y el otro unido a través de un enlace éster al C-28, en el caso de las saponinas triterpénicas; y las tridesmosídicas que contienen tres cadenas de azúcares. Los oligosacáridos enlazados principalmente son pentosas, hexosas o ácidos urónicos (Güçlü-Üstündağ, 2007).

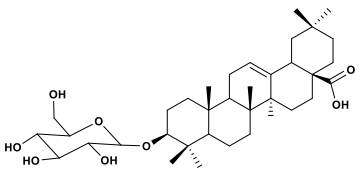


Figura 7. Estructura de una saponina monoglicosilada: ácido 3-O-β-D-glucopiranosil oleanólico.

Fuente: Kuljanabhagavad et al.,2009.

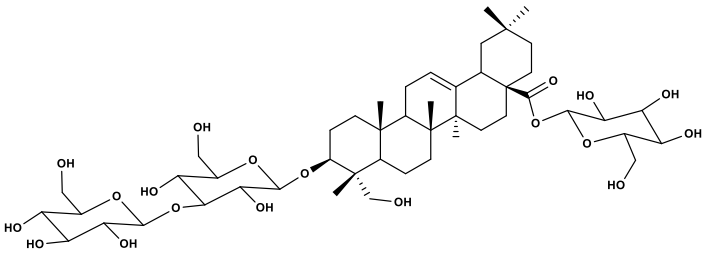


Figura 8. Estructura de una saponina diglicosilada: 3-O-β-D-Glucopiranosil-(1→3)-α-L-galactopiranosil-hederagenina 28-O-β-D-glucopiranosil éster.

Fuente: Kuljanabhagavad et al., 2009.

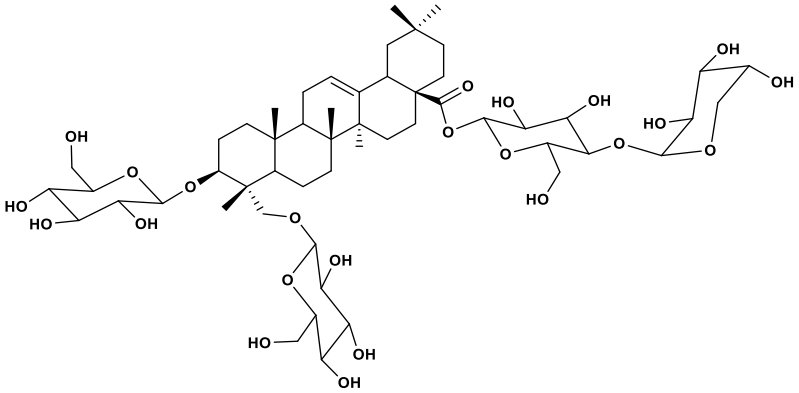


Figura 9. Estructura de una saponina triglicosilada: ácido 3,23-bis[(O-β-D-glucopiranosil) oxi] olean-12-en-28-oico-28-O-α-L-arabinopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosiléster.

Fuente: Kuljanabhagavad et al., 2009.

2.8. Saponinas de la Quinua *Chenopodium Quinoa* Willd

Las saponinas en la quinua son triterpenoides glicosilados, contienen un esqueleto pentacíclico C_{30} (sapogenina), según (Madl et al.,2006) se reporta alrededor de 87 saponinas triterpénicas que comprenden 19 componentes informados y 68 nuevos, empleando técnicas como GC/MS y Espectrometría de masas en tándem cromatográfica líquida a nano-escala nLC–MS/MS, , asimismo (Ahumada et al.,2016) reporta saponinas triterpenicas distribuidas en todas las partes de la planta de quinua, tales como hojas, flores, frutos, semillas y la cascara de las semillas, y su concentración varia de 0,01% a 5% en base de peso seco.

En la capa externa del episperma de los granos de quinua se han podido identificar dos tipos principales de saponinas: Saponina A (β-D-glupiranosil-[β-D-glucopiranosil-(1→3)-α-L-arabino-piranosil-(1→3)]-3-β-23dihidroxil-12-eno-28-oato-metil ester) y la Saponina B (β-D-glupiranosil-[β-D-glucopiranosil-(1→3)-α-Larabino-piranosil-(1→3)]-3-β-23-dihidroxilolcan-12-eno-28-oato).

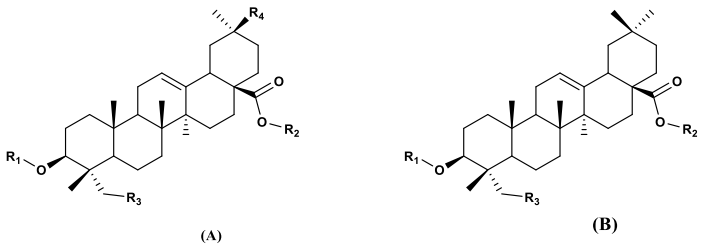


Figura 10. Estructuras de las principales saponinas de la quinua (Chenopodium quinoa Willd.) (A) Saponina A y (B) Saponina B, R_1=glucosa–arabinosa, R_2= glucosa, R_3=OH y R_4=$COOCH_3$.
Fuente: Ahumada et al., 2016.

La concentración de saponinas en la quinua permite hacer una clasificación como dulce (contenido menor de 0,11% de saponinas) y amarga (más de 0,11% de saponinas) (Koziol, 1991).

Debido a la amargura y toxicidad, la quinua debe ser tratado para reducir los niveles de saponinas mediante lavado, descascarillado y procesamiento térmico, en cuanto al consumo humano de quinua el nivel aceptable según la Norma Boliviana NB NA 0038 es de 0,00 a 0,12 % de saponinas (NB NA 0038, 2007).

2.9. Hidrólisis de saponinas

Las saponinas no resisten cambios de pH bruscos, pues provoca la ruptura del enlace O-glucosídicos liberando azúcares y sapogeninas, esta característica se aprovecha para la cuantificación y eludación de las saponinas (Ahumada et al., 2016).

En la reacción de hidrólisis de saponinas se puede emplear: ácidos (HCl, H_2SO_4), bases (NaOH, KOH) y enzimas (Kuljanabhagavad et al.,2009). El enlace eter entre el hidroxilo hemiacetal y el triterpeno se conoce como un enlace glicosidico, donde los constituyentes monosacáridos del oligosacárido tambien estan enlazados por enlaces eter.

La hidrólisis completa de un glicósido, el enlace glicósido se rompe para liberar los monosacáridos componentes y el resto de la aglicona (Suxo, 2018), para la extracción de la aglicona se utiliza solventes de mediana polaridad como acetato de etilo y cloroformo.

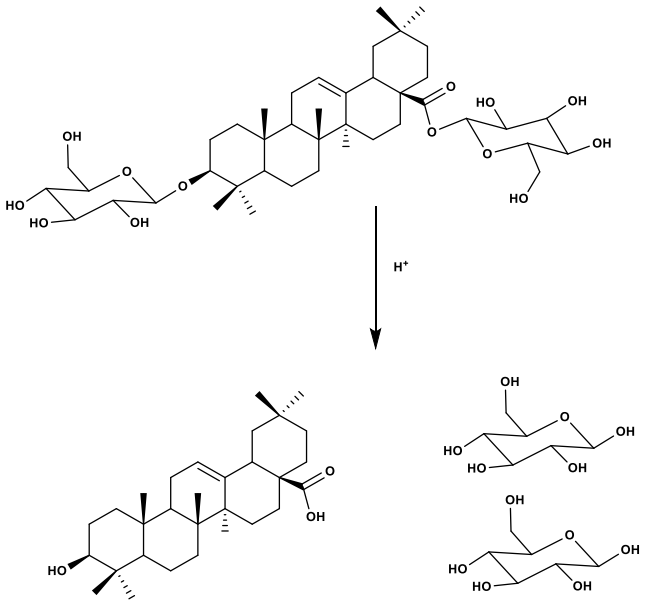


Figura 11. Reacción de hidrólisis ácida en las saponinas de la quinua.

Fuente: Lozano, 2014.

