



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA QUÍMICA

“OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE SAPONINAS HIDROLIZADAS PROVENIENTES DEL MOJUELO DE QUINUA AMARGA (*Chenopodium quinoa*) A PARTIR DE UNA HIDRÓLISIS ÁCIDA”

Trabajo de titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

QUÍMICA

AUTORA: NARCIZA GABRIELA BALSECA PICO

DIRECTORA: Dra. SUSANA DEL PILAR ABDO LÓPEZ

Riobamba – Ecuador
2019

Yo, Narciza Gabriela Balseca Pico declaro que el presente trabajo es de autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación, El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 24 de Julio del 2019.

Narciza Gabriela Balseca Pico

CI. 185028084-1

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE QUÍMICA

EL Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: Tipo Investigativo “**Obtención y evaluación de saponinas hidrolizadas provenientes del Mojuelo de Quinoa Amarga (*Chenopodium quinoa*) a partir de una hidrólisis ácida.**”, de responsabilidad de la señorita NARCIZA GABRIELA BALSECA PICO, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

Tribunal

Dra. Susana Abdo

DIRECTORA DEL TRABAJO DE

TITULACIÓN

BQF. Gisela Pilco

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

FIRMA

FIRMA

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi familia y seres queridos, que me han guiado y cuidado durante toda mi vida. Pero para mí es una enorme satisfacción dedicarle este trabajo a mi madre quien con mucho esfuerzo y trabajo me ha ayudado a llegar hasta este punto tan importante de mi vida, sin dejar atrás a mi hermano quien siempre me animo y empujo a seguir a delante. A mis profesores quienes me formaron con conocimientos y consejos para realizar las cosas de la mejor manera.

Gabriela Balseca

AGRADECIMIENTO

En primera instancia agradezco a mi querida y amada Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por brindarme la mejor formación con ayuda de sus docentes, que a través de un largo proceso me inculcaron valores además de conocimientos.

A la Facultad de Ciencias por brindarme las facilidades para la realización del presente trabajo, como también a mi querida tutora la Dra. Susana Abdo quien estuvo acompañándome hasta el final con su guía y consejos.

Agradezco infinitamente a mi madre quién me acompañó durante este proceso a pesar de las dificultades y tropiezos, como también a las personas que me acompañaron durante la realización de este importante proyecto.

Gabriela Balseca

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| EtOAc | Acetato de etilo |
| E.P | Éter de petróleo |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| TLC | Thin layer chromatography |
| UV | Ultravioleta |
| MeOH | Metanol |
| EtOH | Etanol |
| BuOH | Butanol |
| BAW | Butanol - Ácido acético - Agua |
| AcOH | Ácido Acético |
| AcEt | Acetato de Etilo |
| TOL | Tolueno |
| IR | Infrarrojo |
| Ss1 | Compuesto 1 |
| Ss2 | Compuesto 2 |
| Tr | Tiempo de retención |
| INIAP | Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador |

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|------|
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS | vi |
| RESUMEN..... | xvi |
| ABSTRACT | xvii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO I..... | 4 |
| 1. MARCO REFERENCIAL | 5 |
| 1.1. Quinua..... | 5 |
| 1.1.1. Historia de la Quinua..... | 5 |
| 1.1.2. Mayores productores de quinua | 5 |
| 1.1.3. Características de la episperma | 6 |
| 1.1.4. Clasificación de la quinua de acuerdo a su concentración de saponinas..... | 6 |
| 1.1.5. Principales productos y elaborados a base de quinua..... | 6 |
| 1.1.6. Importancia de la quinua en el Ecuador..... | 6 |
| 1.1.7. Variedades más cultivadas en ecuador..... | 7 |
| 1.1.8. Vías de desaponificación de la quinua..... | 8 |
| 1.1.8.1. Desaponificación por vía húmeda | 8 |
| 1.1.8.2. Desaponificación por vía seca..... | 8 |
| 1.1.9. Mojuelo de quinua..... | 8 |
| 1.1.10. Valor nutricional de la quinua | 8 |
| 1.2. Saponinas | 9 |
| 1.2.1. Clasificación de las saponinas | 10 |
| 1.2.1.1. Saponinas triterpenoides | 10 |
| 1.2.1.2. Saponinas esteroideas | 10 |
| 1.2.2. Efectos biológicos de las saponinas de la quinua | 11 |
| 1.2.2.1. Actividad membranolítica | 11 |
| 1.2.2.2. Actividad hipocolesterolémica | 11 |

| | |
|--|----|
| 1.2.2.3. Actividad adyuvante | 11 |
| 1.2.2.4. Actividad antifúngica | 11 |
| 1.2.2.5. Actividad molusquicida | 11 |
| 1.3. Sapogeninas | 12 |
| 1.3.1. Principales sapogeninas en la quinua | 12 |
| 1.3.1.1. Ácido Oleanólico..... | 12 |
| 1.3.1.2. Oleanato de metilo..... | 13 |
| 1.3.1.3. Hederagenina..... | 13 |
| 1.3.1.4. Ácido fitolaccagènico..... | 13 |
| 1.3.2. Importancia económica..... | 13 |
| 1.3.2.1. Quinua Brasil..... | 13 |
| 1.3.2.2. L'Oreal-Chimex | 14 |
| 1.3.2.3. Greentech | 14 |
| 1.3.3. Tipos de hidrólisis | 14 |
| 1.3.3.1. Hidrólisis de saponinas | 14 |
| 1.3.3.2. Hidrólisis ácida | 15 |
| 1.3.3.3. Hidrólisis Básica | 15 |
| 1.3.3.4. Hidrólisis enzimática..... | 15 |
| 1.4. Técnicas de investigación química | 16 |
| 1.4.1. Cromatografía en capa fina..... | 16 |
| 1.4.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) | 16 |
| 1.4.3. Cromatografía Preparativa | 16 |
| 1.4.3.1. Cromatografía de Placa Preparativa..... | 16 |
| 1.4.3.2. Recuperación de componentes | 17 |
| 1.5. Técnicas de identificación química | 17 |
| 1.5.1. Espectroscopia UV | 17 |
| 1.5.2. Espectroscopia IR..... | 18 |
| CAPÍTULO II..... | 19 |
| 2. MARCO METODOLÓGICO..... | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1. Delimitación del universo de la investigación | 19 |
| 2.1.2. Origen de la materia prima | 19 |
| 2.2. Diseño del experimento | 20 |
| 2.2. Unidad experimental..... | 20 |
| 2.3. Materiales, equipos y reactivos. | 20 |
| 2.3.1. Materiales..... | 21 |
| 2.3.2. Reactivos | 22 |
| 2.3.3. Equipos..... | 22 |
| 2.4. Proceso de obtención de sapogeninas | 23 |
| 2.4.1. Selección de la muestra | 23 |
| 2.4.2. Obtención de crudo de saponinas | 23 |
| 2.4.3. Análisis cualitativo de saponinas por HPLC | 24 |
| 2.4.3.1. Purificación por CC de relleno Sephadex LH-20 | 24 |
| 2.4.3.2. Control por CCF | 24 |
| 2.4.3.3. Análisis en HPLC | 25 |
| 2.4.4. Hidrólisis de las saponinas..... | 25 |
| 2.4.4.1. Control por CCF | 26 |
| 2.4.5. Purificación de sapogeninas mediante placas preparativas | 26 |
| 2.4.6. Lectura en el espectrofotómetro infrarrojo | 26 |
| 2.4.7. Identificación cualitativa de los siguientes metabolitos de interés | 27 |
| 2.4.7.1. Ensayo de Liebermann-Burchard | 27 |
| 2.4.7.2. Ensayo de Fehling..... | 27 |
| 2.4.7.3. Ensayo de Lugol | 27 |
| 2.4.7.4. Ensayo de espuma | 27 |
| 2.5. Métodos y técnicas..... | 28 |
| 2.5.1. Método científico. | 28 |
| 2.5.2. Método estadístico..... | 28 |
| CAPÍTULO III..... | 28 |
| 3. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS. | 29 |

| | |
|---|----|
| 3.1. Selección de muestra | 29 |
| 3.2. Obtención de crudo de saponinas | 30 |
| 3.3. Análisis cualitativo de saponinas por HPLC | 31 |
| 3.3.1. Purificación por CC con relleno de Sephadex LH-20 | 31 |
| 3.3.2. Análisis por HPLC | 32 |
| 3.4. Obtención de crudo de sapogeninas | 33 |
| 3.4.1. Control por CCF | 35 |
| 3.4.2. Purificación de sapogeninas mediante placas preparativas | 36 |
| 3.4.3. Lectura en el espectrofotómetro infrarrojo | 36 |
| 3.4.3.1. Resultados del espectro infrarrojo del compuesto Ss1..... | 36 |
| 3.4.3.2. Resultados del espectro infrarrojo del compuesto Ss2..... | 37 |
| 3.5. Identificación cualitativa de metabolitos de interés | 37 |
| 3.6. Conclusiones | 39 |
| 3.7. Recomendaciones | 40 |

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1-2: Diseño experimental | 20 |
| Tabla 2-2: Materiales de uso en el desarrollo de la investigación..... | 21 |
| Tabla 3-2: Reactivos de uso en el desarrollo de la investigación..... | 22 |
| Tabla 4-2: Equipos de uso en el desarrollo de la investigación | 22 |
| Tabla 1-3: Resultados del índice afrosimétrico..... | 29 |
| Tabla 2-3: Resultados de la manipulación de tiempo de hidrólisis y concentración del ácido ... | 33 |
| Tabla 3-3: ANOVA con los factores (tiempo, concentración y la interacción de ambos). | 34 |
| Tabla 4-3: Resultados de la prueba de identificación de saponinas y sapogeninas..... | 37 |
| Tabla 5-3: Características de Saponinas y Sapogeninas | 38 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1-3: Comparación de los rendimientos obtenidos en los diferentes tratamientos | 34 |
| Gráfico 2-3: Gráfica de efectos significativos..... | 35 |

ÍNDICE DE ECUACIONES

| | |
|---|----|
| Ecuación 1-2: Determinación de % saponinas | 23 |
| Ecuación 2-2: Determinación de rendimiento de saponinas | 24 |
| Ecuación 3-2: Determinación del Rf | 25 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1-1: Distribución de la producción nacional de quinua. | 7 |
| Figura 2-1: Biosíntesis de Saponinas de la quinua..... | 10 |
| Figura 3-1: Agliconas de saponinas triterpénicas de <i>Chenopodium quinoa</i> | 12 |
| Figura 4-1: Reacción de la hidrólisis ácida en las saponinas de la quinua..... | 15 |
| Figura 5-1 Diagrama de bloques de un espectrofotómetro ultravioleta | 17 |
| Figura 1-2: Mapa de la empresa Maquita Cushunchic..... | 19 |
| Figura 1-3: Placa cromatográfica de sílica gel de saponinas, fase móvil: BAW (65:35:15)..... | 31 |
| Figura 2-3: Placa cromatográfica de sílica gel de saponinas, Fase móvil: BAW (65:35:15)..... | 32 |
| Figura 3-3: Cromatograma HPLC de saponinas | 32 |
| Figura 4-3: Placa cromatográfica de sílica gel de saponinas con fase móvil AcEt – TOL – Ac. fórmico (50:50:10). | 36 |

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A. Fotografías de la extracción de saponinas.

ANEXO B. Fotografías de la extracción de sapogeninas.

ANEXO C. Cálculos de obtención de saponinas

ANEXO D. Resultados del estudio estadístico

RESUMEN

La finalidad del presente trabajo fue obtener sapogeninas de a partir de saponinas del mojuelo de quinua (*Chenopodium quinoa*) mediante hidrólisis, evaluando las mejores condiciones que permiten tener un mayor porcentaje, para lo cual se modificó el tiempo y la concentración del ácido en el proceso de hidrólisis. Se compararon tres muestras de mojuelo provenientes de empresas productoras de quinua, seleccionando la que presentó mayor cantidad de espuma y mayor tiempo de estabilidad. Para el proceso de extracción se empleó métodos estandarizados basados en una combinación de solventes y diferentes temperaturas; el crudo de saponina extraído fue fraccionado por una columna de Sephadex LH20 y evaluado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para verificar sus componentes. El crudo de saponinas se hidrolizó con la aplicación de diferentes tratamientos y variando el tiempo de hidrólisis (3, 6, 15 horas) y la concentración de ácido (1N, 2N, 3N), determinando, cómo estos factores influyen en el porcentaje de rendimiento de sapogeninas. Para la separación de los compuestos se empleó Cromatografía de capa fina (CCF) y para caracterizar los grupos funcionales espectrofotometría Infrarroja. En base al método de espuma se obtuvo que la muestra de mojuelo de quinua amarga proveniente de Calpi presentó un porcentaje del 44.98 % de saponinas. En el estudio por HPLC se identificaron dos tipos de saponinas. De los diferentes tratamientos aplicados para la hidrólisis, dos compuestos fueron aislados Ss1 y Ss2 a concentraciones de 1N y tiempo de 15 horas y fueron caracterizados por espectrofotometría Infrarroja. Finalmente, se recomienda proseguir el estudio con la eludación estructural por Resonancia magnética nuclear (RMN).

Palabras Clave

<<QUÍMICA>>, <<QUÍMICA VERDE>>, <<FUNDA FILTRANTE (MÉTODO)>>, <<SAPOGENINAS>>, <<HIDRÓLISIS>>, <<QUINUA (*Chenopodium quinoa*)>>, <<MOJUELO>>, <<ESPECTROFOTOMETRÍA INFRAROJA (IR)>>

SUMMARY

The purpose of the present research work was to obtain saponin from quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins by hydrolysis, evaluating the best conditions that allow to have a higher percentage, for which time and concentration of the acid in the hydrolysis process. Three samples of hawthorn from quinoa producing companies were compared, selecting the one with the highest amount of foam and the longest stability time. Standardized methods based on a combination of solvents and different temperatures were used for the extraction process; The extracted saponin crude was fractionated by a Sephadex LH20 column and evaluated by High performance liquid chromatography (HPLC) to verify its components. The saponin crude was hydrolysed with the application of different treatments and varying the hydrolysis time (3, 6, 15 hours) and concentration. of acid (1N, 2N, 3N), determining how these factors influence the percentage of saponin yield. Thin Layer Chromatography (TLC) was used to separate the compounds and to characterize the infrared spectrophotometry functional groups. Based on the foam method, it was obtained that the sample of bitter quinoa hawthorn from Calpi presented a percentage of 44.98% of saponins. In it he studied by HPLC two types of saponins were identified. Of the different treatments applied for hydrolysis, two compounds were isolated Ss1 and Ss2 at concentrations of 1N and time of 15 hours and were characterized by infrared spectrophotometry. Finally, it is recommended to continue the study with the structural elution by Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

Keywords:

<< CHEMISTRY >>, << GREEN CHEMISTRY >>, << FILTER COVER (METHOD)>>, <<SAPOGENINS>>, <<HYDROLYSIS>>, <<QUINOA (*Chenopodium quinoa*)>>, <<HAWTHORN>>, << INFRARED SPECTROPHOTOMETRY (IR)>>

INTRODUCCIÓN

En los últimos tiempos la quinua ha presentado relevancia a nivel mundial por su gran valor nutricional, esta planta pertenece a la familia Amarantácea y a la sub familia Chenopodiace. La semilla se considera un supercereal por contener altos porcentajes de proteínas (~15 %) también contiene minerales, carbohidratos y vitaminas (Gil-Ramirez et al., 2018, p. 54).

La quinua es una planta procedente de Sudamérica, se halla distribuida ampliamente en la cordillera de los Andes, los principales productores de quinua son Bolivia, Perú y Ecuador. Presenta propiedades de adaptación a diferentes climas, característica que es aprovechada para su cultivo. Estas peculiaridades realzan el valor nutritivo y medicinal por lo que está siendo empleado en la industria farmacéutica (Ahumada et al., 2016, pp. 438-469).