2.10. Sapogeninas

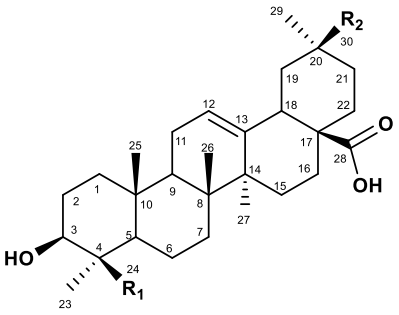
Las sapogeninas triterpénicas se encuentran en el reino animal y vegetal, se presentan tres estructuras químicas de 30-45 Carbonos, en forma libre como ésteres o como parte de un glicósido (Hernández, 1997).

El aglicón en las saponinas esteroidales (sapogenina) presenta el esqueleto tetracíclico característico de este tipo de compuestos, denominado gonano (ciclopentanoperhidrofenantreno) si es saturado.

Su característica estructural radica en la presencia de dos anillos adicionales que se originan partir del C-17 del esqueleto base, contenidos en dos planos perpendiculares entre sí. El átomo de carbono común a estos dos nuevos anillos está unido a dos átomos de oxígeno (estructura de un cetal) por los que a esta “cadena” lateral se le ha dado el nombre de cadena espirocetálica (Guerra de León, 2013).

2.10.1. Sapogeninas de la Quinua *Chenopodium Quinoa* Willd

Las saponinas de la quinua son de agliconas triterpénicas; estudios previos reportan cuatro estructuras principales de agliconas que se han identificado en las semillas de quinua son: ácido oleanólico, hederagenina, ácido fitolacagénico y ácido serjánico (Ilce et.al., 2016).



Aglicona	R_1	R_2
Ácido oleanólico	CH_3	CH_3
Hederagenina	CH_2OH	CH_3
Ácido serjanico	CH_3	$COOCH_3$
Ácido fitolacagénico	CH_2OH	$COOCH_3$

Figura 12. Agliconas de saponinas triterpénicas de *Chenopodium Quinoa* Willd.

Fuente: Madl et al., 2006.

2.11. Métodos para identificación y cuantificación de Saponinas

Existen varios métodos para la identificación y cuantificación de saponinas, que estan basados en sus propiedades características; Afrosimétrico, hemolítico, volumétrico, espectrofotométrico y cromatográfico (Toxicología e higiene, Agroindustrial, 2013).

2.11.1. Afrosimétrico o método de la espuma

Es un método físico para determinar las saponinas de la quinua, basado en su propiedad tenso activa. Cuando se disuelven en agua y se agitan, las saponinas dan una espuma estable, cuya altura está relacionada con el contenido de saponinas en los granos. Este procedimiento es apto para ser usados en controles de calidad referencial o aproximada de la quinua (Bacigalupo & Tapia, 2000).

2.11.2. Espectrofotométrico

Los métodos espectroscópicos se basan en la capacidad de las sustancias de absorber (o emitir) radiación electromagnética. Éstos se pueden emplear para determinar la concentración de un reactivo o producto durante una reacción. El espectrofotómetro detecta la cantidad de luz transmitida o absorbida a través de la solución en la celda y la compara con la que se transmite o absorbe a través de una solución de referencia denominada “blanco”. La lectura en la escala ya está convertida en absorbancia (Skoog, 2001).

El método espectrofotométrico mide la absorción de la saponina a una longitud de onda de 527 nm (Lozano, 2011).

2.11.3. Cromatografía Liquida de Alta Resolución (HPLC)

La HPLC es uno de los tantos métodos de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. En este método participan las fases móviles y estacionaría (inmiscibles entre sí) y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaría, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla (Fallon et al.,1987).

Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes. Un cromatógrafo líquido de alto rendimiento opera generalmente con cinco instrumentos: reservorio, bomba, inyector, horno (columna), detector y registrador (Skoog, 2001).

2.11.4. Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases, una técnica para la separación de compuestos volátiles que son térmicamente estables, no se aplica a compuestos que contienen grupos funcionales con átomos de hidrógeno activos (-COOH, -OH, -NH y -SH). Estos grupos son difíciles de analizar por GC porque no son lo suficientemente volátiles, y pueden ser demasiado atraídos por la fase estacionaria o son térmicamente inestables.

El primer paso del proceso de cromatografía de gases es suministrar uno o varios gases de alta pureza en el cromatógrafo de gases. Uno de los gases (llamado gas portador) fluye hacia el interior del inyector, pasa por la columna y se introduce en el detector. A continuación, se introduce una muestra en el inyector, la cual se calienta normalmente hasta 150-250 °C, lo que tiene como resultado la vaporización de los solutos volátiles de la muestra. Estos solutos vaporizados se introducen posteriormente en la columna mediante el gas portador y la columna se mantiene en un horno con control de temperatura (Rubinson, 2001).

Los solutos pasan por la columna a velocidades variables, lo cual está determinado principalmente por sus propiedades físicas y por la temperatura y composición de la columna. El soluto más rápido se eluye de la columna en primer lugar, seguido de los solutos restantes en el orden correspondiente. A medida que se eluye cada soluto, se introduce en el detector calentado, donde se genera una señal electrónica basada en la interacción del soluto con el

detector. El tamaño de la señal se registra en un sistema de datos (software) y se representa gráficamente según el tiempo transcurrido para generar un cromatograma (Casas et al.,1994).

2.11.5. Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas

La cromatografía de gases es una técnica que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas, una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando se analiza muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar.

Por otra parte, en la espectrometría de masas se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas (M+). También se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ión será dependiente de su masa.

La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, constituyen una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado. El espectro de masas puede almacenarse en la memoria del ordenador para compararse con los espectros de una colección de espectros (o librería) y proceder a su identificación o puede estudiarse para averiguar la naturaleza de la molécula que le dio origen (Casas, 1994).

La asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC/MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas.

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan pequeñas cantidades de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en

la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas (Gutiérrez & Droguet, 2002).

2.11.5.1. Derivatización para GC

El análisis GC requiere que un compuesto sea volátil a temperaturas por debajo de 350-400 ºC. El compuesto debe ser capaz de soportar altas temperaturas y transformarse rápidamente en estado de vapor sin degradación o reacción con otros compuestos. Si el compuesto no cumple con estos criterios, debe ser modificado químicamente (derivatizado) para el análisis cromatográfico. Una muestra derivatizada aumenta la volatilidad de la muestra, mejora la selectividad, aumenta la estabilidad, mejora la detectabilidad y estabilidad térmica de la muestra en aplicaciones cromatográficas.

La mayoría de las reacciones de derivatización que se utilizan comúnmente para aplicaciones de cromatografía de gases se clasifican en tres tipos: sililación, acilación o alquilación y esterificación.

2.11.5.2. Reacción de Sililación

La sililación se utiliza para mejorar el rendimiento de GC. Los reactivos de sililo tienen dos resultados deseables: aumentan la volatilidad del analito y disminuyen la adsorción superficial.

Los derivados de sililo se forman por desplazamiento de hidrógeno activo en grupos -OH, -SH y -NH. Los compuestos que contienen átomos de hidrógeno activos susceptibles de sililación son ácidos, alcoholes, tioles, aminas, amidas, cetonas y aldehídos enolizables. Sus derivados de sililo generalmente son más volátiles, menos polares y térmicamente más estables (Peñafiel, 1990).

La reacción general de sililación implica un ataque nucleofílico sobre el átomo de silicio del donante de sililo, produciendo un estado de transición biomolecular. El grupo saliente del compuesto de sililo ideal (X) debe ser tal que se pierda fácilmente del estado de transición durante la reacción, pero posea suficiente estabilidad química en combinación con el grupo alquil sililo para permitir el almacenamiento a largo plazo del agente derivatizante para su uso según sea necesario. Como la formación del estado de transición es reversible, la derivatización solo procederá a completarse si la basicidad del grupo saliente “X” excede la del grupo al que reemplazó (Hoffman, 1969).

$$\mathbf{Muestra - OH + R_3 - Si - X \rightarrow Muestra - O - Si - R_3 + HX}$$

La reacción de sililación puede ser muy rápida, aunque los TMS derivados son estables térmicamente, la sensibilidad a la humedad varía considerablemente.