En Ecuador el cultivo de quinua (*Chenopodium quinoa*) ha ido creciendo en los últimos años, con producciones de 2400 toneladas e ingresos de \$ 10 millones, acompañado de los desechos producidos durante el lavado o escarificado de la misma. Este trabajo se centrará en los desechos sólidos y su aprovechamiento, con la extracción de saponinas (Magno, 2010, pp. 15-30)

El residuo o subproducto de la desaponificación de la quinua, es un polvo de baja densidad cuya coloración depende de la variedad a la que pertenezca la quinua, e irritante para las vías respiratorias. Químicamente el mojuelo está compuesto por saponinas triterpénicas los cuales intervienen en el metabolismo y deterioran la absorción de nutrientes (Lozano Palacios, 2014, p. 37).

En el escarificado de la quinua existen niveles altos de saponinas de tipo oleano como: el ácido oleanólico, hederagenina y el ácido deoxifiolaccagénico que son elucidados por técnicas de RMN. Estos compuestos presentan actividades biológicas (membranolítica, hipocolesterolémica y antinutricional) y farmacológicas (antiinflamatoria, antifúngica, antioxidante) (Flores et al., 2005, pp.71-74).

La principal saponina presente en las semillas de la quinua es el ácido oleanólico, ampliamente estudiado por sus propiedades farmacológicas. El interés que se presenta va en aumento, siendo así que hoy en día su precio es de 60 \$ por cada 100 mg, en China en donde se emplea para tratar trastornos del hígado (Flores et al., 2005, pp.71-74).

El proceso de industrialización de la quinua abarca diferentes etapas, primero se clasifica el grano para eliminar residuos dañinos, la escarificación para eliminar la saponina y finalmente el envasado del producto final (Quiroga Ledezma et al., 2010).

Las industrias de quinua ecuatorianas principalmente en Chimborazo no se preocupan por sus aguas residuales, eliminándolas de una manera directa a efluentes que se encuentran conectada directa o indirectamente al sistema de alcantarillado sanitario provocando un desequilibrio ecológico en los sistemas acuáticos.

Las saponinas provocan un impacto directo sobre la vida acuática debido a que actúan sobre los peces provocándoles una parálisis en las agallas (Hernández Guzmán y Hermosilla Carazo, 2014, p. 77). Una tonelada de mojuelo de quinua contiene aproximadamente 10 kg de saponinas disueltas en 6 m³ de agua, resultando en una concentración 1.5 kg/m³ de saponinas desechadas (Mercado, 2010, pp. 13).

Las saponinas se encuentran principalmente en las semillas de la quinua, y en otras concentraciones en las hojas y tallos de la planta, Ahumada et al. 2016, en su investigación empleó plantas en sus diferentes etapas de crecimiento y de distinto tipo (amarga y dulce), siendo la quinua amarga la que presenta valores más altos de saponinas (Ahumada et al., 2016, pp. 438-469).

Estudios de Lozano M., et al., en el año 2013, determinaron que los constituyentes mayoritarios de *C. quinoa* son el ácido oleanólico, oleanato de metilo, hederagenina y ácido fitolacagénico. De igual forma, se informó que la obtención de sapogeninas por hidrólisis dio resultados de 3.8% (Lozano et al., 2013, pp. 115-121).

Rojas A., y Tapia R., mencionan que el resultado de la hidrólisis del extracto seco de las saponinas cuantificados por espectroscopía UV/ VIS fue de 99.68%, mientras que en la episperma de la quinua se encuentra un 19.76% de sapogeninas (Avalos Rojas y Tapia Ramírez, 2011, pp. 1-40).

Mientras que, el estudio de Flores et al., presentó que el rendimiento de extracción de sapogeninas es del 3.8 % en el escarificado de la quinua, con la identificación del ácido oleanólico como genina principal (Flores et al., 2005, pp. 71- 74).

El objetivo del presente trabajo fue aprovechar el residuo obtenido del escarificado de la quinua (*Chenopodium quinoa*) y modificar químicamente la saponina, a través de una hidrolisis ácida, basándose en una búsqueda bibliográfica se eligió un método estandarizado para la extracción, purificación e hidrólisis de las saponinas.

Esta investigación aporta al proyecto de vinculación institucional titulado “Diseño e implementación de un proyecto de producción, transformación, comercialización y promoción de consumo de la quinua y sus derivados (proyecto interfacultades liderado por la facultad de

recursos naturales)”.

Se pretende que con el aprovechamiento de los residuos de la quinua se podría disminuir la contaminación de los efluentes cercanos a las empresas productoras de quinua, mejorando la cadena sostenible de la industria.

La innovación de este estudio, consiste en el aumento del rendimiento en el proceso de obtención de saponinas en la quinua controlando el tiempo y la concentración de ácido. Las saponinas o saponinas hidrolizadas poseen propiedades antioxidantes y surfactantes, razón por la cual son utilizadas a nivel farmacéutico y veterinario.

Para evaluar los compuestos obtenidos a través de la hidrólisis del mojuelo de la quinua amarga (*Chenopodium quinoa*), se procedió a caracterizar las saponinas hidrolizadas por espectroscopía Infrarroja, cromatografía de capa fina y se calculó el rendimiento de saponinas resultantes mediante métodos gravimétricos considerando la influencia del tiempo y la concentración del ácido.

Los beneficiarios directos de este estudio son las empresas de procesado de quinua como COPROVICH, ERPE, Maquita Cushunchic de la provincia de Chimborazo, ya que el objetivo es contribuir al aprovechamiento de los subproductos generados durante el escarificado de la quinua. La factibilidad del trabajo está dada gracias a la contribución del grupo de investigación GIPRONAF, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Obtener y evaluar las saponinas hidrolizadas provenientes del mojuelo de la quinua amarga (*Chenopodium quinoa*) a partir de una hidrólisis ácida.

Objetivos Específicos

- Evaluar el proceso de mayor eficacia para la obtención de saponinas del mojuelo de la quinua amarga a través de una metodología estandarizada.
- Determinar el tipo de saponinas obtenidas de la quinua amarga (*Chenopodium quinoa*) por HPLC.
- Comparar los resultados en la obtención de sapogeninas en la hidrólisis ácida considerando factores como la concentración del ácido y tiempo de hidrólisis.
- Caracterizar las sapogeninas extraídas a través de la Espectroscopia Infrarroja y cromatografía en capa fina.

CAPÍTULO I

1. MARCO REFERENCIAL

1.1. Quinua

El grano de la quinua presenta varias formas: cónicas, cilíndricas y elipsoidales. Se clasifica como un pseudocereal, constituido por: endosperma, perisperma y episperma, siendo el último la capa externa que recubre el grano (Quiroga Ledezma y Escalera Vásquez, 2010 pp. 49-62).

1.1.1. Historia de la Quinua

La quinua proviene de las orillas del lago Titicaca, desde allí se extendió al altiplano y valles interandinos, modificándose y adaptándose debido al clima, precipitaciones, latitud, altitud, entre otros (Mujica, 2016, pp. 15-16).

En la actualidad se conocen nueve grupos de quinua: quinua del altiplano, quinua de valles interandinos, salares, quinua de zonas áridas, secas, frías de costa, tropicales, parientes silvestres y de altas precipitaciones (Mujica, 2016, pp. 15-16).

Gracias a la adaptabilidad agroclimática de la quinua, se usó como fuente principal de alimento en las culturas precolombinas siguiéndole el maíz y la papa. Se mejoraron sus ecotipos en Bolivia, Ecuador, Colombia, Chile y Perú (Mujica, 2016, pp. 15-16).

1.1.2. Mayores productores de quinua

Bolivia, Perú y Ecuador son los mayores productores de quinua en Sudamérica, juntos produjeron 53.000 toneladas. Pero también es cultivada en Estados Unidos, Canadá y el Reino Unido (Sanchez, 2012, pp. 1-119).

1.1.3. Características de la episperma

Está formado principalmente por cuatro capas: La capa externa es rugosa, se cae fácilmente al ser frotada y ahí se encuentra la saponina cuya cantidad depende del tipo de quinua al que pertenezca, la segunda capa es muy delgada y lisa, la tercera capa es amarillenta, delgada y opaca, y la cuarta capa, está ligada al perisperma, compuesta por un estrato de células (Padrón P. et al., 2014, pp. 54).

El embrión está constituido por dos cotiledones y la radícula, ahí se encuentra el mayor porcentaje de proteína y envuelve al perisperma (Padrón P. et al., 2014, pp. 54).

1.1.4. Clasificación de la quinua de acuerdo a su concentración de saponinas

- Dulce (contenido menor de 0.11 % de saponinas) (Koziol, 1991, pp. 211-219).
- Amarga (más de 0.11 % de saponinas) (Koziol, 1991, pp. 211-219).

1.1.5. Principales productos y elaborados a base de quinua.

La quinua que se exporta sin saponina es consumida por sus propiedades nutritivas y buen sabor. Además se han desarrollado muchos productos a base de quinua que se encuentran disponibles en los mercados (Abugoch James, 2009, pp. 23-25).

Se procesan productos de la quinua con valor agregado, como: pan, galletas muffins, pasta, bocaditos, bebidas, cereales para el desayuno, cerveza, comidas para bebés, harina de quinua, entre otros (Ahamed et al., 1996, pp. 99-103).

Se desarrollaron espaguetis de quinua sin gluten con buenas características con respecto a su adhesividad y al momento de su cocción, pero no presentaba buenos resultados al ser horneado en comparación con el gluten de trigo (Caperuto et al., 2000, pp. 95-101).

1.1.6. Importancia de la quinua en el Ecuador.

En Ecuador la quinua es el principal producto exportado debido a que por su ubicación geográfica y climática no se ve afectada de una manera importante por plagas y enfermedades típicas en otros ambientes (PROECUADOR, 2015, p. 18).

En Carchi se produce el mayor porcentaje de quinua en todo el país siguiéndole Imbabura y Chimborazo. La quinua que es exportada es libre de sustancias amargas y además cuenta con una certificación orgánica y convencional (PROECUADOR, 2015, pp. 18).

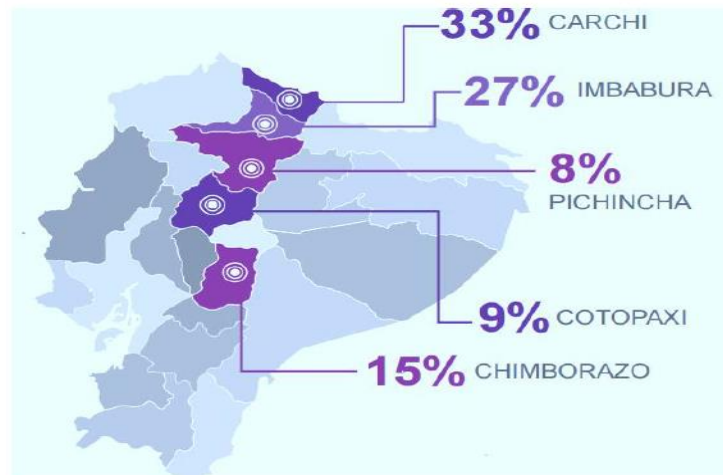


Figura 1-1: Distribución de la producción nacional de quinua.

Fuente: (MAGAP, 2015, pp. 34)

1.1.7. Variedades de quinua más cultivadas en Ecuador.

En 1986, INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador) con el programa de cultivos andinos mejoró algunas variedades de quinua con alto valor de saponinas (>0.1%) (Nieto C. et al., 1992, pp. 25).

- INIAP-Imbaya
- INIAP-Cochasquí

Después de 8 años se propuso obtener variedades con menor cantidad de saponina (<0.1%), y obtuvieron la variedad INIAP-Ingapirca e INIAP-Tunkahuan. En 2008 se obtuvo la variedad INIAP-Pata de Venado, como quinua dulce (Nieto C. et al., 1992, pp. 25).

Actualmente en el mercado se encuentra la variedad INIAP-Tunkahuan e INIAP-Pata de Venado por su adaptabilidad climática, menor cantidad de uso de agua en la desaponificación por vía húmeda y vía seca (Mamani, 2016, pp. 126)

1.1.8. Vías de desaponificación de la quinua

Por el contenido amargo de algunas variedades de quinua es necesario eliminar las saponinas de la capa exterior; existen varias formas de desaponificación de la quinua.

1.1.8.1. Desaponificación por vía húmeda

La desaponificación por vía húmeda consiste en lavados sucesivos de la quinua hasta observar la ausencia de espuma, los problemas principales de este método es su alto consumo de agua por ende altos gastos y por la contaminación que produce (Nickel et al., 2016, pp. 139-143).

Las saponinas por tener carácter anfifílico su extracción con solventes polares no tiene una eficiencia al 100 %, además del alto consumo de agua y energía (Nickel et al., 2016, pp. 139-143).

Otro proceso por vía húmeda es el lavado con hidratación, cocción y tostado de la quinua, esta extracción es ineficiente con la eliminación del 17.42 % de saponinas (Nickel et al., 2016, pp. 139-143).

1.1.8.2. Desaponificación por vía seca

El método de desaponificación por vía seca es usado para varios cereales como el trigo, el arroz y la cebada. Es capaz de remover un 20% al 30% de saponinas del pericarpio. Siendo el mejor método para la remoción de saponinas en la quinua (*Chenopodium quinoa*) (Improta and Kellems, 2001, pp. 2).

1.1.9. Mojuelo de quinua

Es el residuo o subproducto de la desaponificación de la quinua, es un polvo de baja densidad cuya coloración depende de la variedad a la que pertenezca la quinua, es irritante para las vías respiratorias. Químicamente el mojuelo está compuesto por saponinas triterpénicas, intervienen en el metabolismo y deterioran la absorción de nutrientes (Flores et al., 2005, pp. 71–77).

1.1.10. Valor nutricional de la quinua

La quinua contiene un alto valor nutricional con 20 aminoácidos esenciales, puede llegar a abastecer al organismo de proteína de alta calidad, tiene un 40% de lisina. Asimismo, un porcentaje de grasa bajo y no tiene colesterol (Rodríguez Hernández, 2015, p. 307).

La presencia de carbohidratos en la quinua es del 58 - 68 % ubicados en el perisperma. El almidón presente es cristalino con un diámetro de 2 μm y a temperatura ambiente es insoluble en agua, presenta un índice glucémico bajo (Rodríguez Hernández, 2015, p. 307).

Los minerales presentes en la quinua en mayor porcentaje son el fósforo, hierro, potasio, zinc y en menores concentraciones manganeso y calcio, se pueden encontrar además vitaminas, polifenoles que reducen el nivel de lípidos (Rodríguez Hernández, 2015, p. 307).

1.2. Saponinas

Es un metabolito secundario que pertenece a una amplia familia de compuestos constituidos por un anillo terpenoide o esteroide, (aglicona o saponina), sustituidos por oligosacáridos unidos por enlaces glucosídicos dándole un carácter anfifílico (Heng et al., 2006, pp. 326-334).

La biosíntesis de las saponinas empieza desde la condensación de tres unidades de acetil- COA para formar el ácido mevalónico, el que se fosforiliza y descarboxila, así el pirofosfato de 3-isopentenilo isomeriza al pirofosfato de γ,γ -dimetilalilo y se producen procesos de sustitución nucleofílica.

En el 3-isopentenilo su enlace nucleófilo del pirofosfato desplaza al grupo pirofosfato de geranilo, por la pérdida del protón, el monopreno se transforma en geraniol limoneno, mentol, etc., según las enzimas que tengan acción.

Si el pirofosfato de geranilo reacciona con un isopreno por acción de geranyl transferasa se genera un pirofosfato de farnesilo que es la base de los compuestos de 15 Carbonos, sesquiterpenos. Pero si reacciona otra vez el farnesil pirofosfato con el pirofosfato de 3-isopentenilo se genera un pirofosfato de geranyl-geraniol (precursor de los di terpenos).

El acoplamiento cabeza-cabeza del pirofosfato de farnesilo se forma el escualeno que por acción de la enzima escualeno sintasa genera terpenos como el dammarano, lupano, oleano, ursano, etc.

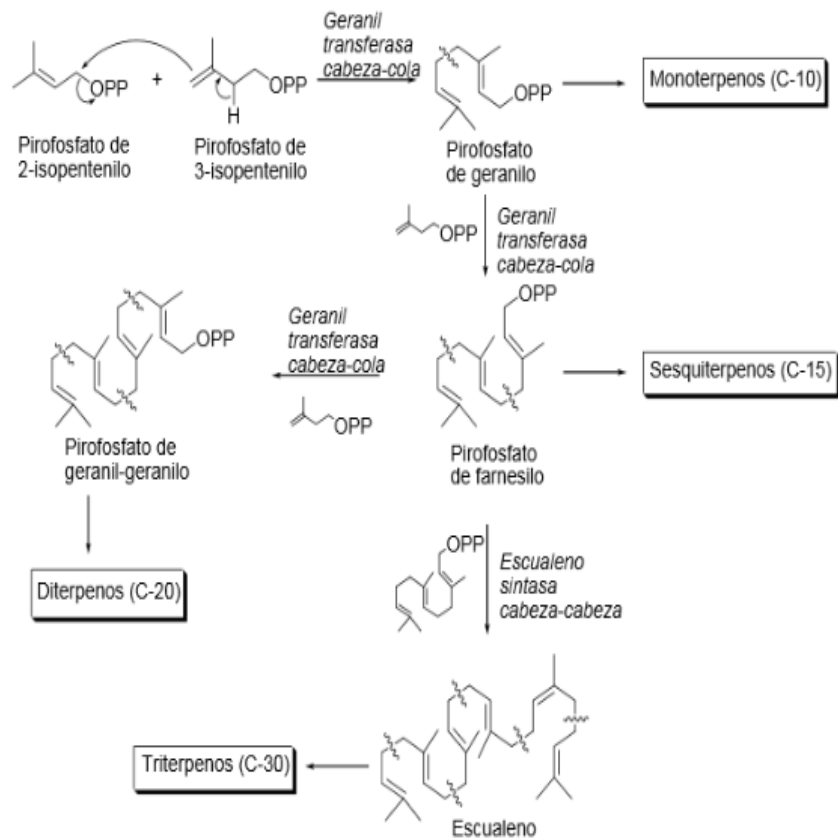


Figura 2-1: Biosíntesis de Saponinas de la quinua.

Fuente: (Alvarado Bonilla, 2015, pp. 21–22)

1.2.1. Clasificación de las saponinas

1.2.1.1. Saponinas triterpenoides

Las saponinas triterpenoides tienen una configuración de cuatro o cinco anillos de carbonos unidos a oxígenos, su estructura base es el isopreno hasta formar treinta carbonos, todas las moléculas se derivan del dammarano pudiendo ser Tetracíclicas o Pentacíclicas (Siller Juárez, 2012, pp. 26-27)

1.2.1.2. Saponinas esteroidales

Las Saponinas esteroidales están distribuidas en la familia de las monocotiledóneas, estas saponinas se dividen en dos grupos del epirostano y del furostanol (Siller Juárez, 2012, pp. 26-27).

1.2.2. Efectos biológicos de las saponinas de la quinua

1.2.2.1. Actividad membranolítica

Las saponinas de la quinua causan un incremento en la permeabilidad de la mucosa del intestino delgado, provocando la ruptura de las membranas (Gee et al., 1993, pp. 201-209).

1.2.2.2. Actividad hipocolesterolemica

Paško et al., 2010, en su estudio alimenta ratas con grandes cantidades de fructosa y luego con dosis pequeñas de semillas de quinua, muestra que el colesterol disminuye en un 26%, LDL a 57% , los triglicéridos en 11%, y la glucosa en un 10% (Paško et al., 2010, pp. 333-338).

1.2.2.3. Actividad adyuvante

El efecto adyuvante de las saponinas se debe a que ocasionan la permeabilidad de la mucosa, esto ayuda a una atracción del antígeno, por lo tanto, su viable uso como adyuvantes para vacunas (Ahumada et al., 2016, p. 456).

1.2.2.4. Actividad antifúngica

Las saponinas tienen una actividad fúngica, por el grupo funcional de la aglicona. El oligosacárido en C-3 juega un papel crítico, tanto en la permeabilización, y en la propiedad antifúngica de las saponinas (Kuljanabagavad and Wink, 2009, pp. 473-490).

1.2.2.5. Actividad molusquicida

La actividad molusquicida de las saponinas se estudiaron con pruebas en contra del GAS (caracol manzana), con las cáscaras de quinua no expusieron actividad hasta una concentración de 35 ppm de saponinas, pero el pretratamiento alcalino de las cáscaras con una concentración de 33 ppm produjo la muerte completa de los GAS (San Martín et al., 2008, ppp. 310-319).

1.3. 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 Royero, 1997, pp. 55-62).

El aglicón en las saponinas esteroidales (sapogenina) presenta el esqueleto tetracíclico característico de este tipo de compuestos, denominado gonano (ciclopentanoperhidrofenantreno) si es saturado (Guerra de León, 2005, pp. 5-6).

Su característica estructural radica en la presencia de dos anillos adicionales que se originan a 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 lo que a esta “cadena” lateral se le ha dado el nombre de cadena espirocetálica (Guerra de León, 2005, pp. 5-6).

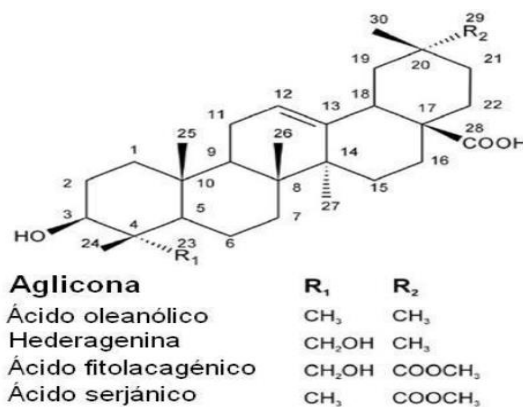


Figura 3-1: Agliconas de saponinas triterpénicas de *Chenopodium quinoa*.

Fuente: (Madl et al., 2006, pp. 438-469)

1.3.1. Principales sapogeninas en la quinua

1.3.1.1. Ácido Oleanólico

El ácido oleanólico está presente en diferentes plantas de forma glicosidada o libre, (Cano Flores, 2013, pp 9-10). Este compuesto es de gran interés debido a sus efectos biológicos antiinflamatorios anticancerígenos, antimicrobianos, etc. (Li et al., 2014, pp. 4-11).

Es un terpenoide pentacíclico usado y comercializado en China como hepatoprotector, una fuente natural de ácido oleanólico es en la fruta de olivo (Lozano et al., 2017, pp. 29-30). Su fórmula molecular es $C_{30}H_{48}O_3$, con un peso molecular de 456,70 g/mol (Lozano Palacios, 2014, pp. 63).

1.3.1.2. Oleanato de metilo

El oleanato de metilo es una sapogenina triterpénica de color blanco, de forma amorfa y soluble en cloroformo, MeOH, EtOAc /E.P al 45% v/v. Su fórmula molecular es $C_{31}H_{50}O_3$ con un peso molecular de 470.73 g/mol (Lozano Palacios, 2014, pp. 65).

1.3.1.3. Hederagenina

La Hederagenina es una sapogenina triterpénica que puede poseer un residuo triglicosidado (Herrera et al., 2007, pp. 87-89). Su estructura es cristalina y cristaliza con EtOAc/E.P, su fórmula molecular es $C_{30}H_{48}O_4$ con un peso molecular de 472.36 g/mol. (Lozano Palacios, 2014, pp. 67).

1.3.1.4. Ácido fitolaccagénico

El ácido fitolaccagénico se presenta de forma amorfa blanquizca y gelatinosa en EtOAc, soluble en metanol, su fórmula molecular es $C_{31}H_{48}O_6$, y tiene un peso molecular de 516.36 g/mol (Lozano Palacios, 2014, pp. 70).

1.3.2. Importancia económica

Las sapogeninas provenientes de la quinua son ingredientes naturales usados en la industria cosmética, varias empresas como Chimex del grupo L'Oreal de Francia y Quinoa Brasil, están presentando proyectos innovadores (Pajuelo, 2016, p. 29).

1.3.2.1. Quinoa Brasil

Es una empresa ubicada en Sao Paulo que produce granos de quinua, pero en los dos últimos años comenzaron el proyecto de saponina, la extraen del agua de lavado de la quinua y lo presentan en estado líquido (Pajuelo, 2016, p. 29).

En la actualidad elaboran productos del extracto de la quinua, tienen líneas de productos capilares, cuidados de la piel, productos bucales hasta productos de limpieza. Pero la saponina en comparación con el precio del lauril sulfato de sodio es cuatro veces mayor, actualmente se comercializa a 5 \$ el kg (Pajuelo, 2016, p. 29).

El uso de la saponina como ingrediente en diferentes productos, es beneficioso por ser biodegradable, hidratante y no producir alergias idóneo para niños. Los últimos estudios de esta empresa están encaminados en la comparación del poliglucósido con la saponina (Pajuelo, 2016, pp. 29- 30).

En los cosméticos las saponinas como el ácido oleanólico, la hederagenina y el ácido fitolaccagènico les confiere las actividades funcionales en los mismos (Pajuelo, 2016, pp. 29- 39).

1.3.2.2. L'Oreal-Chimex

Desde el 2014 la materia prima de los productos de L'Oreal procede de orígenes renovables, y en el 2015 empezó a apoyar la producción de quinua en Bolivia, para importar grandes cantidades de mojuelo a Francia con el fin de utilizarlo en sus productos cosméticos (Pajuelo, 2016, pp. 30- 31).

El resultado de las investigaciones con el mojuelo muestra que la quinua posee propiedades exfoliantes y útiles para su aplicación en diferentes productos cosméticos. (Pajuelo, 2016, pp. 30- 31).

1.3.2.3. Greentech

Es un laboratorio biotecnológico que en el 2012 empezaron sus estudios con las cascarillas de la quinua para evaluar sus efectos reafirmantes y en el cuero cabelludo

1.3.3. Tipos de hidrólisis

1.3.3.1. 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, pp. 442-443).

Las saponinas al ser hidrolizadas dan dos o seis residuos de monosacáridos y una parte carbonatada que es la aglicona del glicósido denominada sapogenina (Hernández Royero, 1997, pp. 55-62).

La sapogenina principal en la quinua liberada durante la hidrólisis es el ácido oleanólico, la hederagenina y el ácido serjanico. (Ahumada et al., 2016, pp. 438-469)

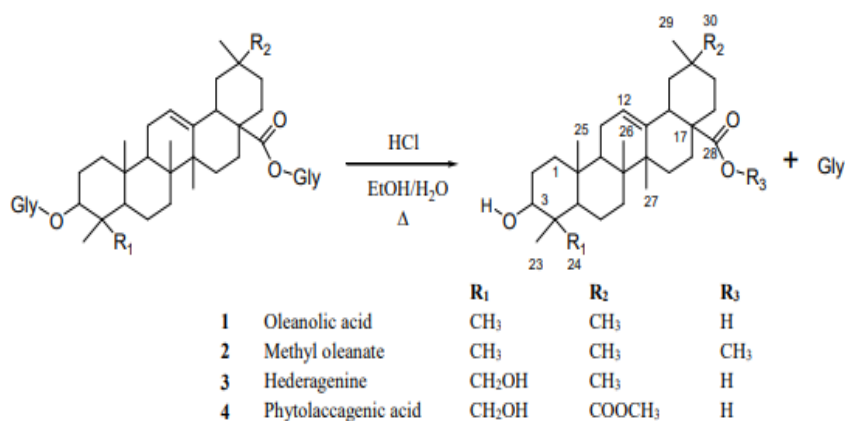


Figura 4-1: Reacción de la hidrólisis ácida en las saponinas de la quinua

Fuente: (Suxo et al., 2018, pp. 100-101)

1.3.3.2. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida de saponinas puras suele usarse para la identificación de la aglicona y sus carbohidratos individuales (Kuljanabagavad y Wink, 2009, pp. 483-484).

1.3.3.3. Hidrólisis Básica

La hidrólisis básica es un método convencional para la identificación estructural de las sapogeninas presentes en la quinua (*Chenopodium quinoa*) y para la obtención de una prosapogenina después de la escisión de un enlace éster (Kuljanabagavad y Wink, 2009, pp. 483-484).

1.3.3.4. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es la más específica para la ruptura del enlace glicosídico, con la enzima adecuada (Kuljanabagavad y Wink, 2009, pp. 483-484). La enzima que se utiliza es la β -glucosidasa, este tipo de hidrólisis es monitorizada por TLC durante 4 a 5 días (Ma et al., 1989, pp. 1135).

.4. Técnicas de investigación química

1.4.1. Cromatografía en capa fina

La Cromatografía en capa fina o CCF tiene dos fases, una sólida que es la fase estacionaria que tiene un grosor de entre 0.10 a 0.25 mm, para aislar compuestos el grosor debe estar entre los 0.5-2.0 mm y la fase móvil es un líquido o solvente. Los soportes usados son vidrio, aluminio y plástico por su flexibilidad. (Guarnizo Franco y Martínez Yepes, 2013, pp. 101–102)

1.4.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución o HPLC consiste elementalmente por un sistema de distribución para el disolvente, válvula de inyección para la muestra columna cromatográfica, detector, y un control del sistema para registrar datos. (Santiago Rivas, 2007, pp. 190-192).

Las columnas utilizadas para HPLC son de vidrio, acero y plástico, con longitudes de 5 y 30 cm y con diámetros de 1-5 mm. Las columnas cromatográficas se degradan fácilmente por lo que se utilizan pre columnas que evitan que los compuestos no deseados lleguen a la columna de análisis (Santiago Rivas, 2007, pp. 190-192).

Cuando la columna se calienta la viscosidad de la fase móvil disminuye reduciendo la presión, y los tiempos de retención (Santiago Rivas, 2007, pp. 190-192).

1.4.3. Cromatografía Preparativa

Se utiliza para la purificación o separación de componentes de interés, las columnas o placas deben tener una buena cantidad de fase estacionaria, que usualmente se usan en analítica, en cromatografía de papel preparativa se utiliza papel Whatman que tiene mayor cantidad de celulosa (Villegas Caseres et al., 2006, pp. 3-7).

1.4.3.1. Cromatografía de Placa Preparativa

Se usan placas con un espesor de 2 mm generalmente. La muestra se coloca con aplicadores de teflón que inyectan 10 microlitros a una longitud de 1 pulgada (Villegas Caseres et al., 2006, pp. 3-7).

1.4.3.2. Recuperación de componentes

Cuando ya se ha corrido la muestra en la placa cromatográfica se revela con luz UV o con reactivos químicos, pero solo una pequeña parte de lámina (Villegas Caseres et al., 2006, pp. 3-7).

Se marcan las secciones donde se encuentre el compuesto de interés y se recorta para raspar esa porción de la placa, luego se concentra el compuesto por evaporación reducida si se tiene componentes termolábiles (Villegas Caseres et al., 2006, pp. 3-7).

1.5. Técnicas de identificación química

1.5.1. Espectroscopia UV

Es una técnica analítica que determina la concentración de un compuesto en una solución, las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas midiendo la cantidad de luz absorbida (Díaz et al., 2016, pp. 1-2).

Está basada en las transiciones electrónicas, más frecuentes son de un orbital no enlazante a uno π^* o simplemente a un orbital π a uno π^* , estos saltos requieren energías de 80 a 150 Kcal/mol (Durst and Gokel, 1985, pp. 130).