(Peñafiel, 1990) menciona la Trimetilsilil derivatización del ácido oleanólico como se puede ver en la figura 13.

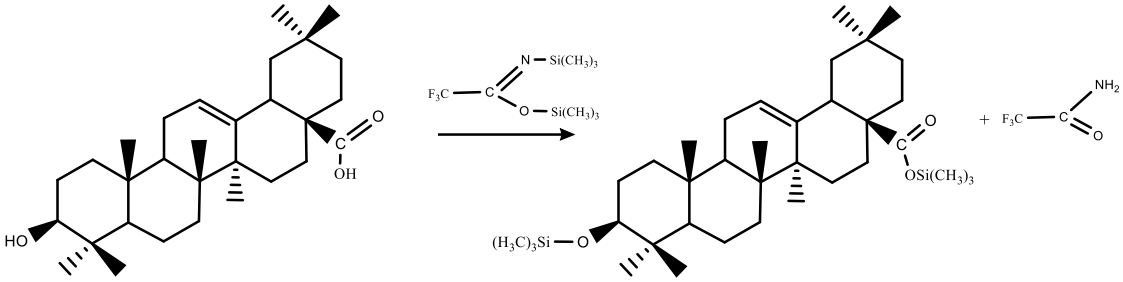


Figura 13. Trimetilsilil derivación del ácido oleanólico.

Fuente: Peñafiel, 1990.

CAPITULO 5

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el contenido de Saponinas en siete variedades de Quinua Real (*Chenopodium Quinoa* Willd*),* mediante Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas GC/MS.

Objetivos específicos

- Obtener un extracto purificado de Sapogeninas a partir de un extracto crudo de Saponinas mediante Hidrólisis ácida.
- Aislar las Sapogeninas mediante métodos Cromatograficos de separación.
- Identificar las sapogeninas mediante Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear RMN.
- Derivatizar las sapogeninas mediante reacción de sililación.
- Cuantificar los derivados de las sapogeninas mediante Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas-GC/MS.

CAPITULO 6

Obtención de estándares de sapogeninas a partir del Mojuelo de quinua

Obtención del extracto hidro–alcohólico de saponinas

La muestra de Mojuelo de quinua real proviene de la empresa Irupana Andean Organic Food.

La obtención del extracto hidroalcohólico del Mojuelo de quinua, se realizó según la metodología descrita por (Lozano, 2011), en el laboratorio de Bio-orgánica (LBO). Se pesó 500 g de Mojuelo de Quinua y se añadió una mezcla de 4500 mL EtOH/H_2O (1:1), se agitó contantemente a 450 rpm durante 3 horas a temperatura ambiente. La fase de EtOH/H_2O se decantó, filtro y el residuo se lava con 150 mL de EtOH/H_2O, se decantó, y el etanol se eliminó a presión reducida. Finalmente, el extracto acuoso fue secado por liofilización para ello el extracto fue congelado a -19ºC durante 5 horas posteriormente fue llevado a un liofilizador durante 72 horas.

Obtención del extracto rico en saponinas

Se realizó una extracción líquido-líquido con n-butanol, para ello se disolvió el extracto hidroalcohólico con 350 mL de agua destilada, posteriormente se realizó una extracción con n-butanol (3x350 mL). La fase butanólica se concentró y el producto amarillento se secó en la estufa. La fase acuosa se concentró y fue secado por liofilización, los extractos son pesados y se determina el rendimiento.

Obtención del extracto de sapogeninas totales

Se pesó 20,51 g de extracto rico en saponinas (extracto butanólico) y se adicionaron 500 mL de ácido clorhídrico 2,0 N EtOH/H_2O al 50 %, la mezcla se reflujo en un baño de aceite a 80 ºC, con agitación constante a 350 rpm durante 3 horas. Al finalizar la reacción se observa un precipitado blanco formado por las sapogeninas (agliconas). El hidrolizado se enfrió en un baño de hielo y neutraliza con una solución NaOH 4,0 N. Posteriormente a la solución acuosa se realizó una extracción con AcOEt (3x250 mL), las fracciones se filtraron en un lecho Na_2SO_4 anhidro, quedando las agliconas en el AcOEt, se concentró y se secó en la estufa a 45ºC, obteniéndose un peso de 16,71 g de las agliconas.

Aislamiento y purificación de las Sapogeninas

El aislamiento de las sapogeninas se realizó a partir del extracto sapogeninas, utilizando las siguientes técnicas: Cromatografía líquida al vacío (VLC–Vacum Liquid

Chromatography), cromatografía en columna flash y purificación por cristalización, obteniéndose cuatro sapogeninas (a, b, c y d) que fueron identificadas por resonancia magnética nuclear RMN 1D y 2D.

Figura 14. Placa TLC-FN de las sapogeninas aisladas (a, b, c y d) (eluyente AcOEt/EP (1:1), Revelado en solución H_2SO_4 al 5%).

Fuente: Elaboración propia.

Identificación de Sapogeninas aisladas del Mojuelo de quinua por Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear RMN

Se identificaron cuatro compuestos aislados (a, b, c y d) de los cuales se realizó análisis por Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear RMN ^{1}H y ^{13}C. Obtenidos en el equipo de Resonancia Magnética Nuclear marca Bruker de 300 MHz de la carrera de Ciencias Químicas de la Universidad Mayor de San Andrés, posteriormente se elucido por comparación de espectros ya existentes de los mismos compuestos.

Cuantificación de las Sapogeninas por Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas (GC/MS)

Obtención del extracto de Sapogeninas en diferentes variedades de Quinua real

Se colectaron 7 variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) procedentes del Salar de Uyuni, y adquirido del mercado de Challapata municipio del departamento de Oruro, en fecha 14/10/20 y se almacenó en una habitación seca.

Figura 15. Muestras de Quinua Real.

Las semillas de quinua se molieron hasta obtener un polvo fino, y se almacenó en bolsas de polietileno con cremallera a temperatura ambiente, Para evaluar el contenido de saponinas, se realizó una extracción hidroalcohólico según la metodología descrita por (Lozano, 2011) en el laboratorio de Bio-orgánica (LBO).

Se pesó 10,00 g de semillas de quinua y se añadió una mezcla de 100 mL EtOH/H_2O (1:1), se agitó contantemente a 280 rpm durante 3 horas a temperatura ambiente. La fase de EtOH/H_2O se decantó y filtro, el etanol se eliminó a presión reducida, y el extracto acuoso fue secado por liofilización, para ello el extracto fue congelado a -19ºC durante 5 horas posteriormente fueron llevados a un liofilizador durante 72 horas, al extracto hidroalcohólico (extracto crudo de saponinas) se realizó una extracción líquido-líquido con n-butanol, para ello se disolvió con 10 mL de agua destilada posteriormente se realizó la extracción con n-butanol (3x15 mL), La fase butanólica se concentró a presión reducida 45ºC (150 mbar) y se secó en la estufa, el producto amarillento se pesó. Asi mismo las saponinas se purificaron adicionalmente mediante Cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephadex LH-20, empleando como eluyente etanol. Se aplicaron a la columna 100 mg del extracto butanólico (extracto rico en saponinas) y se colectaron fracciones de 15 mL que se controlaron mediante placas FR-18 empleando como eluyente ACN/H_2O (1:1,8) y fueron revelados con una solución de ácido sulfúrico al 5%. Posteriormente se hidroliza 20 mg del extracto rico en saponinas con 20 mL de HCl 2,0 N EtOH/H_2O al 50 %, la mezcla se reflujo en un baño de aceite a 80 ºC, con agitación constante a 450 rpm durante 3 horas. El hidrolizado se enfrió y neutralizó con NaOH 4,0 N y las sapogeninas fueron luego extraídas por partición líquido-líquido con AcOEt (3x15 mL), las fracciones se filtraron en un lecho de Na_2SO_4 anhidro, el extracto final se secó y se almacenó para su posterior análisis por GC/MS, todas las extracciones fueron realizadas por triplicado.