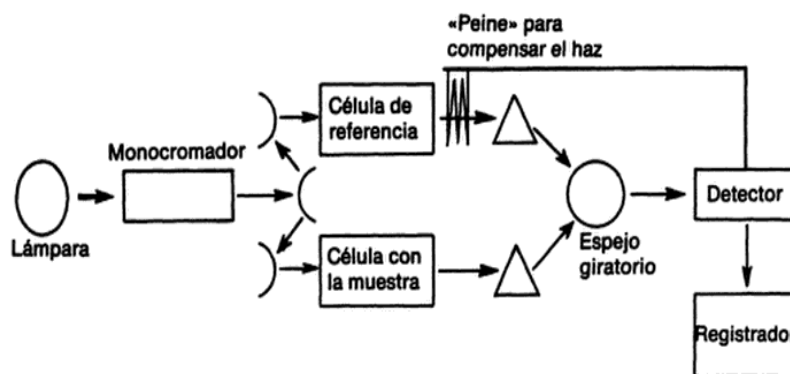


Figura 5-1 Diagrama de bloques de un espectrofotómetro ultravioleta

Fuente: (Durst and Gokel, 1, pp. 141)

1.5.2. Espectroscopia IR

La espectroscopia infrarroja se basa en las interacciones de energía relativamente baja, es sensible a los cambios de la geometría molecular es decir a la flexión y vibración de los enlaces interatómicos que necesitan energías de 2 a 15 Kcal/mol, la absorción se encuentra entre los 4000 a 600 cm^{-1} (Durst and Gokel, 1985, pp. 130).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Delimitación del universo de la investigación

La investigación se ejecutó en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en el laboratorio de Productos Naturales.

2.1.2. Origen de la materia prima

La materia prima utilizada fue el mojuelo de quinua amarga (*Chenopodium quinoa*), proporcionada por la empresa Maquita Cushunchic ubicada en la parroquia Calpi del cantón Riobamba.

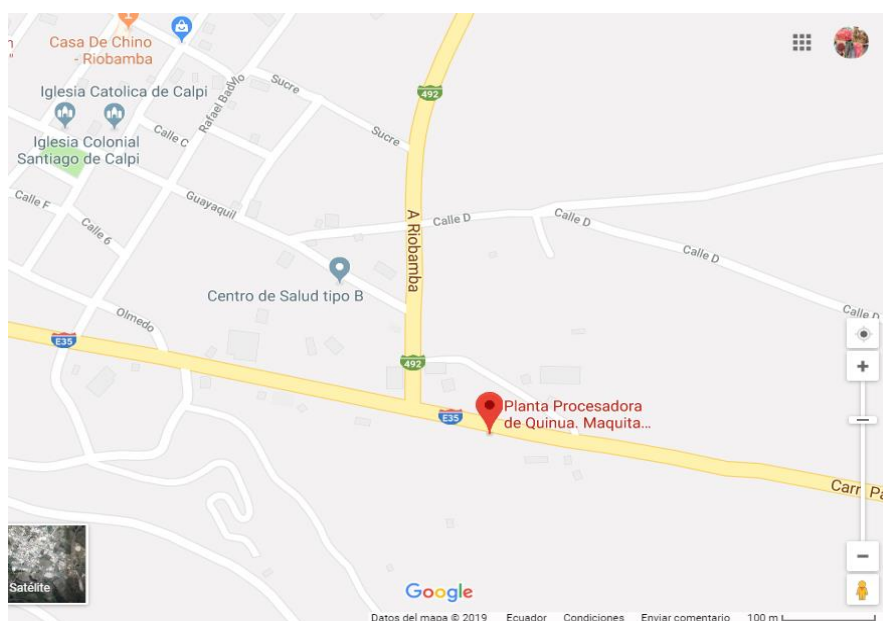


Figura 1-2: Mapa de la empresa Maquita Cushunchic.

Realizado por: Gabriela Balseca, 2019

2.2. Diseño del experimento

El experimento de la investigación se realizó con un diseño al azar, donde se controló el tiempo de hidrólisis y la concentración del ácido, con el fin de determinar cuál es su efecto en el porcentaje de rendimiento de saponinas durante el proceso de hidrólisis ácida en el crudo de saponinas extraídas del mojuelo de la quinua amarga.

Tabla 1-2: Diseño experimental

| EXPERIMENTO | Factor 1 Concentración del ácido | Factor 2 Tiempo de Hidrólisis | R1 | R2 | R3 |
|-------------|--|-------------------------------------|------|------|------|
| 1 | 1 N | 15 HORAS | r1-1 | r2-1 | r3-1 |
| 2 | 1 N | 6 HORAS | r1-2 | r2-2 | r3-2 |
| 3 | 1 N | 3 HORAS | r1-3 | r2-3 | r3-3 |
| 4 | 2 N | 15 HORAS | r1-4 | r2-4 | r3-4 |
| 5 | 2 N | 6 HORAS | r1-5 | r2-5 | r3-5 |
| 6 | 2 N | 3 HORAS | r1-6 | r2-6 | r3-6 |
| 7 | 3 N | 15 HORAS | r1-7 | r2-7 | r3-7 |
| 8 | 3 N | 6 HORAS | r1-8 | r2-8 | r3-8 |
| 9 | 3 N | 3 HORAS | r1-9 | r2-9 | r3-9 |

Realizado por: Balseca Gabriela, 2019

2.2. Unidad experimental.

Se usó un kilogramo de mojuelo de quinua en los diferentes análisis. Se requirieron 9 unidades experimentales con tres repeticiones.

2.3. Materiales, equipos y reactivos.

Los materiales, equipos y reactivos utilizados durante todo el proceso del presente trabajo son descritos en las tablas 2-2, 3-2, 4-2, respectivamente.

2.3.1. Materiales

Tabla 2-2: Materiales de uso en el desarrollo de la investigación

| Materiales | Cantidad | Descripción |
|----------------------------------|----------|--|
| Embudo de vidrio simple | 2 | Pírex, vidrio |
| Vasos de 250 ml | 6 | Overol, Pírex vidrio |
| Vasos de 100 ml | 4 | Overol, Pírex vidrio |
| Refrigerante | 3 | Vidrio |
| Balón esmerilado de 250 ml | 3 | Overol, Pírex vidrio |
| Reverbero | 3 | Metálico eléctrico |
| Mangueras | 6 | Plástico |
| Vaso de precipitación de 1000 ml | 2 | Overol, Pírex vidrio |
| Kitasato | 1 | Pírex vidrio |
| Embudo Buchner | 1 | VG, mediano modelo 3-3504 |
| Embudo de separación | 2 | Embudo de separación Squibb con llave de teflón |
| Tubos de centrifuga | 36 | HACH |
| Tubos de ensayo | 36 | Pírex vidrio |
| Gradilla | 2 | Metálica |
| Cristalizadores | 4 | Pírex vidrio |
| Pipetas Gradadas de 10 ml | 5 | Overol, Pírex vidrio |
| Frascos de vidrio | 5 | Vidrio |
| Probetas 100ml | 2 | Overol, Pírex vidrio |
| Papel Aluminio | 2 | rollos |
| Toallas absorbentes | 2 | rollos |
| Espátula | 2 | Espátula de cucharilla |
| Cámara cromatográfica | 1 | Vidrio |
| Tamices | 2 | Metálicos |
| Placas Cromatográficas | 5 | Fluka, Silica gel matrix con indicador de fluorescencia 254 nm |

Realizado por: Balseca Gabriela, 2019

2.3.2. Reactivos

Tabla 3-2: Reactivos de uso en el desarrollo de la investigación

| Reactivos | Pureza | Aplicación |
|----------------------------------|-------------------|--|
| Metanol | Químicamente puro | Cristalización y precipitación del almidón |
| Ácido Clorhídrico 3 N | Para análisis | Hidrólisis |
| Hidróxido de Sodio 1N | Para análisis | Hidrólisis |
| Acetato de etilo | Químicamente puro | Cromatografía preparativa y TLC |
| Ácido fórmico | Químicamente puro | Cromatografía preparativa y TLC |
| Ácido sulfúrico | Para análisis | Revelador |
| Reactivo de Lieberman Buchard | Para análisis | Identificación de triterpenos |
| Reactivo de Yodo | Para análisis | Identificación de almidón |
| Vainillina al 5% | Para análisis | Revelador |
| Ácido sulfúrico al 5% en | Para análisis | Revelador |
| Etanol | Para análisis | Preparación soluciones |
| Tolueno | Químicamente puro | Cromatografía preparativa y TLC |
| Fehling A | Para análisis | Identificación de azúcares reductores |
| Fehling B | Para análisis | Identificación de azúcares reductores |
| Agua | Bidestilada | Todo el proceso |

Realizado por: Balseca Gabriela, 2019

2.3.3. Equipos

Tabla 4-2: Equipos de uso en el desarrollo de la investigación

| Equipos | Descripción |
|------------------------------|---|
| Estufa | Memert, modelo SBN 400 |
| Rotavapor | Heildolph, modelo 560-01510-00 |
| PHmetro | Fisher Scientific, modelo AB150 |
| Centrífuga | DYNAC, modelo 0101 |
| Espectrofotómetro Infrarrojo | Jasco, modelo FT/IR-4100 |
| Balanza analítica | RADWAG, modelo As 220. R2 |
| Bomba de vacío | Gast, modelo 1HAB-25-M109X |
| Desecador | Borde plano con tapa y placa de porcelana |
| Vortex | Gallenkamp Spinmix, modelo SI.100 |
| HPLC | Agilent 1100 series |

Realizado por: Balseca Gabriela, 2019

2.4. Proceso de obtención de saponinas

2.4.1. Selección de la muestra

Se realizó una comparación previa de tres muestras provenientes de: Maquita Cushunchic, COPROVICH, y de quinua roja de Bolivia, se aplicó la prueba afrosimétrica respectivamente, con el fin de seleccionar la que tenga mayor contenido de saponinas para proceder con los siguientes análisis de la investigación.

El método de espuma se siguió de la siguiente manera, se pesó 0,5 g de mojuelo ($\pm 0,0001$ g) en un tubo de 16 cm X 16 mm de diámetro, se añadió 5 ml de agua destilada y se agitó por 30 segundos. Se reposó los tubos de 5 a 10 segundos y se registró la altura de la espuma (Koziol, 1991, pp. 217-218).

Se aplicó la siguiente fórmula, para expresar en porcentaje, la cantidad de saponinas:

$$Ps = \frac{(0.646 \times h) - 0.104}{m \times 10}$$

Ecuación 1-2: Determinación de % saponinas

Fuente: ((INEN), 1988, p. 3)

Donde:

Ps: porcentaje de saponinas (%)

h: altura de la espuma (cm)

m: masa de la muestra (g)

2.4.2. Obtención de crudo de saponinas

Para la obtención del crudo de saponinas se siguió la metodología descrita por Lozano et al., 2012, con una ligera modificación, solo se utilizó como solvente de extracción agua más no la mezcla de EtOH/H₂O como sugiere la técnica.

Se partió de 100 g de mojuelo, tamizado con anterioridad, se colocó en una bolsa de tela (simulando una bolsita de té) se sumergió en un litro de agua a 30 °C por 3 horas con agitación constante (Lozano et al., 2012, p. 133).

El líquido remanente se filtró y después se precipitó el almidón con etanol caliente, posteriormente se centrifugó el líquido como indica Bonifaz, 2010, por cinco minutos a 5000 rpm, se filtró con zeolita y finalmente se llevó a sequedad, se obtuvo un polvo amarillento que se pesó para calcular el rendimiento (Bonifaz, 2010, p. 64).

El porcentaje de rendimiento se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Crudo de saponina} = \frac{\text{Peso final}}{\text{Peso de partida}} \times 100$$

Ecuación 2-2: Determinación de rendimiento de saponinas

Fuente: (Flores et al., 2013, pp. 47-51)

2.4.3. Análisis cualitativo de saponinas por HPLC

2.4.3.1. Purificación por CC de relleno Sephadex LH-20

Primero se preparó la columna, se pesó 12.5 gramos de Sephadex LH-20, se diluyó en acetona suavemente para no romper el polímero, se dejó hidratar por al menos tres horas. Para el empaquetamiento de la columna se colocó lana de vidrio y se agregó el Sephadex LH-20 con ayuda de una pipeta pasteur de manera circular (Carr et al., 1971, p. 358).

Se preparó la muestra diluyendo 0.24 gramos del crudo de saponina en 25 ml acetona y se colocó suavemente de manera circular para que corra en el Sephadex, el disolvente se adicionó a 4 cm por arriba de la fracción superior del Sephadex (Carr et al., 1971, p. 358).

La altura del disolvente se mantuvo colocando el depósito con el solvente en la parte superior de la columna. Con la aplicación del disolvente que contiene la muestra, se recogieron fracciones de 5 ml hasta que ya no exista la presencia de la muestra (Carr et al., 1971, p. 358).

2.4.3.2. Control por CCF

En el control por CCF de las fracciones se utilizó placas de silica gel en soporte de aluminio, como fase móvil BAW (BuOH - AcOH - H₂O, 65:35:15). El agente revelador fue una mezcla de vainillina al 0.5% y ácido sulfúrico al 5% en EtOH (Waksmundzka-Hajnos et al., 2008, p. 524).

El valor de Rf se calculó con la siguiente formula:

$$Rf = \frac{\textit{Distancia recorrida por el soluto}}{\textit{Distancia recorrida por el solvente}}$$

Ecuación 3-2: Determinación del Rf

Fuente: (Vyas and Argal, 2014, p. 189)

2.4.3.3. Análisis en HPLC

Para el análisis de la separación de saponinas se empleó el equipo HPLC Agilent 1100 series. Se siguió la metodología de Lozano et al., 2012, que consistió en determinar las condiciones instrumentales a una temperatura de 37 °C, longitud de onda a 220 nm, y volumen de inyección a 15 µl (Lozano et al., 2012, p. 137).

Se inyectó la muestra preparada a una concentración de 10 ppm en agua bidestilada de la fracción mayoritaria, la fase móvil usada fue acetonitrilo que fue desgasificada con ultrasonido por 5 minutos, y a un flujo constante de 2 µl/min durante 15 min, se usó una columna Kromasil RPC18 de 457mm X 2mm (Lozano et al., 2012, p. 137).

2.4.4. Hidrólisis de las saponinas

Para la hidrólisis de las saponinas se siguió la metodología de Lozano Palacios, 2014. Se tomó cinco gramos del crudo de saponinas y se diluyó en 50 ml de agua desionizada, se agregó 25 ml de HCl 1N, se dejó en reflujo por 15 horas, y la temperatura del reflujo a 80°C (Lozano Palacios, 2014, p. 59).

Se tomó y refrescó el precipitado con agua y se igualó el pH a 5- 6.5, se secó a una temperatura de 40 a 50°C por seis horas. Se pesó las saponinas obtenidas, finalmente se purificó por cristalización con metanol caliente. El proceso de precipitación y cristalización se repitió tres veces. Para el cálculo del porcentaje de rendimiento se usó la ecuación 2-2 (Lozano Palacios, 2014, p. 59).

Se controló el tiempo y la concentración del ácido para determinar si existe un efecto significativo en el porcentaje de obtención de sapogeninas. Para la concentración del ácido se utilizó concentraciones de 1N, 2N y 3N, que se combinaron con diferentes tiempos de hidrólisis de 15, 6 y 3 horas. Cada ensayo se repitió 3 veces y se controlaron por CCF.

2.4.4.1. Control por CCF

Para el control por CCF de las sapogeninas totales se utilizó placas de silica gel en soporte de aluminio, como fase móvil Acetato de etilo – Tolueno - ácido fórmico (50:50:10). El agente revelador fue vainillina al 5% y ácido sulfúrico al 5% en EtOH (Wagner y Bladt, 1996, p. 336). El Rf correspondiente se determinó con la ecuación 3-2.