Reacción de derivatización

Para Derivatizar las sapogeninas triterpenoides, se pesó de 10 a 15 mg del extracto de sapogeninas y en una atmosfera inerte se añadió 200 µL de Piridina anhidra y 900 µL de BSTFA (N-O-bis- trimetilsisil Trifluoro acetamida), las reacciones de derivatización fueron realizadas a una velocidad de rotación de 480 rpm a temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente el producto de la reacción se enfrió rápidamente en un baño de hielo, y se añadió 900 µL de hexano antes del análisis por GC/MS.

Preparación de los estándares para la curva de Calibración

Se prepararon soluciones madre (3,00-3,50 mg/mL) a partir de los estándares de Sapogeninas (AO, HE, AS, AF) para derivatizar, se pesó de 6,0-7,0 mg del estándar y en una atmósfera inerte, se añadieron 200 µL de Piridina anhidra y de 900-1400 µL de BSTFA (N-O-bis- trimetilsisil Trifluoro acetamida), las reacciones de derivatización fueron realizadas a una velocidad de rotación de 480 rpm a temperatura ambiente durante 2 h, luego se enfrió rápidamente en un baño de hielo, y se aforaron hasta los 2000 µL con hexano, posteriormente a partir de la solución madre se preparan cinco soluciones estándar, finalmente se inyectaron microlitros de estas soluciones en el equipo GC/MS, la solución madre y soluciones estándares fueron preparadas por triplicado. Y las curvas de calibración fueron construidas por regresión lineal mediante la relación de área del pico versus la concentración.

En el transcurso de la reacción de sililación, se variaron las cantidades de reactivos, así como el tiempo duración, con el fin de optimizar el método.

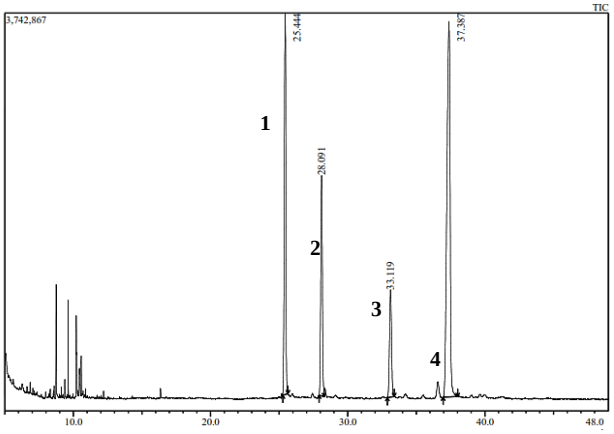


Figura 13. Cromatograma Trimetilsilil derivados de Sapogeninas 1) Acido oleanólico a 25.4 min, 2) Hederagenina 28.1 min, 3) Acido serjanico 33.1 min, 4) Acido Fitolacagénico 37.4 min.

Instrumentación y Condiciones del GC/MS

La separación se llevó a cabo utilizando un Cromatógrafo De Gases GC-2010 plus acoplado a masas MS-QP-2020 marca SHIMADZU, con una columna capilar DB-5ms Ultra Inert (Fenilo al 5%, dimetilpolisiloxano al 95%) De -60 a 325/350 ºC, las dimensiones de la columna son 30 m x 0,25 mm de diámetro interior, película de 0,25 µm, Inyector AOC-20i.

Las temperaturas del inyector y del detector fueron ambos ajustados a 300 °C, mientras que la temperatura del horno fue programada: inicial 100 ºC (1 min), 20ºC/min a 280 ºC (0,1 min), 5 ºC/min a 300 ºC (35 min), la temperatura del Inyector se fijó en 300 ºC. Las muestras se inyectaron en modo splitless, el volumen de inyección fue de 1 µL. Se utilizaron el modo splitless y la presión del gas portador (helio) fue 74,5 kPa, el flujo de columna 0,67 mL/min La energía de ionización empelada es 70 eV.

Los datos del espectrómetro de masas MS, se registraron en modo de escaneo completo de 50 a 850 m/z.

Los análisis se realizaron por triplicado para cada variedad de quinua y la cuantificación de sapogeninas se realizó mediante el área del pico bajo la curva.

CAPITULO 7

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el presente trabajo se realizó la evaluación del contenido de saponinas en siete variedades de quinua real: Quinua Real Blanca (**QRB**), Quinua Real Amarilla (**QRA**), Quinua Real Pandela (**QRP**), Quinua Real Toledo (**QRT**), Quinua Real Luki (**QRL**), Quinua Real Negra (**QRN**) y Quinua Real Rojo Pasankalla (**QRRP**), mediante la implementación de un método por Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas (GC/MS).

Para ello, se obtuvieron estándares de sapogeninas, a partir de una muestra de Mojuelo de quinua, los cuales se identificaron mediante Resonancia Magnética Nuclear RMN (^{1}H y ^{13}C) y Espectrometría de Masas MS. Posteriormente se construye las curvas de calibración para cada uno de los estándares y finalmente se determinó el contenido de saponinas en las diferentes variedades, estableciendo un factor de conversión de sapogenina a saponina.

Obtención de estándares de sapogeninas a partir del Mojuelo de quinua

Obtención del extracto crudo de saponinas

En la obtención del extracto crudo de saponinas a partir del Mojuelo de quinua, se obtuvo un extracto con un rendimiento de extracción del 40,3 % respecto del Mojuelo,

Obtención del extracto rico en saponinas

La obtención del extracto rico saponinas, se realizó por partición líquido-líquido con n-butanol, de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 6, los resultados muestran un rendimiento del 17,7 % del extracto butanólico, respecto al extracto hidroalcohólico, se observó una disminución de la concentración de saponinas a medida que se realizó las extracciones.

Obtención del extracto de sapogeninas totales

La hidrólisis ácida de saponinas conduce a la separación de uniones glucosídicas del C-3 y C-28 del triterpeno, la ruptura del enlace glucosídico se da cuando el oxígeno del carbono C-3 que une a la cadena de azucares a través de un puente eter y el oxígeno del éster del carbono C-28, se protonan por interacción del medio ácido posterior a un ataque nucleofílico del agua a los carbonos más electrofílicos (figura 17).

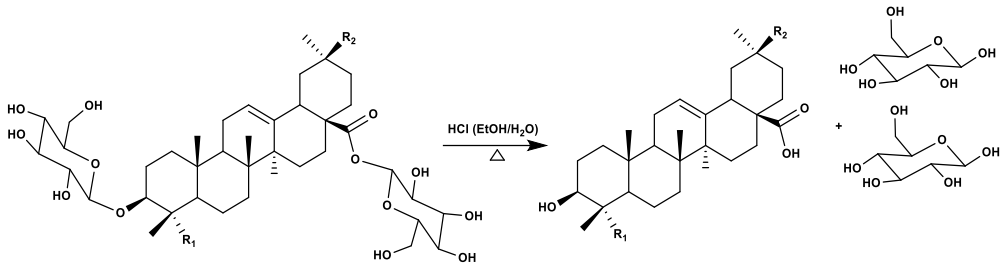


Figura 17. Hidrólisis ácida de saponinas de la quinua.

Fuente: Elaboración propia.

Se obtuvo un extracto de sapogeninas, se determinó el rendimiento del extracto de sapogeninas igual a 81,5 % respecto del extracto de rico en saponinas.

Aislamiento e identificación de sapogeninas

La separación de los compuestos **a, b, c** y **d**, se obtuvo los datos de la tabla 3.

Tabla 3. Masa y características físicas de las sapogeninas aisladas del Mojuelo de quinua.

Sapogenina Aislada	Aspecto	Masa [g]	Rendimiento %
a	Cristales en forma de agujas	2,34	20,5
b	Polvo blanco, sólido amorfo	0,77	6,73
c	Polvo blanco, cristales en forma de agujas pequeñas	1,64	14,4
d	Polvo blanco, gelatinoso amorfo	2,10	18,4

Fuente: Elaboración propia.

A partir de los datos de la tabla 3, se determinó el rendimiento de cada sapogenina aislada los cuales evidencian que la sapogeninas las predominantes en el Mojuelo de quinua son **a** y **d**.

A partir de los estudios previos realizados por (Lozano et al.,2014; Alvarado et al.,1981) se identificó estructura química de las sapogeninas aisladas del Mojuelo de quinua, mediante Resonancia Magnética Nuclear RMN de ^{1}H y ^{13}C. La identificación estructural de los compuestos se realizó por análisis comparativo de sus espectros, y las señales obtenidas de RMN ^{13}C muestran un gran grado de correlación respecto a los datos bibliográficos.

El compuesto **a** se identificó como ácido oleanólico (ácido 3-hidroxiolean-12-en-28-oico), fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ y peso molecular 456,70 g/mol. En el espectro de RMN ^{13}C se observa 30 señales de carbono, características del esqueleto triterpénico, en el análisis de campos bajos hacia campos altos se obtuvo a δ 183,5 la señal correspondiente al carbono C-28 del grupo carbonilo, señales a δ 122,6 y 143,6 correspondiente al doble enlace entre los carbonos C-12 y C-13, a δ 79,0 la señal correspondiente al C-3 unido al grupo hidroxilo

(OH), y señales correspondientes a grupos alifáticos como se observa en el análisis comparativo con los datos referencia, figura 18.

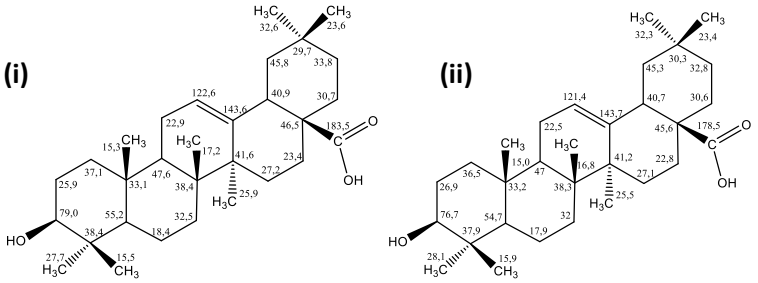


Figura 18. Datos de RMN ^{13}C compuesto a i) Experimental ii) Referencia ácido oleanólico.

Fuente: Elaboración propia.

El compuesto **b** se identificó como ácido serjanico (ácido 3-hidroxiolean-12-en-30-metoxi-28-oico), su fórmula molecular es $C_{31}H_{48}O_5$ y peso molecular 500,35 g/mol. En el espectro de RMN ^{13}C (figura 19), se observa 31 señales de carbono, características del esqueleto triterpénico, en el análisis de campos bajos hacia campos altos se obtuvo a δ 182,7 la señal correspondiente al carbono C-28 del grupo carbonilo, a δ 176,9 la señal de un grupo éster C-30, señales a δ 123,4 y 142,9 correspondiente al doble enlace entre los carbonos C-12 y C-13 respectivamente, a δ 79,0 la señal correspondiente al C-3 unido al grupo hidroxilo (OH), y a δ 51,8 la señal de un grupo metilo de un éster C-31 COOMe.

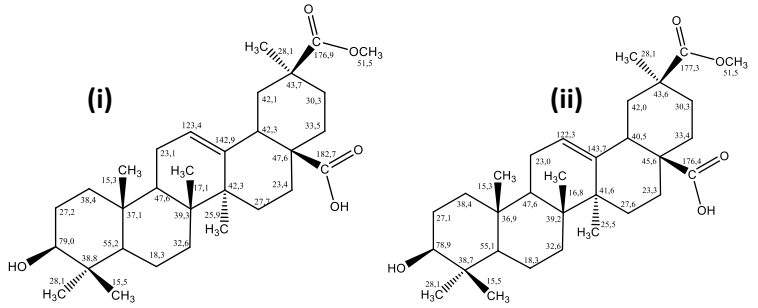


Figura 19. Datos de RMN ^{13}C compuesto b i) Experimental ii) Referencia ácido serjanico.

Fuente: Elaboración propia.

El compuesto **c** se identificó como hederagenina (ácido 3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oico), su fórmula molecular es $C_{30}H_{48}O_4$ y peso molecular 472,36 g/mol. En el espectro de RMN ^{13}C (figura 20), se observa 30 señales de carbono, características del esqueleto triterpénico tipo Oleanano, en el análisis de campos bajos hacia campos altos se obtuvo a δ 180,9 la señal correspondiente al carbono C-28 del grupo carbonilo, señales a δ 122,3 y 143,8 correspondiente al doble enlace entre los carbonos C-12 y C-13 respectivamente, a δ 71,9 y 60,2 la señal correspondiente al C-3 y C-23 unido al grupo hidroxilo (OH).

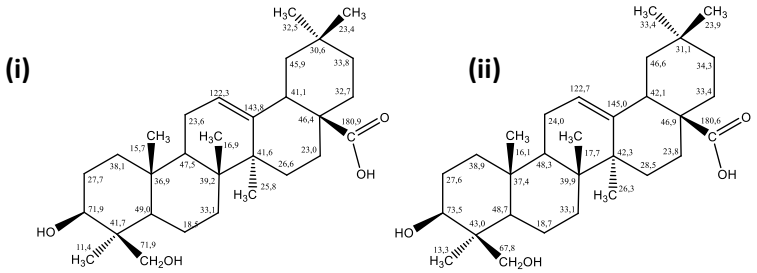


Figura 20. Datos de RMN ^{13}C compuesto c i) Experimental ii) Referencia hederagenina.

Fuente: Elaboración propia

El compuesto **d** se identificó como ácido fitolacagénico (ácido 3,23-dihidroxiolean-12-en-30-metoxi-28-ioco), su fórmula molecular es $C_{31}H_{48}O_6$ y peso molecular 516,36 g/mol. En el espectro de RMN ^{13}C (figura 21), se observa 31 señales de carbono, características del esqueleto triterpénico tipo Oleanano tetrasustituido, en el análisis de campos bajos hacia campos altos se obtuvo a δ 178,7 la señal correspondiente al carbono C-28 del grupo carbonilo, a δ 176,8 la señal de un grupo éster C-30, señales a δ 122,4 y 144,1 correspondiente al doble enlace entre los carbonos C-12 y C-13 respectivamente, a δ 70,8 y 64,9 la señal correspondiente al C-3 y C-23 unido al grupo hidroxilo(OH).

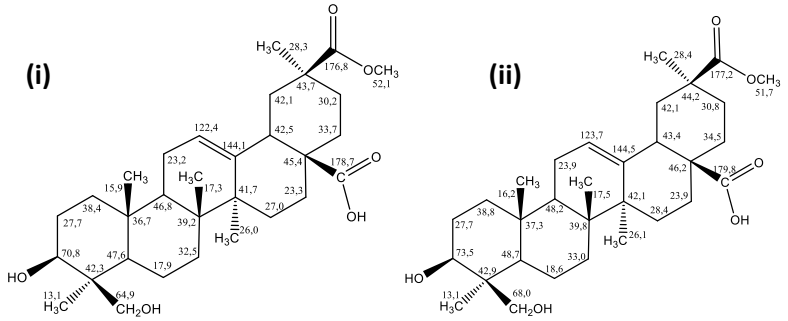


Figura 21. Datos de RMN ^{13}C compuesto d i) Experimental ii) Referencia ácido fitolacagénico.

Fuente: Elaboración propia.

Cuantificación de las sapogeninas por Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas (GC/MS)

Obtención del extracto de Sapogeninas en diferentes variedades de quinua

Para la obtención de extracto de sapogeninas en las diferentes variedades de quinua real, se obtuvo el extracto crudo de saponinas, el extracto rico en saponinas, posteriormente las saponinas se purificaron adicionalmente mediante Cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephadex LH-20. Finalmente, se realizó una hidrólisis ácida, la misma se monitorea con placas TLC-FN y FR-18, lo cual permite estimar el grado de hidrólisis de las

saponinas por la aparición de sapogeninas, teniendo en cuenta que la desaparición de las saponinas estima una hidrólisis del 100%, y a su vez evitar la formación de subproductos de reacción.