2.4.5. Purificación de sapogeninas mediante placas preparativas

Se tomó 0.010 gramos del crudo de sapogeninas y se diluyó en 10 ml de acetato de etilo, con ayuda de una punta de vidrio se sembró la muestra en una placa cromatográfica pre-recubierta de silica gel de 20 x 10 cm, se usó la fase móvil compuesta por acetato de etilo, tolueno, y ácido fórmico en relación 50:50:10 (Wagner y Bladt, 1996, p. 336).

Se reveló solo un extremo de la placa, con vainillina al 0.5% y ácido sulfúrico al 5% en EtOH, hasta llegar a los 120 °C. Una vez revelado se señaló con un lápiz los compuestos de interés denominados Ss1 y Ss2; se recortó y raspó las regiones marcadas. Se lavó repetidas veces con acetato de etilo y se dejó secar (Torres Gómez, 2011, pp. 15-22).

Se tomó las muestras secas para ser leídas en el espectrofotómetro infrarrojo.

2.4.6. Lectura en el espectrofotómetro infrarrojo

Los compuestos Ss1 y Ss2 fueron aislados mediante cromatografía preparativa. Los espectros fueron leídos en el Espectrofotómetro Infrarrojo Jasco, modelo FT/IR-4100, del laboratorio de química analítica de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, y luego se comparó con espectros ya existentes de bibliografía.

Para el respectivo análisis se tomó la muestra sólida y se colocó en el equipo para que los espectros fueran registrados en absorbancia 4 000 a 400 cm⁻¹.

2.4.7. Identificación cualitativa de los siguientes metabolitos de interés

Se realizó ensayos convenientes para la identificación de Triterpenoides, saponinas, azúcares, y sapogeninas.

2.4.7.1. Ensayo de Liebermann-Burchard

Fundamento: Identifica triterpenoides o esteroides.

Proceso: Se tomó una alícuota del extracto seco de la muestra y luego se le adicionó 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo de ensayo. Es positivo si cambia de coloración a violeta (Pooja and Vidyasagar, 2016, p. 40).

2.4.7.2. Ensayo de Fehling

Fundamento: Reconoce la presencia de azúcares reductores.

Proceso: Se disolvió la muestra y se adicionó 3 ml del reactivo Fehling A y Fehling B respectivamente, luego se calentó a baño maría por cinco minutos, la prueba es positiva si se forma un precipitado rojo. Fehling A y Fehling B se prepararon de la siguiente manera (Durst y Gokel, 1985, p. 144).

- Fehling A: Se disolvió 34,66 g de sulfato cúprico, en agua para obtener 500 ml (ANMAT, 2003, p. 604).
- Fehling B: Se diluyó 173 g de tartrato de sodio, potasio cristalizado y 50 g de hidróxido de sodio en agua 500 ml (ANMAT, 2003, p. 604).

2.4.7.3. Ensayo de Lugol

Fundamento: Identifica la presencia de almidón en la muestra.

Proceso: Se colocó dos gotitas de yodo en una alícuota de la muestra. El ensayo es positivo si se torna de una coloración azul intensa (Martín-Sánchez et al., 2013, p. 35).

2.4.7.4. Ensayo de espuma

Fundamento: Permite identificar la presencia de saponinas en una muestra.

Proceso: Se pesó 0.5 g de muestra, se añadió 5 ml de agua destilada y se agitó robustamente por 30 segundos. Se dejó reposar los tubos de 5 a 10 segundos y se leyó la altura de la espuma,

utilizando una regla con precisión de 0.1 cm (Koziol, 1991, pp. 217-218).

2.5. Métodos y técnicas

2.5.1. Método científico.

Condiciones adecuadas para la obtención de un buen porcentaje de sapogeninas provenientes del mojuelo de quinua.

2.5.2. Método estadístico.

El diseño de la investigación fue experimental, con un diseño al azar, con la manipulación de las variables tiempo de hidrólisis y concentración del ácido, los resultados de los diferentes tratamientos se analizaron con ANOVA. Se empleó el software estadístico minitab y Excel.

CAPÍTULO III

3. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

3.1. Selección de muestra

En la tabla 1-3 se observan los resultados de la prueba afrosimétrica, la muestra de Maquita Cushunchic presenta 41.91 %, COPROVICH 11.44 % y la quinua roja de Bolivia 26.43 % de saponinas, respectivamente. Únicamente la muestra de Maquita Cushunchic presentó espuma estable y con altura considerable a comparación de las otras muestras analizadas.

Estos resultados son semejantes al de Lozano et al., 2012 que muestra resultados de 37.9% – 57.0% de saponinas en el escarificado (Lozano et al., 2012, pp. 134-136).

Tabla 1-3: Resultados del índice afrosimétrico

| Muestra | Nº Repeticiones | Altura de la espuma en cm | Promedio | Saponina % |
|------------------------|-----------------|---------------------------|------------|------------|
| Maquita Cushunchic | 1 | 3.9 | 3.6 ± 0.3 | 41.91 |
| | 2 | 3.6 | | |
| | 3 | 3.3 | | |
| COPROVICH | 1 | 1.3 | 1.1 ± 0.2 | 11.44 |
| | 2 | 0.9 | | |
| | 3 | 1.1 | | |
| Quinoa roja de Bolivia | 1 | 2.2 | 2.33 ± 0.3 | 26.43 |
| | 2 | 2.1 | | |
| | 3 | 2.7 | | |

Realizado por: Balseca Gabriela, 2019

El estado físico del mojuelo de Maquita Cushunchic fue homogéneo similar a la muestra de quinua roja de Bolivia, mientras que el mojuelo de COPROVICH contenía impurezas como ramas y granos. Por esta razón se seleccionó la primera muestra como la más apta para continuar con la investigación. Los cálculos pertinentes se encuentran detallados en el anexo C.

3.2. Obtención de crudo de saponinas

Se inició el proceso con soluciones extractivas de mezclas EtOH/H₂O en diferentes proporciones (50/50, 75/25, 25/75), sin embargo, solo se utilizó el solvente con H₂O, debido a que la mezcla EtOH/H₂O provocaba que la cantidad de espuma y la estabilidad disminuyese, e interfería en los resultados del índice afrosimétrico dando falsos positivos.

Salager et al. 1999 explica en su estudio que la presencia de sustancias como alcohol o éter reducen considerablemente la estabilidad y formación de la espuma, pues reducen el efecto Gibbs-Marangoni (Salager et al., 1999 p. 7).

La estabilidad de la espuma está condicionada por el efecto Gibb-Marangoni, que aumenta la resistencia del film viscoelástico, que está formado por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, si se deforma esta película líquida la coalescencia de la burbuja es inevitable (Mangas Alonso et al., 2010, pp. 245-250).

Posteriormente, los resultados de la extracción a temperaturas de 70 °C, 45°C y 30°C, mostraron que a más altas temperaturas la solución se tornaba viscosa y turbia, interfiriendo en el proceso de filtración. Mientras que a temperatura ambiente no existió inconvenientes para el filtrado, por lo que se determinó la temperatura ambiente como la óptima para seguir con el estudio.

Las temperaturas altas hacen que el almidón de la muestra se gelatinice, como indica Espitita et al. 2016, a partir de los 35 °C en adelante aumenta la viscosidad, entrando al rango de gelatinización, con un mayor pico de viscosidad a los 90 °C (Espitia et al., 2016, pp. 32-34).

El almidón empieza a suspenderse por el proceso de gelatinización aumentando la viscosidad con una disrupción y pérdida de cristalinidad por la desnaturalización de la molécula. En las zonas amorfas del gránulo los puentes de hidrógeno intermoleculares vibran y se rompen, como consecuencia ocurre una absorción irreversible de agua ligándose a la estructura (Pineda et al., 2010, pp. 131-132).

En la CCF se obtuvo R_f de 0.79, 0.697 y 0.58, se presentaron manchas definidas y nítidas con coloraciones violetas y amarillas, los resultados son consistentes con los señalados por Wagner y Bladt, 1996, quienes afirman que las saponinas triterpénicas presentan zonas de color marrón o violeta en el rango de 0.2-0.75. Además de algunas zonas violetas adicionales de R_f, en un rango de 0.75-0.8, y R_f de 0.05-0.45 (Wagner y Bladt, 1996, p. 317), como muestra la fig. 1-3.

Finalmente, con la ecuación 2-2 se obtuvo un porcentaje del 44.98 % p/p de crudo de saponinas en relación con las presentadas en el mojuelo. Este resultado supera los datos expuestos por Lozano et al. 2012, quién indica que el % saponinas en el mojuelo de quinua varía desde los 37 % hasta 57 % (Lozano et al., 2012, p. 131).



Figura 1-3: Placa cromatográfica de silica gel de saponinas, fase móvil: BAW (65:35:15)

Fuente: Balseca Gabriela, 2019

3.3. Análisis cualitativo de saponinas por HPLC

3.3.1. Purificación por CC con relleno de Sephadex LH-20

Primero, se determinó las condiciones para la fase estacionaria (Sephadex LH-20), calculando el volumen de soporte de la columna y la cantidad de muestra a utilizar.

Se realizó pruebas de solubilidad del crudo de saponinas, para establecer la fase móvil, siendo solubles en agua y en acetona, e insolubles en metanol. El resultado de las pruebas de solubilidad concuerda con la explicación de Mac Donald et al., 2017, quien indica que la solubilidad de las saponinas en agua esta facilitada por la presencia de grupos polares en la aglicona, y su alto peso molecular (Mac Donald et al., 2017, p. 33).

Luego de proceder como se indicó en la sección 2.5.3.1 se recolectaron 100 fracciones (5ml cada una) para ser analizadas por TLC. Las muestras fueron colocadas en la placa se usó como fase móvil BAW (65:35:15) y se reveló con vainillina al 5% y ácido sulfúrico al 5% en EtOH a una temperatura de 120 °C.

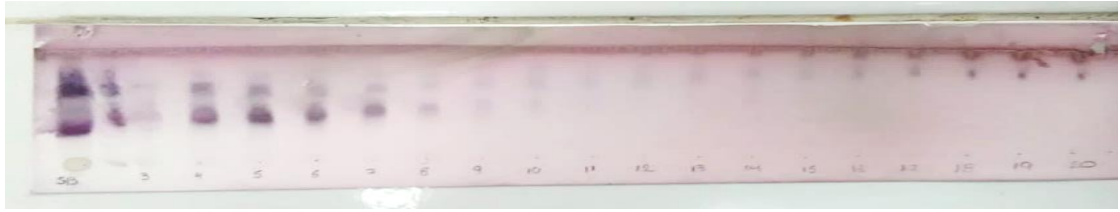


Figura 2-3: Placa cromatográfica de silica gel de saponinas, Fase móvil: BAW (65:35:15)

Fuente: Balseca Gabriela, 2019

De las 100 fracciones obtenidas se agruparon aquellas con Rf igual; las seis fracciones semejantes fueron concentradas en el rotavapor, a continuación, se pesó y se colocó en un desecador. La primera fracción se obtuvo en mayor cantidad considerándose para los siguientes análisis.

3.3.2. Análisis por HPLC

La caracterización por HPLC se realizó en base a la metodología de Lozano et al, 2012. Primero se inyectó una solución de saponinas a una concentración de 10 ppm y se obtuvo un cromatograma con dos picos en tiempos de retención (Tr) diferentes, el primer pico apareció a los 1.050 minutos con un área de 324.7280, y el segundo a los 2.016 minutos con un área de 597.3060, se utilizó una columna Kromasil RPC18 (Lozano et al., 2012, p. 137).

El primer tiempo de retención indica que el compuesto tiene una polaridad mayor a la del segundo, se puede especular que se debe a la cantidad de azúcares unidos a la estructura. Oleszek et al., 1990, indica que las saponinas son mono y bisdesmosídicas, y presentan dos picos representativos uno pequeño y uno grande como los que se muestra en la fig. 3-3 (Oleszek et al., 1990, p. 115).

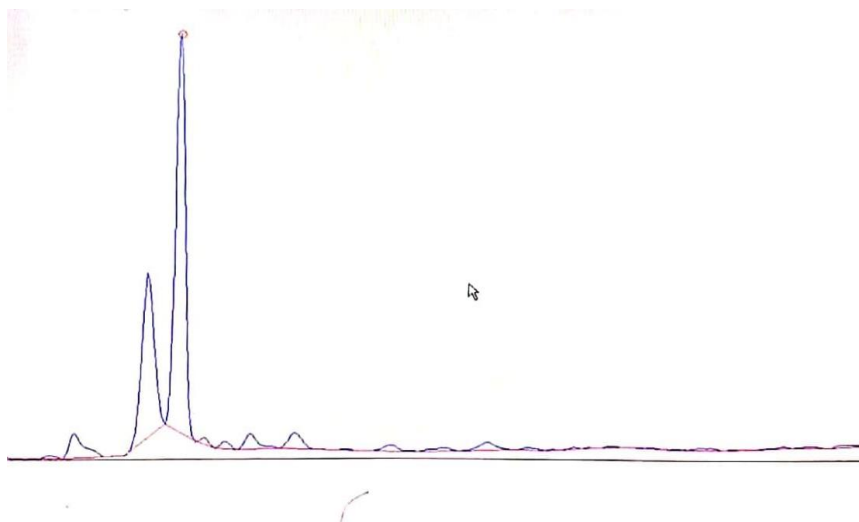


Figura 3-3: Cromatograma HPLC de saponinas

Fuente: Balseca Gabriela, 2019

3.4. Obtención de crudo de saponinas

Para la hidrólisis de la saponina se corrigió la temperatura del reflujo, se fijó en 80°C, pues a temperatura ambiente se conseguía una hidrólisis incompleta, se utilizó como catalizador de la reacción el calor como indica Lozano Palacios, 2014, de igual forma por cada gramo de crudo de saponinas se usó 25 ml de ácido (Lozano Palacios, 2014, p. 59).

Para el diseño estadístico se varió el tiempo de hidrólisis (3h, 6h y 15h) y la concentración del ácido (1N, 2N y 3N). Los resultados de los diferentes tiempos de hidrólisis muestran que a menor tiempo la hidrólisis no fue completa, en el control de CCF las manchas no fueron definidas y tenían largas colas. A las 15 horas se obtuvo cromatografías con resolución en sus manchas y ausencia de colas.

En lo referente a la concentración del ácido Domínguez et al., 2011, indica que la velocidad de reacción (k) tiene una conducta exponencial solo para las concentraciones pequeñas debido a una degradación de los azúcares reductores, por esta razón la concentración 1N tuvo mejores resultados (Domínguez et al., 2011, p. 156).

Tabla 2-3: Resultados de la manipulación de tiempo de hidrólisis y concentración del ácido

| No | Peso de saponinas (g) | Tiempo de hidrólisis (horas) | Concentración de HCl | Peso promedio de saponinas (g) | Rendimiento (%) |
|----|-----------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------|-----------------|
| 1 | 1.0021 | 3 | 1N | 0.3477 ± 0.0001 | 34.70 |
| 2 | 1.0017 | 3 | 2N | 0.3482 ± 0.0002 | 34.76 |
| 3 | 1.0020 | 3 | 3N | 0.3509 ± 0.0001 | 35.01 |
| 4 | 1.0010 | 6 | 1N | 0.3780 ± 0.0001 | 37.76 |
| 5 | 1.0008 | 6 | 2N | 0.3853 ± 0.0002 | 38.50 |
| 6 | 1.0001 | 6 | 3N | 0.4381 ± 0.0001 | 43.80 |
| 7 | 1.0008 | 15 | 1N | 0.4411 ± 0.0001 | 44.03 |
| 8 | 1.0018 | 15 | 2N | 0.4376 ± 0.0002 | 43.68 |
| 9 | 1.0005 | 15 | 3N | 0.4552 ± 0.0003 | 45.50 |

Elaborado: Balseca Gabriela, 2019

El tratamiento con resultados estadísticamente significativos fueron 1N y 15 horas, el cual presentó un elevado porcentaje de rendimiento (tabla 2-3). Los cristales obtenidos fueron de color blanquecino con una forma irregular y un punto de fusión de 312-314°C, concordante con Lozano Palacios, 2014, (Lozano Palacios, 2014 p. 62-63).