A continuación, se tiene la masa promedio de los extractos obtenidos a partir de las 7 variedades de quinua real.

Tabla 5. Masa de los extractos, correspondiente a las diferentes variedades de quinua.

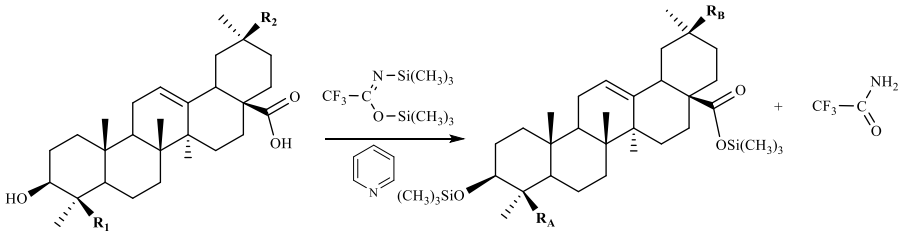
Variedad	Masa de semilla de quinua (g)	Masa de Ext. hidroalcohólico (g)	Masa de Ext. butanólico (g)	Masa de Ext. saponinas (g)	Masa de Ext. saponinas p/hidrólisis (mg)	Masa de Ext. sapogeninas (mg)
QRB	10,02±0,0	0,677±0,05	0,105±0,02	0,040±0,01	20	13,5±1,21
QRA	10,03±0,11	0,659±0,06	0,100±0,01	0,031±0,01	20	15,7±1,67
QRP	10,04±0,01	0,917±0,03	0,105±0,02	0,034±0,01	20	16,1±0,80
QRT	10,04±0,16	0,874±0,07	0,105±0,01	0,028±0,01	20	16,5±0,61
QRL	10,07±0,01	0,738±0,06	0,099±0,01	0,036±0,01	20	15,4±1,01
QRN	10,01±0,02	0,738±0,06	0,086±0,01	0,027±0,01	20	11,1±1,01
QRRP	10,06±0,05	0,770±0,05	0,097±0,01	0,033±0,01	20	11,1±1,06

Fuente: Elaboración propia.

A partir de los datos obtenidos, se determinó que el coeficiente de variación es menor al 4%, que evidencia la baja dispersión de los datos, y buena precisión, además se determinó el rendimiento de los extractos de sapogeninas en cada variedad de quinua: 67,5±1,21 % QRB, 78,5±1,67 % QRA, 80,5±0,80 % QRP, 82,5±0,61 % QRT, 77,0±1,01 % QRL, 56,0±1,01 % QRN y 55,5±1,06 % QRRP, respecto del extracto rico en saponinas, los valores obtenidos son próximos a referencias bibliográficas (Kuljanabhagavad et.al, 2008) en muestras de quinua.

Reacción de derivatización

La reacción de sililación se lleva a cabo por sustitución nucleofílica biomolecular (SN_2), implica un ataque nucleofílico sobre el átomo de silicio del donante de sililo, produciendo un estado de transición biomolecular y el grupo saliente del compuesto de sililo (X), pierde su estado de transición durante la reacción, pero posee una suficiente estabilidad en combinación con el grupo alquil sililo.



	Reactivo		Producto	
Aglicona	$\mathbf{R_1}$	$\mathbf{R_2}$	$\mathbf{R_A}$	$\mathbf{R_B}$
Ácido oleanólico	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3
Hederagenina	CH_2OH	CH_3	$CH_2OSi(CH_3)_3$	CH_3
Ácido serjanico	CH_3	$COOCH_3$	CH_3	$COOCH_3$
Ácido fitolacagénico	CH_2OH	$COOCH_3$	$CH_2OSi(CH_3)_3$	$COOCH_3$

Figura 22. Trimetilsilil derivados producto de la reacción de Sililación.

Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 6, se realizó la reacción de sililación para los cuatro estándares de sapogeninas, los Trimetilsilil derivados de las sapogeninas fueron analizados por GC/MS, y se obtuvo un cromatograma general de iones sililados, y por intensidades de las señales en el cromatograma se tiene el espectro de masas de los iones fragmentados.

Tabla 6. Principales fragmentos derivados de Trimetilsilil de las sapogeninas.

Pico	t_R (min)	Principales fragmentos de masa de los compuestos liberados de TMS	Sapogenina tentativa
1	25,44	601, 585, 482, 393, 320, 279, 203,189	Ácido Oleanólico
2	28,10	688, 673, 570, 320, 203,189	Hederagenina
3	33,12	644, 629, 526, 364, 247, 187	Ácido Serjanico
4	37,40	732, 717, 614, 364, 247,187	Ácido Fitolacagénico

Fuente: Elaboración propia.

El análisis del espectro de masa permite establecer la fórmula molecular de los cuatro estándares, a partir de su ión molecular M^+, teniendo como referencia estudios previos realizados (Burnouf-Radosevich et al., 1985; Maša et al., 2008).

Los iones fragmentados de AO se encuentran en m/z 601 (ión molecular M^+), m/z 585 (pérdida de un metilo), m/z 482 (eliminación de grupos TMSiOOCH), m/z 393 (eliminación de grupos TMSiOH y TMSiOOCH), y fragmentos de mayor intensidad es a m/z 320, 279, 203 y 189 que corresponde al reordenamiento Retro Diels Alder (RDA), en el anillo que posee un doble enlace, suficiente evidencia de la existencia de la insaturación del C-12. Asi también se observó otro fragmento de mayor intensidad m/z 73 que corresponde al catión de TMSi.

Los iones fragmentados de HE se encuentran a m/z 688 (ión molecular M^+), m/z 673 (pérdida de un metilo), m/z 570 (eliminación del grupo TMSiOOCH), fragmentos de mayor intensidad es a m/z 320, 203 que corresponde al reordenamiento Retro Diels Alder (RDA), en el anillo que posee un doble enlace, suficiente evidencia de la insaturación en el C-12, y un fragmento a m/z 189 que se constituye en un pico diagnóstico debido a la insaturación (C-12).

Los iones fragmentados de AS se encuentran a m/z 644 (ión molecular M^+), m/z 629 (pérdida de un metilo), m/z 526 (eliminación del grupo TMSiOOCH), fragmentos m/z 364 y 247 que corresponde al reordenamiento Retro Diels Alder (RDA), en el anillo del carbono C-12 que posee un doble enlace, suficiente evidencia para la existencia de esa insaturación, además de un pico de mayor intensidad a m/z 187 que se constituye en un pico diagnóstico debido a la insaturación del (C-12).

Los iones fragmentados de AF se encuentran a m/z 732 (ión molecular M^+), m/z 717 (pérdida de un metilo), m/z 614 (eliminación del grupo TMSiOOCH), fragmentos m/z 364, 247 y 233 que corresponde al reordenamiento Retro Diels Alder (RDA), en el anillo del carbono C-12 que posee un doble enlace, suficiente evidencia para la existencia de esa insaturación, un pico de mayor intensidad a m/z 187 que se constituye en un pico diagnóstico debido a la insaturación del (C-12), además de un fragmento de mayor intensidad a m/z 73 que corresponde al catión TMSi.

A continuación, se realizó la reacción de derivatización para cada muestra, Los análisis se realizaron por triplicado para cada variedad de quinua y se obtuvo el contenido de cada sapogenina como el área del pico.

Tabla 7. Datos del área promedio de cada sapogenina presente en las variedades de quinua.

Variedad	Área ácido oleanólico	Área hederagenina	Área ácido serjanico	Área ácido fitolacagénico
QRB	37700840	19273463	5326593	17990867
QRA	27999667	26371618	9273656	38180050
QRP	28606481	27333179	10037965	35957505
QRT	14697188	23503397	8248862	45301496
QRL	24593820	23665290	11020532	36332403
QRN	2514381	6701266	796387	37211479
QRRP	3863485	8204487	1344240	37906168

Preparación de los estándares para la curva de Calibración

La curva de calibración se realizó con el fin de determinar la concentración de sapogeninas individuales en cada variedad de quinua.

Los datos de área obtenidos en los respectivos estándares tienen un comportamiento lineal, y los coeficientes de correlación (R^2) fueron ≥ a 0,99, se evaluó la precisión del análisis por GC/MS mediante la desviación estándar promedio (RSD), a partir de los datos obtenidos por triplicado para cada solución estándar, el cual fue inferior al 6 %.

Tabla 1. Datos de área obtenidos para la curva de calibración del ácido oleanólico a 25,44 min.

Concentración [mg/uL]	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	SD
3,00	63836200	65198249	62589473	63874641	1304813
2,49	52082845	54105596	51906085	52698175	1222062
2,00	38685832	41312929	40282694	40093818	1323694
1,50	24961092	29091237	27855915	27302748	2119910
1,00	13336130	17827630	15838582	15667447	2250635
0,50	817163	8938067	6964570	5573267	4235453
R²	0,9994	0,9974	0,9982		

A partir de los datos de la tabla 8, se construye la curva de calibración del ácido oleanólico.

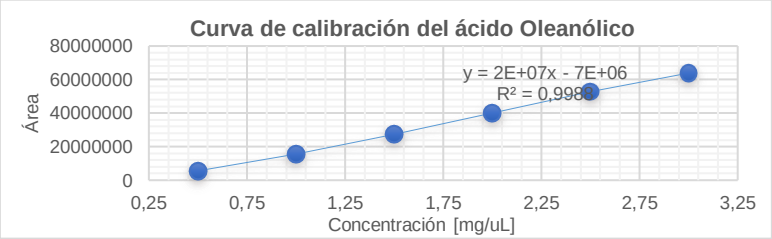


Figura 22. Curva de calibración del ácido oleanólico.

Tabla 9. Datos de área obtenidos para la curva de calibración de Hederagenina a 28,10 min.

Concentración [mg/uL]	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	SD
3,00	45805504	42789404	41961774	43518894	2023038
2,50	34796964	32890950	32974878	33554264	1077028
2,00	25788424	25620126	24934723	25447758	452200
1,50	17932149	17031999	18094568	17686239	572378
1,00	8317142	7539943	8615450	8157512	555239
0,50	1546425	1493215	1834634	1624758	183695
R²	0,9958	0,9968	0,9982		

A partir de los datos de la tabla 9, se construye la curva de calibración de hederagenina.

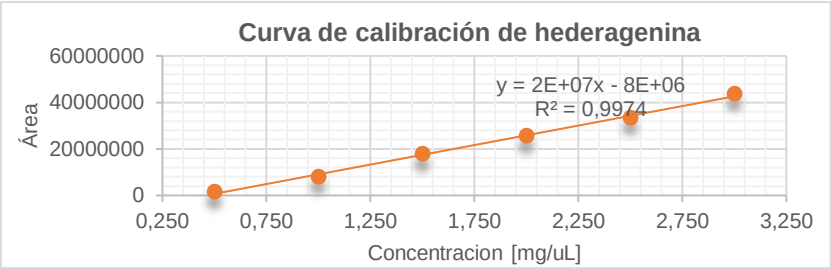


Figura 14. Curva de calibración de hederagenina.

Tabla 10. Datos de área obtenidos para la curva de calibración del ácido serjanico a 33,12 min.

Concentración [mg/uL]	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	SD
3,00	34169136	32647252	28757739	31858042	2790689
2,50	25553564	26363224	22403951	24773580	2091708
2,00	19937992	20085196	17050163	19024450	1711366
1,50	13322420	12804169	11696375	12607655	830644
1,00	6337540	7523141	6342587	6734423	683055
0,50	145949	1242114	988799	792287	573896
R²	0,9975	0,9988	0,9991		

A partir de los datos de la tabla 10, se obtuvo la curva de calibración del ácido serjanico.

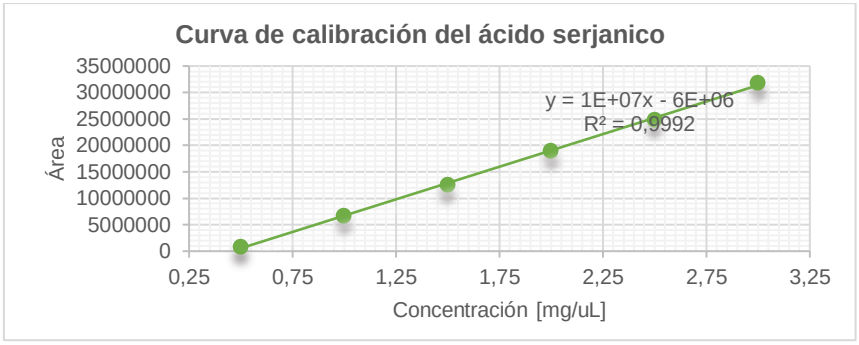


Figura 15. Curva de calibración de ácido serjanico.

Tabla 11. Datos de área obtenidos para la curva de calibración del ácido fitolacagénico a 37,10 min.

Concentración [mg/uL]	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	SD
3,50	60326766	61398463	57275383	59666871	2139286
3,01	46656869	47364584	44597513	46206322	1437503
2,50	35089637	36805695	33593825	35163052	1607193
2,00	25026908	23689907	22364849	23693888	1331034
1,50	12670854	13364849	12026908	12687537	669126
0,99	2314976	2376418	2577257	2422884	137176
R²	0,9979	0,9976	0,9977		

A partir de los datos de la tabla 11, se obtuvo la curva de calibración del ácido fitolacagénico.

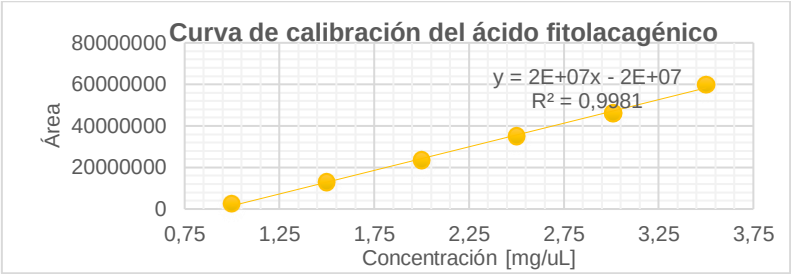


Figura 25. Curva de calibración del ácido fitolacagénico.

Una vez construido las curvas de calibración, área versus concentración de sapogenina en [mg/µL], mediante la regresión lineal (y=a+bx), y datos de la tabla 7, se determinó la concentración de sapogenina en las semillas de quinua de las siete variedades (tabla 12), posteriormente se obtuvo la masa de sapogenina presente en 10 g de semilla de quinua.

Tabla 12. Datos de la concentración individual de sapogeninas, obtenidos a partir de la regresión lineal.

Variedad	Concentración de AO [mg/µL]	Concentración de HE [mg/µL]	Concentración de AS [mg/µL]	Concentración de AF [mg/µL]
QRB	2,24±0,25	1,36±0,14	1,13±0,02	1,90±0,12
QRA	1,98±0,80	1,72±0,82	1,53±0,53	2,91±0,31
QRP	1,78±0,19	1,77±0,20	1,60±0,10	2,80±0,18
QRT	1,08±0,11	1,58±0,12	1,42±0,10	3,27±0,23
QRL	1,58±0,20	1,58±0,13	1,70±0,02	2,82±0,27
QRN	0,48±0,01	0,74±0,03	0,68±0,01	2,86±0,11
QRRP	0,54±0,03	0,81±0,04	0,73±0,02	2,90±0,05

Tabla 13. Masa individual de sapogenina y sapogenina total en cada variedad de quinua.

Variedad	Masa de AO (mg)	Masa de HE (mg)	Masa de AS (mg)	Masa de AF (mg)	Sapogenina total (mg)
QRB	4,47	2,73	2,27	3,80	13,3
QRA	3,96	3,44	3,05	5,82	16,3
QRP	3,56	3,53	3,21	5,60	15,9
QRT	2,17	3,15	2,85	6,53	14,7
QRL	3,16	3,17	3,40	5,63	15,4
QRN	0,95	1,47	1,36	5,72	9,50
QRRP	1,09	1,62	1,47	5,79	9,97

Fuente: Elaboración propia.