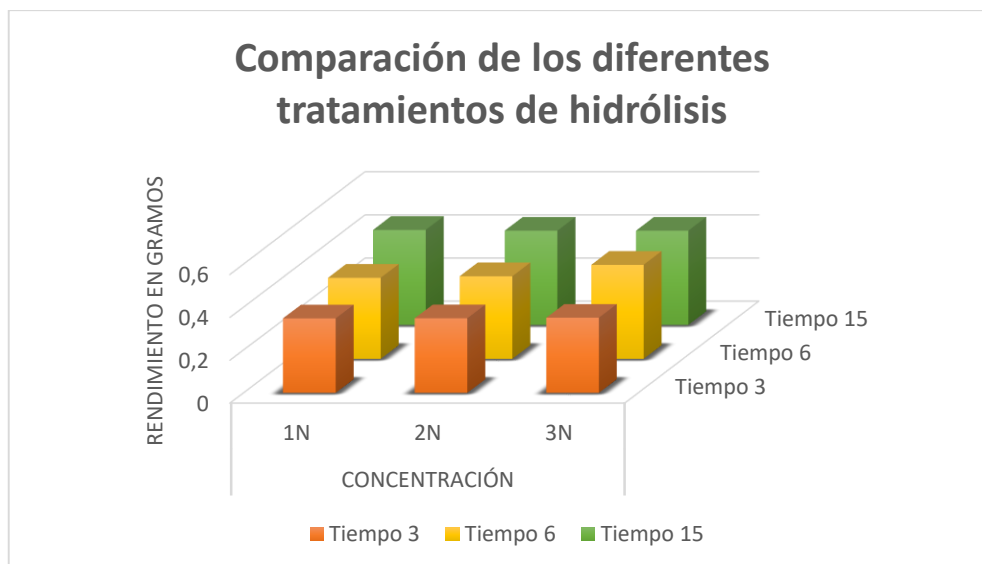


Gráfico 1-3: Comparación de los rendimientos obtenidos en los diferentes tratamientos

Realizado por: Balseca Gabriela, 2019

Como se observa en el gráfico 1-3 los datos muestran rendimientos representativos desde el tratamiento a las 6 horas y con una concentración de 3N, sin embargo, el mejor tratamiento se seleccionó en función del análisis estadístico con ANOVA y estimación de las betas.

En la tabla 3-3 del análisis ANOVA se observa que el efecto lineal de la concentración y el efecto cuadrático del tiempo influyen de manera significativa en el porcentaje de obtención de saponinas. Mientras que la estimación de las betas permite identificar que el mejor tratamiento se da a mayor tiempo y menor concentración para la obtención de saponinas hidrolizadas.

Tabla 3-3: ANOVA con los factores (tiempo, concentración y la interacción de ambos).

| F.V | SC | gl | CM | Fo | P-VALOR | |
|-------|------------|----|------------|------------|-------------|---------------|
| A | 0,00606209 | 2 | 0,00303104 | 8,16668729 | 0,002992293 | Ho se rechaza |
| B | 0,05188357 | 2 | 0,02594178 | 69,896738 | 3,27099E-09 | Ho se rechaza |
| AB | 0,00330218 | 4 | 0,00082555 | 2,2243074 | 0,107065207 | Ho no rechaza |
| ERROR | 0,00668065 | 18 | 0,00037115 | | | |
| TOTAL | 0,06792849 | 26 | | | | |

Elaborado: Balseca Gabriela, 2019

El gráfico 2-3 indica que la interacción del efecto lineal AB, es significativo, debido a que las

líneas del gráfico se entrelazan de forma instantánea. Siendo A el tiempo y B la concentración del ácido, concordante con los resultados del ANOVA.

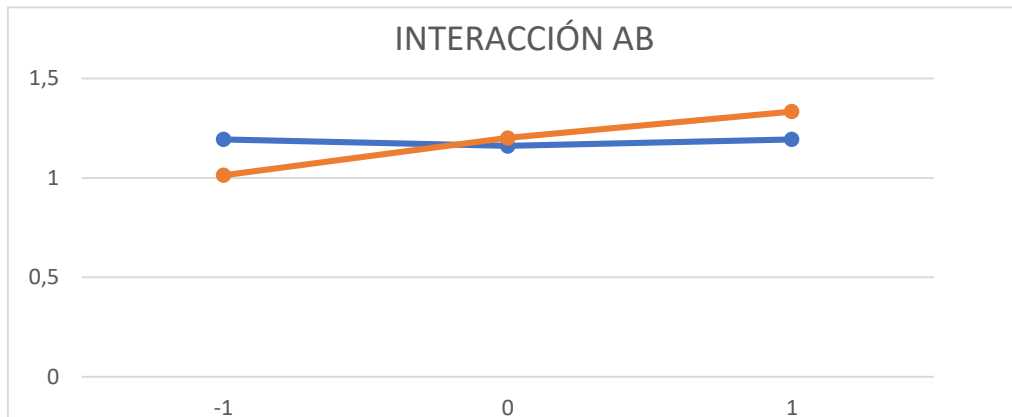


Gráfico 2-3: Gráfica de efectos significativos de la relación entre en tiempo de hidrólisis y concentración del ácido

Realizado por: Balseca Gabriela, 2019

Finalmente, se obtuvo un porcentaje de obtención de 45.50% p/p en relación con el crudo de saponinas, que se determinó gravimétricamente con la ecuación 2-2, este porcentaje superó el obtenido por Lozano Palacios, 2014, que obtuvo un rendimiento del 41% de saponinas (Lozano Palacios, 2014, p. 57). Este resultado se puede deber al cambio de solventes extractivos, y la temperatura usada.

3.4.1. Control por CCF

En la CCF de las saponinas totales se obtuvo valores Rf de 0.86, 0.44 y manchas definidas con coloraciones moradas como indica Torres Gómez, 2011 (Torres Gómez, 2011, pp. 23-24), estos resultados coinciden con los señalados por Wagner y Bladt, 1996, quienes afirman que la β -bn hederagenina tiene un Rf \sim 0.75 y el ácido oleanólico un Rf de \sim 0.48, (Wagner and Bladt, 1996, p. 322).



Figura 4-3: Placa cromatográfica de sapogeninas con FM. AcEt–TOL–Ac. fórmico (50:50:10).

Fuente: Balseca Gabriela, 2019

3.4.2. Purificación de sapogeninas mediante placas preparativas

Mediante la metodología descrita en la sección 2.5.5 se obtuvieron dos compuestos Ss1 y Ss2 similares a los obtenidos en el estudio de Chen et al., 2008, quién obtuvo geninas a través de una hidrólisis. Estos fragmentos generados posiblemente se deban a la pérdida de CH_3 y CHO con un reordenamiento del grupo carboxilo del C16 (Chen et al., 2008, pp. 74–82).

3.4.3. Lectura en el espectro infrarrojo

3.4.3.1. Resultados del espectro infrarrojo del compuesto Ss1

El compuesto Ss1 presentó una banda fuerte y ancha entre 3336 cm^{-1} correspondiente a un grupo $-\text{OH}$ alcohólico. De igual forma una banda estrecha de intensidad media alrededor de los 2883.06 cm^{-1} del grupo $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ que se deriva de las vibraciones simétricas del grupo CH_2 .

La banda del grupo de metilos gemínales en los 1366 cm^{-1} se presentaron en forma de bandas largas e intensas en los 1075 y 1027.87 cm^{-1} debido al estiramiento de las vibraciones del grupo C-O del ácido carbónico, en los 1366 cm^{-1} aparece una cinta característica, que deriva del grupo CH_3 .

En los 1745.09 cm^{-1} se presentó una banda fuerte del estiramiento de C=O , sugiriendo la existencia de un grupo carboxílico cerca de un doble enlace.

Estas bandas características corresponden con la estructura del ácido oleanólico, según la comparación con el espectro de Vyas y Argal, 2014, (Vyas y Argal, 2014, p. 190).

3.4.3.2. Resultados del espectro infrarrojo del compuesto Ss2

El espectro de IR del compuesto Ss2 presentó una banda fuerte y ancha en los 3388 cm^{-1} correspondiente a un grupo hidroxilo. En 1643.05 cm^{-1} se presentó una banda fuerte del estiramiento de C=O, sugiriendo la existencia de un grupo carboxílico cerca de un doble enlace.

Se presentaron bandas intensas y largas a los 1069 - 700 cm^{-1} que señalan la presencia de dobles enlaces, el doblete de la banda en 1543.74 cm^{-1} sugerente a un OH primario y un armónico de los cicloalcanos entre 1643.05 y 1231.33 cm^{-1} .

Una banda intensa en los 2877 cm^{-1} con la vibración de CH₃-CH₂, una señal larga e intensa a los 887 cm^{-1} de anillos alicíclicos juntos. Se pudo observar la presencia de CH₃ geminales con una banda larga e intensa en 1361 cm^{-1} .

Estas bandas resultantes corresponden con la estructura de la hederagenina, según la comparación con el espectro de Flechas et al., 2008, (Flechas et al., 2008, pp. 177-178).

3.5. Identificación cualitativa de metabolitos de interés

Tabla 4-3: Resultados de la prueba de identificación de saponinas y sapogeninas

| PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN | Saponinas | Sapogeninas |
|-------------------------------|-----------|-------------|
| Ensayo de Liebermann-Burchard | +++ | +++ |
| Ensayo de Fehling | + | - |
| Ensayo de Yodo | - | - |
| Ensayo de espuma | +++ | ++ |

+++ Positivo, ++ Ligeramente positivo, - Negativo.

Fuente: Balseca Gabriela, 2019

La prueba de Liebermann-Burchard fue positiva en ambos casos con una coloración violeta, consistente con el estudio de Pinzón, 2011, esta reacción causa una insaturación en los anillos de la estructura de la saponina y sapogeninas originando un cambio de color rosa, violeta, azul y verde, debido a la deshidratación de la formación de dienos (Pinzón, 2011, pp. 10-83).

El ensayo de Fehling fue positivo en las saponinas con la formación de un precipitado rojo, por la presencia de azúcares reductores en su estructura, pues Fehling es un reactivo oxidable donde

se reduce el ion cúprico a cuproso con la formación del precipitado Cu_2O (Geissman, 1973, p. 358).

Las sapogeninas en la prueba de Fehling resultó negativa, con una coloración azulada debido a la ausencia de azúcares reductores en su estructura, como lo indica Hernández Royero, 1997, el resultado negativo se puede deber posiblemente a que los productos obtenidos se encuentran en forma de sapogeninas u otros derivados (Hernández Royero, 1997, p. 55).

El ensayo de Yodo fue negativo en ambos casos pues el almidón fue precipitado con EtOH caliente al principio del proceso, para evitar inconvenientes en la filtración.

El método de espuma o afrosimétrico específico para saponinas, se valoró con (+++) porque su espuma permaneció por más de 30 minutos, coincidiendo con el estudio de Mac Donald et al., 2017 (Mac Donald et al., 2017, p. 36), mientras que las sapogeninas dieron un resultado ligeramente positivo, debido a que al hidrolizarse pierden su solubilidad en agua disminuyendo su producción de espuma como lo indica Flores, 1991, en la tabla 4-3 (Flores, 1991, pp. 57-73).

Cabe resaltar que esta prueba es presuntiva pues existen otras sustancias que también pueden formar espuma.

Tabla 5-3: Características de Saponinas y Sapogeninas

| Características | Saponinas | Sapogeninas |
|----------------------|-----------|-------------|
| Azúcares | ✓ | x |
| Tensoactividad | ✓ | x |
| Capacidad Hemolítica | ✓ | x |
| Toxicidad | ✓ | x |
| Polaridad | ✓ | x |

✓: presente, x: ausente

Fuente: (Flores, 1991, pp. 57-73)

3.6. Conclusiones

- El rendimiento del extracto crudo de saponinas a partir del mojuelo de quinua (*Chenopodium quinoa*) con un rendimiento del 44.98 % p/p, aplicando el método de funda filtrante con agua fría. El proceso empleado fue fácil y reproducible para llevarlo cabo a una escala industrial.
- Por HPLC se obtuvieron dos señales en el cromatograma de las saponinas, un pico pequeño y uno grande corresponde según bibliografía a saponinas mono y bisdesmosídicas.
- Con la manipulación de las variables concentración del ácido y tiempo en la obtención de saponinas, los rendimientos conseguidos del experimento, estadísticamente, presentan diferencias significativas, siendo el tratamiento 15 horas y concentración 1 N el más eficiente, por lo que se consideró a este tratamiento como el mejor con un 95% de confiabilidad.
- Por Espectroscopía Infrarroja, se caracterizó los principales grupos funcionales en los compuestos hidrolizados aislados Ss1 y Ss2 del mojuelo de la quinua (*Chenopodium quinoa*) y por comparación bibliográfica se le atribuyó como ácido oleanólico y la hederagenina respectivamente.

3.7. Recomendaciones

- Se recomienda realizar un análisis cuantitativo por HPLC de las sapogeninas aisladas.
- Aunque la información bibliográfica indica que las sapogeninas resultantes del mojuelo de quinoa (*Chenopodium quinoa*) no son tóxicas, se recomienda que se realicen pruebas toxicológicas.
- Evaluar las actividades biológicas de las sapogeninas tanto del crudo de saponinas hidrolizadas como de los compuestos aislados.
- Se recomienda seguir con los estudios de las saponinas y las modificaciones químicas que estas pueden sufrir para sus posibles aplicaciones en el futuro.
- Se recomienda que se complemente los estudios con elucidación estructural de los compuestos mediante RMN

BIBLIOGRAFÍA

ABUGOCH JAMES, L.E. *Chapter 1 Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. In: Advances in food and nutrition research* [en línea] 2009, (Chile), vol. 58, p. 1-31. [consulta: 21 de abril 2019]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58001-1](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58001-1)

AHAMED, N. Thoufeek, et al. "Physicochemical and functional properties of Chenopodium quinoa starch." *Carbohydr. Polym.* [en línea], 1996, (India) 31, pp. 99–103. [consulta: 21 de abril 2019]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(96\)00034-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(96)00034-3)

AHUMADA, Andrés, et. al. "Saponinas de quinua (Chenopodium quinoa Willd.): un subproducto con alto potencial biológico". *Rev. Colomb. Cienc. Quím.-Farm.* [en línea], 2016, (Colombia) 45(2), pp. 438–469. [consulta: 21 de abril 2019]. ISSN 438-469. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n3.62043>

ALVARADO BONILLA, Helen Lissette. Estudio biofarmacéutico de triterpenos pentacíclicos antiinflamatorios vehiculizados en sistemas nanoestructurados para aplicación tópica. [en línea] (Tesis).(Doctoral) Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia. Barcelona 2015, pp. 1-141 [consulta: 07 junio 2019]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2445/66675>

ANMAT. FARMACOPEA ARGENTINA, Séptima. ed. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina. 2003, pp. 100-628. [consulta: 17 agosto 2019]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_I/files/assets/basic-html/page1.html

AVALOS ROJAS, Ana Susana, TAPIA RAMÍREZ, William Enrique. Cuantificación por espectrofotometría uv/vis de las saponinas contenidas en la episperma de la especie chenopodium quinoa willd "quinua" procedente de la provincia de Santiago de Chuco - La Libertad. [en línea]. (Trabajo de Investigación Tipo I). Universidad Nacional de Trujillo, Perú. 2011. pp. 10-40. [consulta: 20 de abril 2019]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/4689>

BONIFAZ PAREDES, Luis Enrique. Determinación de la Actividad Insecticida de la Saponina de Quinoa (*Chenopodium quinoa*) Hidrolizada y No Hidrolizada sobre *Drosophila melanogaster*. [en línea] (tesis).(Grado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador 2011. pp. 10-127. [consulta: 20 de abril 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/390>