La representación gráfica de los datos de la Tabla 13, de Sapogeninas individuales en mg por cada 10 g de semillas de quinua Figura 26.

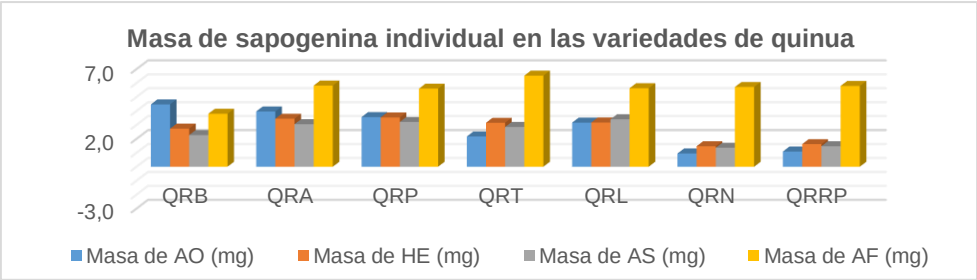


Figura 26. Contenido de sapogeninas individual en mg por cada 10 g de semilla de quinua.

Los resultados de la tabla 13, indican como Sapogeninas predominante al ácido oleanólico y ácido fitolacagénico, ya que la amargura está relacionada con el contenido de ácido fitolacagénico, ninguna de las muestras clasificaría como quinua dulce.

Una vez determinado el contenido de Sapogenina total en la semilla de quinua es necesario establecer un factor de conversión de sapogeninas a saponinas.

Cabe señalar que existen referencias sobre cuantificación de saponinas por cromatografía de gases, previa formación de Trimetilsilil derivado de ácido oleanólico, en la que se emplea estándar interno para la curva de calibración, la misma no establecen un factor de conversión para la expresión del resultado final, asimismo, se tiene el factor obtenido por (Peñafiel, 1990) (% Saponinas=8,5204 x %A.O.), el cual se determinó por aproximación mediante el standard de normalización interna, partiendo de un extracto semi-purificado de saponinas.

El factor obtenido debe ser analizado, debido a que el extracto de saponinas semi-purificados, presenta coextrativos (pigmentos, flavonoides o compuestos fenólicos).

Por ello para la determinación del factor de conversión, adicionalmente se obtuvo un extracto purificado de saponinas (37,86 mg), a partir de 10,0 g de semillas de quinua real blanca, asimismo a partir del análisis por GC/MS (standard de normalización interna), se determina el contenido de la sapogenina mayoritaria (ácido oleanólico) en la semilla de quinua real blanca, los análisis se realizaron por triplicado, se tiene al ácido oleanólico como constituye mayoritario 48,3 % (4,47 mg ácido Oleanólico) respecto de las sapogeninas totales

Se obtuvo la relación; **ácido oleanólico x 2,068=sapogeninas**, además se estableció que el factor de conversión de sapogenina a saponina:

$$\%\ \mathbf{Saponinas} = \mathbf{8,471}\ \mathbf{x}\ \%\ \mathbf{Sapogenina} \qquad \mathbf{Ec.1}$$

A partir de la ecuación 1, se determinó el contenido de saponina en las siete variedades de quinua real.

Tabla 14. Contenido de Sapogeninas y saponinas en las variedades de quinua.

Variedad	mg de Sapogenina en 10 g de semilla de quinua	mg de Saponina en 10 g de semilla de quinua	(%) Saponinas	(mg/g) Saponinas
QRB	13,3	112,3	1,12	11,2
QRA	16,3	137,9	1,38	13,8
QRP	15,9	134,7	1,34	13,4
QRT	14,7	124,5	1,24	12,4
QRL	15,4	130,1	1,29	12,9
QRN	9,50	80,5	0,80	8,04
QRRP	9,97	84,4	0,84	8,39

Finalmente se reporta el contenido de saponinas en las muestras con el intervalo de confianza respectivo.

Tabla 15. Contenido de saponinas en las variedades de quinua.

Variedad	(%) Saponinas	(mg/g) Saponinas
QRB	1,12±0,07	11,2±0,73
QRA	1,38±0,30	13,8±0,80
QRP	1,34±0,05	13,4±0,47
QRT	1,24±0,02	12,4±0,17
QRL	1,29±0,06	12,9±0,56
QRN	0,80±0,02	8,04±0,16
QRRP	0,84±0,01	8,39±0,01

El contenido de saponinas de las variedades estudiadas osciló entre 0,8 y 1,4 % (8,0 y 13,8 mg/g), estos resultados revelan que ninguna de las muestras analizadas clasifica como quinua dulce, esto se debe a que las muestras no fueron sometidas a ningún proceso de lavado o descascarillado, lo que se refleja en el mayor contenido de ácido oleanólico y disminución del ácido fitolacagénico.

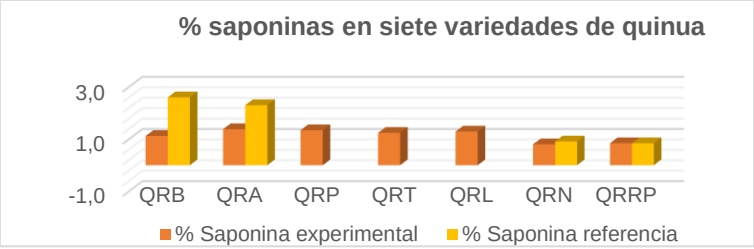


Figura 27. Contenido de Saponina en las siete variedades de quinua.

En la figura se observa datos de referencia correspondientes a 4 variedades de quinua, el mismo revela un cierto grado de aproximación, respecto de los valores obtenidos mediante el método GC/MS, teniendo en cuenta que los datos referencia fueron obtenidos por métodos espectrofotométricos, al ser estos métodos de baja precisión, carecen de confiabilidad, a su vez que las muestras fueron cultivados en diferentes condiciones climatológicas entre otros factores que se deben considerar

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

- Se obtuvo un extracto purificado de sapogeninas, a partir de la hidrólisis de un extracto purificado de saponinas previa extracción con n-butanol, y cromatografía por exclusión molecular en columna de Sephadex LH-20, lo que permitió optimizar la reacción, asimismo evitar la formación de subproductos durante la hidrólisis.
- Se logró aislar cuatro sapogeninas mayoritarias a partir del Mojuelo de quinua, empleando técnicas cromatográficas como separación y se realizó la identificación de los compuestos aislados por análisis comparativo de espectros RMN 1D (^{1}H, ^{13}C), espectros bi-dimensionales (HSQC y HMBC) y MS, y se determinó la estructura del ácido oleanólico, hederagenina, ácido serjanico y ácido fitolacagénico, agliconas mayoritarias de la quinua.
- Se realizó la Derivatización de las sapogeninas, y los Trimetilsilil derivados de cada sapogenina permitió determinar el contenido de sapogeninas individuales en las siete variedades de quinua.
- Se estableció un método de cuantificación de saponinas por CG/MS, a partir de los derivados de Trimetilsilil, obteniéndose el factor de conversión de sapogenina a saponina: % Saponinas=8,471 x % sapogeninas
- Cabe señalar la selectividad, eficiente que ofrece el método de Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de Masas GC/MS, por ser un método preciso para el análisis de saponinas en granos de quinua.
- Por otro lado, el porcentaje de saponina en las siete variedades de quinua estudiadas Quinua Real Blanca, Amarilla, Pandela, Toledo, Luki, Negro y Rojo Pasankalla son bastante elevados (0,8- 1,4 %). Estos niveles de saponina estan por encima de los valores aceptados para el consumo humano según Normas de calidad (< 0,12 % de saponina) y corresponden a valores que las categorizan como quinua amarga (>0,11% de saponinas), a su vez conocer el contenido de saponinas en estas muestras permitiría darle un valor agregado al mismo conociendo ampliamente la actividad farmacológica, antifúngica en otros.
- Los resultados muestran que el contenido de saponinas en los granos de quinua se ve influenciados por características agroclimáticas de la zona de producción. Tal es el caso de suelos con contenidos de salinidad donde se estimula síntesis de compuestos saponínicos.