CANO-FLORES, Arturo. "Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos". *Rev. Mex. Cienc. Farm.* [en línea] 2013, (México) 44 (2), pp. 7-16. [consulta: 13 de junio 2019]. Disponible en: www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v44n2/v44n2a2.pdf

CAPERUTO, Luciana C.; AMAYA-FARFAN, Jaime; CAMARGO, Celina R. O. "Performance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) flour in the manufacture of gluten-free spaghetti." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, [en línea] 2001, (Brasil) 81(2), pp. 95–101. [consulta: 01 agosto 2019]. Disponible en: [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20010101\)81:1%3C95::AID-JSFA786%3E3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20010101)81:1%3C95::AID-JSFA786%3E3.0.CO;2-T)

CARR, B.R., MIKHAIL, G., FLICKINGER, G.L. "Column Chromatography of Steroids on Sephadex LH-20". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* [en línea] 1971, (Filadelfia) 33, pp. 358–360. [consulta: 22 de junio 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1210/jcem-33-2-358>

CHEN, Juanjuan. et al. "Rapid identification of oleanane-type saponins in the roots of *Stephanotis mucronata* by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry". *Analytica chimica acta*, [en línea] 2008, (China) 613, pp. 74–82. [consulta: 22 de junio 2019]. Disponible en: <https://doi.org/doi:10.1016/j.aca.2008.02.052>

DÍAZ, Nieves Abril, et al. Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. [en línea] España (2016). Univ. Córdoba 8. [consulta: 24 de junio 2019]. Disponible en: https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf

DOMÍNGUEZ, M., et al. "Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores." *Revista Iberoamericana de Polímeros* [en línea] 2011, (México) 12, pp. 153–159. [consulta: 12 de junio 2019]. Disponible en: <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/MAY11/dominguez.pdf>

MAC DONALD, Dédora, et al. "Extracción, identificación y evaluación de saponinas en *Agaricus Bisporus*". *Biotempo* [en línea], 2005, (Perú) 5, pp. 3–36. [consulta: 12 de junio 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.31381/biotempo.v5i0.889>

DURST, H. Dupont, GOKEL, George W. *Química orgánica experimental* [en línea]. España Editorial REVÉRTE, 1985, pp. 130-132. [consulta: 19 de junio 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=xiiqTfEO1a2gC&pg=PA130&dq=Espectroscopia+UV&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjDjpi18N3iAhWwuVkkKHbeRDTEQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Espectroscopia%20UV&f=false>

PROECUADOR. Análisis sectorial: Quinoa 2015. *Quito: Pro Ecuador.* [en línea] 2015 [consulta: 30 de julio 2019]. Disponible en: http://quinoa.pe/wp-content/uploads/2016/04/PROEC_AS2015_QUINUA.pdf

ESPITIA, Javier; SALCEDO, Jairo; GARCIA, Carlos. "Funtional Properties of Starch Yam (*Dioscorea bulbifera*, *Dioscorea trifida* y *Dioscorea esculenta*)." *Revista Tecnológica Universidad de Zulia* [en línea], 2016, (Bolivia) 39 (2), pp. 31 - 36, [consulta: 19 de junio 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Jairo_Salcedo/publication/311971579_Funtional_Properties_of_Starch_Yam_Dioscorea_bulbifera_Dioscorea_trifida_y_Dioscorea_esculenta/links/58664ca808ae6eb871b05aa9/Funtional-Properties-of-Starch-Yam-Dioscorea-bulbifera-Dioscorea-trifida-y-Dioscorea-esculenta.pdf?origin=publication_detail

FLECHAS, Henry A., et al. "Investigación y desarrollo de tres productos del jaboncillo (*Sapindus saponaria* L.) como base para su industrialización". *Revista Colombia Forestal*, [en línea] 2009, (Colombia) 12(2), pp. 171–182. [consulta: 18 de junio 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2009.1.a12>

FLORES MÚÑOZ, Narciso. Aislamiento e identificación de saponinas presentes en el. Agave lechugilla. [en línea] (tesis).(Maestría). Universidad de Guadalajara, México 1991, pp. 57-73. [consulta: 18 de junio 2019]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12104/12701>

FLORES T.; HUAMÁN J.; TOMÁS G. "Estudio comparativo de tres metodologías cuantitativas de extracción de saponinas de la melisa officinalis “toronjil.” " *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* [en línea] 2013, (Perú) 16(2), pp. 47–51. consulta: 28 de junio 2019]. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/ESTUDIO-COMPARATIVO-DE-TRES-METODOLOG%20DAS-DE-DE-DE-Flores-Huam%20A1n/4ecc407712b4bdbbc76bf5dfa993e6e35877f1403>

LOZANO, Maribel; FLORES, Yonny R.; ALMANZA, Giovanna R. "Alto contenido de ácido oleanólico en plantas bolivianas de altitud". *Revista Boliviana de Química* [en línea] 2017, (Bolivia) 34, pp. 28–32 [consulta: 08 de junio 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/319057303_ALTO_CONTENIDO_DE_ACIDO_OLEANOLICO_EN_PLANTAS_BOLIVIANAS_DE_ALTITUD/download

FLORES, Yonny, et al. "Oleanane-type triterpenes and derivatives from seed coat of bolivian chenopodium quinoa genotype "salar." " *Revista Boliviana de Química* [en línea] 2005, (Bolivia) 22, pp. 71–77. [consulta: 23 de junio 2019]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426339667011>

GEE, J.M., et al. "Saponins of quinoa (*Chenopodium quinoa*): Effects of processing on their abundance in quinoa products and their biological effects on intestinal mucosal tissue". *Journal of the Science of Food and Agriculture* [en línea] 1993, (Suiza) 63(2), pp. 201–209. [consulta: 23 de junio 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740630206>

GEISSMAN, Theodore Albert. *Principios de química orgánica* [en línea]. 2^{da} ed. Barcelona-Bogota- Buenos Aires- Caracas- Mexico: revéte S.A., 1973. [consulta: 18 de junio 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=msYg6IgMFU8C&pg=PA358&lpg=PA358&dq=la+prueba+de+fehling+se+considera+positiva+cuando&source=bl&ots=cCfSAMfYtI&sig=ACfU3U24k0WhfaWEwi9GS5cKcXEoySZkew&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwj0jPXG3qXjAhXDzlkKHQagAUc4FBDoATACegQICRAB#v=onepage&q=la%20prueba%20de%20fehling%20se%20considera%20positiva%20cuando&f=false>

GIL-RAMIREZ, Alicia, et al. "Integrated process for sequential extraction of saponins, xylan and cellulose from quinoa stalks (*Chenopodium quinoa Willd.*)". *Industrial crops and products*, [en línea] 2018, (Bolivia) 121(2), pp. 54–65. [consulta: 06 de junio 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.074>

GUARNIZO FRANCO, Anderson; MARTÍNEZ YEPES, Pedro Nel. *Experimentos de Química Orgánica*. [en línea] Armenia, Quindío, Colombia Editorial ELIZCOM S.A.S. ed. Ediciones Elizcom. 2009, pp. 101-102. [consulta: 06 de junio 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=Otm5wsEeKYEC&pg=PA101&dq=cromatografia+de+capa+ fina&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiDh-Dkp9viAhUjuVkkHSFhAhEQ6AEINjAD#v=onepage&q=cromatografia%20de%20capa%20fina>

&f=false

GUERRA DE LEÓN, J.O. *Los glicósidos esteroidales: aislamiento y elucidación estructural*. [en línea] Santa Clara, Villa Clara, Cuba Editorial Feijóo ed. Liset Ravelo Romero. 2013, pp. 5-6. [consulta: 03 de mayo 2019]. Disponible en: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/espochsp/detail.action?docID=3192224>.

HERNÁNDEZ GUZMÁN, Astrid Carolina; HERMOSILLA CARAZO, Virginia Jeannette. Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala. [en línea](tesis).(Grado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala 2014. pp. 77. [consulta: 20 de abril 2019]. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/id/eprint/2065>

HENG, L., et al. "Stability of pea DDMP saponin and the mechanism of its decomposition". *Food Chemistry* [en línea], 2006, (Wageningen) 99, pp. 326–334. [consulta: 21 de abril 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.045>

HERNÁNDEZ ROYERO, Ricardo. "Obtención de crudos de saponinas hipocolesteromizantes del *Chenopodium quinoa* Willd". *Revista Cubana de Medicina Militar* [en línea], 1997, (Cuba) 26(2), pp. 55–62. [consulta: 05 de abril 2019]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65571997000100008

HERRERA, Natalia, et. al. "Estructura y actividad de saponinas triterpénicas". *Scientia et Technica Año XIII* [en línea], 2007, (Antioquia) 33, pp. 87–90. [consulta: 09 de junio 2019]. Disponible en: <https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/5779>

IMPROTA, F.; KELLEMS, R.O. "Comparison of raw, washed and polished quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to wheat, sorghum or maize based diets on growth and survival of broiler chicks". *Livestock research for rural development*, [en línea], 2001, (Provo)13(2), pp. 1-10. [consulta: 03 de mayo 2019]. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd13/1/impr131.htm>

INEN, 1988. *Quinoa. Determinación del contenido de saponinas por medio del método espumoso (método de rutina)*. 1988, Quito-Ecuador .

KOZIOL, Michael J. "Afrosimetric estimation of threshold saponin concentration for bitterness in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd)". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, [en línea], 1991, (Quito) 54(2), pp. 211–219. [consulta: 21 de julio 2019]. Disponible en:

<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740540206>

KULJANABHAGAVAD, Tiwatt, WINK, Michael. "Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd". *Phytochemistry reviews*, [en línea], 2009, (Bangkok) 8, pp. 473–490. [consulta: 02 de junio 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9121-0>

LI, Jun. et al. "Ginsenoside Rh1 potentiates dexamethasone's anti-inflammatory effects for chronic inflammatory disease by reversing dexamethasone-induced resistance ". *Arthritis research & therapy* [en línea], 2014 (Shanghai)16(2), p. R106. [consulta: 22 de junio 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/ar4556>

LOZANO, Maribel, et al. "Effect in acute inflammation of sapogenin extract and isolated sapogenins from quinoa waste (*Chenopodium quinoa willd*)". *Revista Boliviana de Química* [en línea], 2013, (La Paz). 30, pp. 115–121. [consulta: 12 de junio 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339680002.pdf>

LOZANO, Maribel, et al. "Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real *Chenopodium quinoa* Willd". *Revista Boliviana de Química* [en línea] 2012, (Bolivia) 29, pp. 131-138. [consulta: 24 de junio 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/pdf/rbq/v29n2/v29n2_a02.pdf

LOZANO PALACIOS, Maribel. Evaluación antiinflamatoria in vivo de sapogeninas de residuos de quinua real (*Chenopodium quinoa* Willd) [en línea](tesis)(Maestría). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz- Bolivia 2014. pp. 64-70. [consulta: 24 de junio 2019]. Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/5697/TM-1869.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

MA, W.-W.; HEINSTEIN, P. F.; MCLAUGHLIN, J. L. "Additional Toxic, Bitter Saponins from the Seeds of *Chenopodium quinoa*". *Journal of natural products* [en línea], 1989, (Indiana) 52, pp. 1132–1135. [consulta: 22 de julio 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/np50065a035>

MAGAP, Subsecretaría de Agricultura, Viceministerio de Agricultura y Ganadería. *Estrategia Fomento a la Producción de la Quinua en la Sierra Ecuatoriana*, [en línea] 2015,

[consulta: 02 de agosto 2019]. Disponible en: http://quinua.pe/wp-content/uploads/2016/04/PROEC_AS2015_QUINUA.pdf

MAGNO, M. QUINUA Operaciones de Poscosecha. [en línea] 2010, [consulta: 02 de agosto 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-ar364s.pdf>

MAMANI, Erwin Ronal. Evaluación del beneficiado y laminado de cuatro variedades amargas y seis variedades dulces de quinua comercial. [en línea] (Tesis). Universidad Mayor de Andrés, La Paz – Bolivia 2016, pp. 1-126. [consulta: 21 de abril 2019]. Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/10413/T-2263.pdf?sequence=1>

MANGAS ALONSO, J.J., et al. 2010. 9. *Físico-Química de la espuma. Propiedades espumantes*, in: *Tecnología de la elaboración de sidra. Equipamiento industrial*. [en línea] Asturgraf, pp. 245–250. [consulta: 09 de julio 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Luis_Garcia116/publication/276265061_Tecnologia_de_la_elaboracion_de_sidra_Equipamiento_industrial/links/5673ca1908aedbbb3fa195ac/Tecnologia-de-la-elaboracion-de-sidra-Equipamiento-industrial.pdf#page=235

MARTÍN-SÁNCHEZ, Manuel, MARTÍN-SÁNCHEZ, María Teresa; PINTO, Gabriel. "Reactivo de Lugol: Historia de su descubrimiento y aplicaciones didácticas". *Educación Química* [en línea] 2013, (México) 24, pp. 31–36. [consulta: 23 de abril 2019]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)73192-6](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)73192-6)

MERCADO, Ronanth. "Diseño conceptual para la descontaminación y economía de agua en plantas de desamargado de quinua". *Revista Ciencia y Cultura* [en línea], 2010, (Bolivia) pp. 85-96. [consulta: 20 de abril 2019]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=425839837006>

MÚJICA, Á. El origen de la quinua y la historia de su domesticación. *INIA* [en línea], 2016, (Perú), 108 pp. 14-17. [consulta: 08 de abril 2019]. Disponible en: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR40344.pdf>

NAKANISHI, K., et al. *Natural product chemistry*, [en línea] Japón: Kodansha Scientific Ltd. ed. University Science Books, 1974. pp. 105–221 [consulta: 08 de abril 2019]. Disponible en: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=PKb-BAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Natural+product+chemistry,+Kodansha+Scientific+Ltd.+e.d.+University+Science+Books+\(Jap%C3%B3n\)&ots=o7IIJXvYKh&sig=iHa1yimaLxDtYJInSe5oQVFP1rg#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=PKb-BAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Natural+product+chemistry,+Kodansha+Scientific+Ltd.+e.d.+University+Science+Books+(Jap%C3%B3n)&ots=o7IIJXvYKh&sig=iHa1yimaLxDtYJInSe5oQVFP1rg#v=onepage&q&f=false)

NICKEL, Júlia, et al. "Effect of different types of processing on the total phenolic compound content, antioxidant capacity, and saponin content of *Chenopodium quinoa* Willd grains". *Food Chemistry* [en línea], 2016, (Brasil) 209(2), pp. 139–143. [consulta: 03 de mayo 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.031>

NIETO C., et al. "INIAP-Ingapirca e INIAP-Tunkahuan: dos variedades de quinua de bajo contenido de saponina". *Bol. Divulg. No 228*. [en línea], 1992, (Ecuador) 209(2), pp. 25. [consulta: 21 de abril 2019]. Disponible en: <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/270/4/iniapscbd228.pdf>

OLESZEK, Wieslaw, et al. "High-performance liquid chromatography of alfalfa root saponins". *Journal of Chromatography A* [en línea] 1990, (Amsterdam) 519(2), pp. 109–116. [consulta: 12 de abril 2019]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(90\)85139-M](https://doi.org/10.1016/0021-9673(90)85139-M)

PADRON P., C.A.; OROPEZA R. A.; R., MONTES A. I. "Semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willdenow): composición química y procesamiento. Aspectos relacionados con otras áreas". *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* [en línea], 2014, (Venezuela) 5, pp. 166-218. [consulta: 20 de abril 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/274435593_Semillas_de_quinua_Chenopodium_quinoa_Willdenow_composicion_quimica_y_procesamiento_Aspectos_relacionados_con_otras_areas

PAJUELO, R. Posibilidades de la saponina de quinua en el mercado de la cosmética. [en línea] (Informe de Misión de Corto Plazo). EUROECOTRADE, Lima, Perú 2016, pp. 1-52 [consulta: 24 de abril 2019]. Disponible en: https://issuu.com/euroecotraderu/docs/posibilidades_de_la_saponina_de_qui/12

PAŚKO, Pawel, et al. "Effect of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa*) in Diet on some Biochemical Parameters and Essential Elements in Blood of High Fructose-Fed Rats ". *Plant Foods Hum. Nutr.* [en línea] 2010, (Polonia) 65, pp. 333–338. [consulta: 14 de abril 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0197-x>

PINEDA, P., et al. "Papel da água na gelatinização do amido de Milho: estudo de calorimetria diferencial de verredura". *Ingeniería y Ciencia* [en línea] 2010, (Brasil) 6(2), pp. 129–141. [consulta: 24 de abril 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ince/v6n11/v6n11a08.pdf>

PINZÓN MONTEALEGRE, Catalina. Tradicional indígena inga, pruebas fitoquímicas y evaluación de la actividad antimicrobiana. [en línea] (Tesis) (Grado) PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA. Bogotá D.C. 2011. pp. 10-80. [consulta: 20 de abril 2019]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8875/tesis813.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

POOJA, Suryawanshi; VIDYASAGAR, G. M. "Phytochemical screening for secondary metabolites of *Opuntia dillenii* Haw". *Journal of Medicinal Plants* [en línea], 2016, (India) 4(2), pp. 39-43. [consulta: 20 de abril 2019]. Disponible en: <http://www.plantsjournal.com/archives/2016/vol4issue5/PartA/4-4-38-365.pdf>

QUIROGA LEDEZMA, C., ESCALERA VÁSQUEZ, R. "Evaluación de la calidad nutricional y morfología del grano de variedades amargas de quinua beneficiadas en seco, mediante el novedoso empleo de un reactor de lecho fluidizado de tipo surtidor". *Investig. Desarro.* [en línea], 2010, (Bolivia) 10(2), pp. 49–62. [consulta: 20 de abril 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.23881/idupbo.010.1-4i>

QUIROGA LEDEZMA, C.C., et al. 2010. Proyecto de prefactibilidad para un proceso de beneficiado en seco de variedades amargas de Quinua, basado en la aplicación de un lecho fluidizado de tipo surtidor [WWW Document]. PIEB. [consulta: 28 de abril 2019]. Disponible en: <http://www.pieb.org/quinuavarietad/proyecto.php> (accessed 7.31.19).

RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, J. "La quinua, una opción para la nutrición del paciente con diabetes mellitus". *Rev. Cuba. Endocrinol.* [en línea], 2015, (Cuba) 26, pp. 304–312. [consulta: 28 de abril 2019]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/end/v26n3/end10315.pdf>

SALAGER, Jean-Louis; ANDÉREZ, José María; FORGIARINI, A. Influencia de la formulación sobre las espumas. [en línea], 2016, pp. 1- 14. [consulta: 28 de abril 2019]. Disponible en: http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S263_Espumas.pdf

SAN MARTÍN, R., NDJOKO, K., HOSTETTMANN, K. "Novel molluscicide against *Pomacea canaliculata* based on quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins ". *Crop Prot.* [en línea], 2008, (Chile) 27, pp. 310–319. [consulta: 28 de abril 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.03.015>

SANCHEZ, Katherine A. Observations regarding consumption of peruvian native grains (quinoa, amaranth and kañiwa), weight status, and perceptions of potential risk factors, warning signs and symptoms of type 2 diabetes among peruvian adults: a case study [en línea] (Tesis) (Maestría). University of Maryland, Maryland 2012. pp. 1- 155. [consulta: 18 de abril 2019]. Disponible en: https://drum.lib.umd.edu/bitstream/handle/1903/12830/Sanchez_umd_0117N_13254.pdf?sequence=1&isAllowed=y

SANTIAGO RIVAS, Sandra., Determinación de la fracción de metales traza ligados a las proteínas similares a las metalotioneínas en muestras de mejillón. [en línea] (tesis) (Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, España 2007. pp. 190-192. [consulta: 13 de abril 2019]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=108678>

SILLER JUÁREZ, Daniel Francisco. Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave Lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México 2012. pp. 26-27. [consulta: 19 de abril 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/518/62484s.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

SUXO, Y., et al. "Sapogenins from the husk of chenopodium quinoa, the obtaining of their derivatives, and the evaluation of their cytotoxic activity". *Rev. Boliv. Quím.* [en línea], 2018, (Bolivia) 35(2), pp. 100- 101. [consulta: 09 de junio 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/pdf/rbq/v35n3/v35n3_a03.pdf

TORRES GÓMEZ, Patricio Agustín. Identificación de las principales sapogeninas de una fracción apolar obtenida de la hidrolisis de un extracto acuoso de quillaja saponaria mol. y su actividad frente a la enzima glicógeno fosforilasa A [en línea] (Tesis).(Grado). Universidad de Chile, Santiago, Chile 2011. pp. 1-68. [consulta: 09 de junio 2019]. Disponible en: http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/105387/qf-torres_pa.pdf?sequence=3&isAllowed=y

VILLEGAS CASERES, W.A., et al. Análisis Ultravioleta-visible. la Teoría y la Práctica en el ejercicio profesional. [en línea] Yucatan, Mexico Editorial UADY. 2006, pp. 11-78. [consulta: 20 junio 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=dOuvlq3ZtXAC&pg=RA5-PA7&dq=cromatograf%C3%ADa+preparativa&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj5p_zT-

vjiAhVupVkkHRKtDWoQ6AEIKDAA#v=onepage&q=cromatograf%C3%ADa%20preparativa&f=false

VYAS, N., ARGAL, A. "Isolation and characterization of oleanolic acid from roots of lantana camara". *Asian J. Pharm. Clin. Res.* [en línea], 2014, (India) 7(2), pp. 189–191. [consulta: 20 junio 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/286768324_Isolation_and_characterization_of_oleanolic_acid_from_roots_of_Lantana_camara

WAGNER, H., BLADT, S. *Plant and Drug analysis*. 2^{da} ed. Munich, Universität München: 2012. pp. 10-384

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M., SHERMA, J., KOWALSKA, T. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. CRC Press, New York: 2008. pp. 19-896. [consulta: 28 junio 2019]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=fBCDK_Tgh10C&pg=PA524&dq=BAW+\(BuOH++AcOH++H2O,&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi5-fqM4JfjAhXMm-AKHQGPDUQ6AEIKjAA#v=onepage&q=BAW%20\(BuOH%20-%20AcOH%20-%20H2O%2C&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=fBCDK_Tgh10C&pg=PA524&dq=BAW+(BuOH++AcOH++H2O,&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi5-fqM4JfjAhXMm-AKHQGPDUQ6AEIKjAA#v=onepage&q=BAW%20(BuOH%20-%20AcOH%20-%20H2O%2C&f=false)

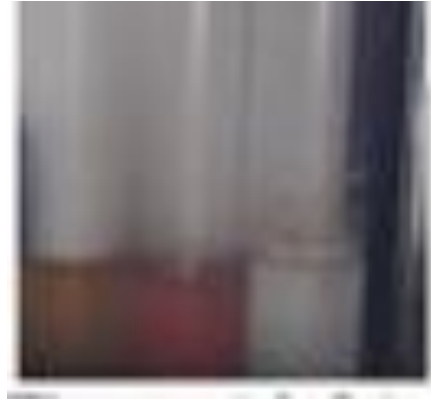
ANEXOS

Anexo A. Fotografías de la extracción de saponinas.

Prueba de espuma para la elección de la materia prima



Durante los primeros 5 minutos

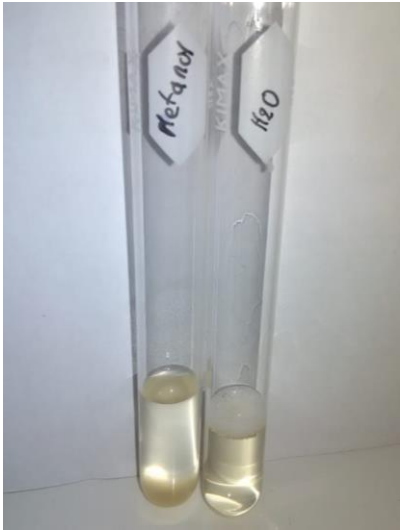


30 minutos después de ser agitado

Precipitación de almidón con metanol caliente / Crudo de saponinas



Prueba de solubilidad de saponinas en MeOH y agua / Prueba de espuma en saponinas



Prueba con el reactivo de yodo antes de su precipitación



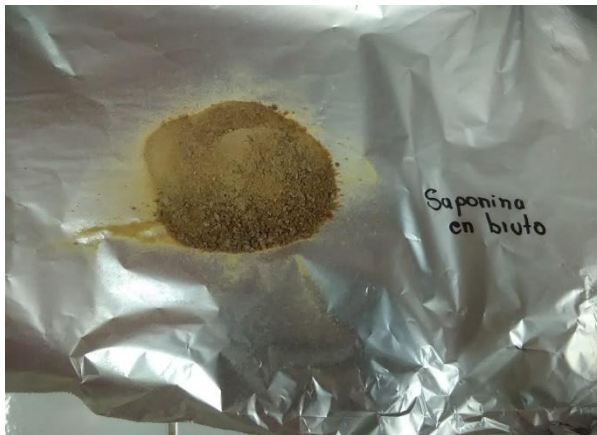
Centrifugación del agua de saponinas



/ Filtración del agua de saponinas con zeolita



Polvo de saponinas



/ TLC de saponinas



Anexo B. Fotografías de la extracción de saponinas.

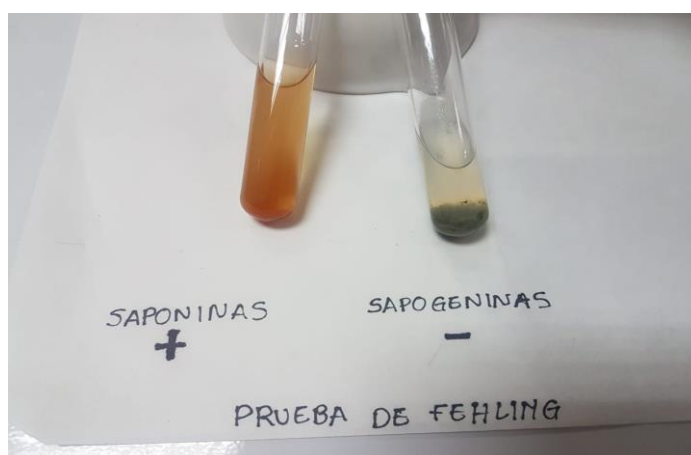
Precipitación después de la colocación del ácido / Equipo de reflujo



Cromatografía preparativa



Prueba de Fehling



Espectrofotómetro infrarrojo FT/IR-4100 Jasco.



HPLC



ANEXO C. Cálculos de obtención de saponinas y sapogeninas

Índice Afrosimétrico en la selección de la muestra

Se utilizó la ecuación siguiente para determinar en forma de porcentaje la cantidad de saponinas presentes en las muestras.

$$Ps = \frac{(0.646 \times h) - 0.104}{m \times 10}$$

Donde:

Ps: porcentaje de saponinas

h: altura de la espuma (cm)

m: masa de la muestra (g)

Maquita Cushunchic

Datos.

H: 3.60 cm

m: 0.53 g

$$Ps = \frac{(0.646 \times 3.60) - 0.104}{0.53 \times 10}$$

$$Ps = 41.91$$

COPROVICH

Datos.

H: 1.1 cm

m: 0.53 g

$$Ps = \frac{(0.646 \times 1.1) - 0.104}{0.53 \times 10}$$

$$Ps = 11.44$$

Quinoa roja de Bolivia

Datos.

H: 2.33 cm

m: 0.53 g

$$Ps =$$

$$\frac{(0.646 \times 2.33) - 0.104}{0.53 \times 10}$$

$$Ps = 26.43$$

Cálculo de rendimiento de saponinas

Se inicio con un peso de 5.0010 gramos con un peso final de crudo de saponinas de **2.2490** gramos después de las extracciones sucesivas hasta la ausencia total de espuma en el agua.

$$\% \text{ Crudo de saponina} = \frac{\text{Peso final}}{\text{Peso de partida}} \times 100$$

$$\% \text{ Crudo de saponina} = \frac{2.2490}{5.0010} \times 100$$

$$\% \text{ Crudo de saponina} = 44.98 \%$$

Finalmente, con la ecuación se obtuvo un porcentaje del 49.24 % p/p de crudo de saponinas en relación con el mojuelo.

Cálculo de rendimiento de sapogeninas

Se inicio con un peso de 1.0008 gramos con un peso final de crudo de sapogeninas de 0.4411 gramos, con las condiciones seleccionadas estadísticamente.

$$\% \text{ Crudo de saponina} = \frac{\text{Peso final}}{\text{Peso de partida}} \times 100$$

$$\% \text{ Crudo de saponina} = \frac{1.0008}{0.4411} \times 100$$

$$\% \text{ Crudo de saponina} = 44.03 \%$$

Finalmente, con la ecuación se obtuvo un porcentaje del 44.03 % p/p de crudo de sapogeninas en relación con el crudo de saponinas.

Cálculo del Rf de las saponinas y sapogeninas respectivamente

Rf de saponinas

- $Rf_1 = \frac{2.5}{4.3} = 0.58$
- $Rf_2 = \frac{3}{4.3} = 0.697$
- $Rf_3 = \frac{3.4}{4.3} = 0.79$

Rf de sapogeninas

- $Rf_1 = \frac{4.386}{5.1} = 0.86$
- $Rf_2 = \frac{2.25}{5.1} = 0.44$

ANEXO D. Resultados del estudio estadístico

Resultados de los ensayos con sus respectivas repeticiones para la confirmación de los datos

| | | CONCENTRACIÓN | | | |
|---------------|-----------|----------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | | 1N | 2N | 3N |
| TIEMPO | 3 | R1 | 0,3476 | 0,3482 | 0,3509 |
| | | R2 | 0,3477 | 0,3481 | 0,351 |
| | | R3 | 0,3478 | 0,3482 | 0,3508 |
| | 6 | R1 | 0,378 | 0,385 | 0,4382 |
| | | R2 | 0,3781 | 0,3851 | 0,4381 |
| | | R3 | 0,378 | 0,3858 | 0,438 |
| | 15 | R1 | 0,441 | 0,4375 | 0,4553 |
| | | R2 | 0,441 | 0,4376 | 0,4555 |
| | | R3 | 0,4412 | 0,4378 | 0,455 |

Análisis exploratorio por repeticiones

| R1 | | R2 | | R3 | |
|-------------------------|-----------|-------------------------|----------|-------------------------|----------|
| Media | 0,397967 | Media | 0,386911 | Media | 0,398067 |
| Error típico | 0,014961 | Error típico | 0,022047 | Error típico | 0,014942 |
| Mediana | 0,385 | Mediana | 0,3851 | Mediana | 0,3858 |
| Moda | N.E. | Moda | N.E. | Moda | N.E. |
| Desviación estándar | 0,044883 | Desviación estándar | 0,06614 | Desviación estándar | 0,04483 |
| Varianza de la muestra | 0,002015 | Varianza de la muestra | 0,00437 | Varianza de la muestra | 0,00201 |
| Curtosis | -2,131884 | Curtosis | 1,29992 | Curtosis | -2,13386 |
| Coficiente de asimetría | 0,052669 | Coficiente de asimetría | -1,13131 | Coficiente de asimetría | 0,04400 |
| Rango | 0,1077 | Rango | 0,2074 | Rango | 0,1072 |
| Mínimo | 0,3476 | Mínimo | 0,2481 | Mínimo | 0,3478 |
| Máximo | 0,4553 | Máximo | 0,4555 | Máximo | 0,455 |
| Suma | 3,5817 | Suma | 3,4822 | Suma | 3,5826 |
| Cuenta | 9 | Cuenta | 9 | Cuenta | 9 |

