

CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS EN RESIDUOS DE QUINUA REAL *CHENOPODIUM QUINOA* WILLD

Maribel Lozano^a; Edgar Ticona^{a,b}, Cristhian Carrasco^b, Yonny Flores^a; Giovanna R. Almanza^{a,*}

^aLaboratorio de Bioorgánica, Instituto de Investigaciones Químicas, UMSA, Campus Universitario de Cota Cota Edificio de la FCPN c. Andrés Bello y c. 27 s/n, CP 303 La Paz, Bolivia, ^bInstituto de Investigación de Desarrollo de Procesos Químicos, UMSA, Edificio de la Facultad de Ingeniería, Obelisco, La Paz, Bolivia.

Accepted: 21/10/12

Published: 09/12/12

Keywords: *Residues of quinoa, Chenopodium quinoa Willd, quantification of saponins, Foam method, UV spectrophotometry method, HPLC method.*

ABSTRACT

This work was performed to quantify the performance of extracts and saponins in residues generated by exporters of quinoa in the departments of La Paz, Oruro and Potosi, determining that the extraction yields range from 36.0 % to 39.4 % w/w, while the percentage of saponins in the extract ranged from 47.3 % to 56.2 % and saponins in the residues from 17.3 % to 22.1 %. Additionally, a method was optimized for extraction of saponins by maceration with alcohol/water mixtures, considering the following parameters: mass/volume ratio of extraction, extraction time and percentage of EtOH/H₂O (v/v), determining that the best m/v ratio is 1/9. The optimum extraction time is 72 h and the better extraction mixture is 50/50 EtOH/H₂O. The percentage of saponins was determined using the methods of Foam, UV spectrophotometry and HPLC chromatography, showing that there are no major differences between the three methods, although the HPLC method is the best with less error and should be used as a control for the other methods which are cheaper. In addition, it is very important to use a standard of saponins from quinoa as reference sample in all the methods.

Corresponding author: giovyalmanza@yahoo.com.ar

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la cuantificación del rendimiento de extractos y de saponinas en residuos de escarificado generados en empresas exportadoras de quinua de los departamentos de La Paz, Oruro y Potosí, determinándose que los rendimientos de extracción varían desde 36,0 % hasta 39,4 % p/p, mientras que el porcentaje de saponinas en el extracto varía desde 47,3 % hasta 56,2 % y de saponinas en el mojuelo desde 17,3 % hasta 22,1 %. Adicionalmente, se optimizó un método de extracción de saponinas por maceración con mezclas hidroalcohólicas, considerando los siguientes parámetros: Relación masa/volumen de extracción; tiempo de extracción y relación porcentual EtOH/H₂O (v/v), determinándose que la mejor relación m/v de extracción es 1/9. El tiempo de extracción óptimo es de 72 h y la mejor mezcla de extracción es con 50/50 EtOH/H₂O. El porcentaje de saponinas se determinó utilizando los métodos de Espuma, Espectrofotométrico UV y por cromatografía HPLC, observándose que no hay grandes diferencias entre los 3 métodos aunque el método HPLC es el que tiene menos error y debería utilizarse como método de control para los otros métodos que son más baratos. Además, es muy importante utilizar como muestra de referencia un estándar de saponinas de quinua en todos los métodos.

INTRODUCCIÓN

Bolivia es el mayor productor y exportador de quinua real orgánica a nivel mundial con 46 % de la producción mundial. Esta variedad se produce únicamente en el Altiplano Sur de Bolivia donde la producción creció hasta en un 62,9 % en los últimos 7 años (INE 2009), este incremento se realizó principalmente los años 2005 y 2006 por su gran aceptación en mercados internacionales exóticos, de productos orgánicos y de comercio justo. Las exportaciones, principalmente a Estados Unidos, Francia, Países bajos y Alemania, se incrementaron desde 4 890 TM en el 2005 hasta 10 428 TM el 2008, constituyéndose en el principal cultivo de la región occidental de nuestro país [1] y generando una serie de cambios económicos, ambientales, sociales y culturales en la región. La principal aplicación de la quinua es como alimento, principalmente por el alto valor proteico de sus granos [2]. Sin embargo, además de sus componentes nutricionales, la quinua tiene saponinas, unas sustancias de sabor amargo localizadas principalmente

en el epispermo del grano, que deben ser eliminadas antes del consumo humano [3,4]. Para su eliminación, las empresas exportadoras de quinua, han desarrollado un proceso de beneficiado donde se separa el epispermo del grano mediante dos procesos: El primero es basado en la fricción entre granos por acción mecánica (escarificado) obteniéndose un polvo rico en saponinas denominado “mojuelo”. El segundo es un proceso de lavado con agua para eliminar el epispermo restante. El rendimiento del “mojuelo” es de alrededor de 4,5 % respecto al grano [5], por lo que cada año se generan toneladas de estos residuos en el Occidente Boliviano. Las saponinas se constituyen en una familia de compuestos de gran interés para la Industria, particularmente las saponinas de la quinua han mostrado un efecto inhibitorio de hongos, como *Botrytis cinérea* [6], toxicidad frente a camarones, actividad antiviral y actividad molusquicida, contra el caracol que afecta cultivos de arroz *Pomacea canaliculata* [7], por lo que se ha propuesto su uso en agricultura habiéndose ya registrado un biopesticida en base a saponinas de quinua en la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA, Environmental Protection Agency) con el nombre de Heads Up, destinado básicamente al control de hongos y enfermedades virales [8, 9]. Por otra parte, también tienen interés para la Industria Farmacéutica, por sus efectos reductores del colesterol, porque los fármacos co-administrados con saponinas mejoran la respuesta inmunológica del organismo debido a un aumento en su absorción [1, 10, 11] y por sus propiedades hemolíticas [12]. Finalmente, debido a sus propiedades surfactantes y emulsificantes, tiene interés en la elaboración de detergentes y como espumante en la elaboración de bebidas [13, 14]. Basados en el gran interés industrial de las saponinas de quinua, el presente trabajo presenta la cuantificación de saponinas en el “mojuelo”, generado en varias empresas beneficiadoras de quinua de los departamentos de La Paz, Oruro y Potosí, con el objetivo de contribuir al posterior uso de estos residuos en base a su contenido de saponinas. Para esto, se hizo una optimización del método de extracción, para luego proceder a la cuantificación de saponinas utilizando tres métodos: Espuma, Espectroscopia UV-Vis y Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC; de tal manera de comparar los resultados y además determinar el mejor método de cuantificación de este importante grupo de compuestos de la quinua real.

RESULTADOS Y DISCUSION

El trabajo se inició con una recolección de muestras de “mojuelo” de las empresas beneficiadoras de quinua con mayor producción y mayor accesibilidad de los departamentos de La Paz, Oruro y Potosí. Durante esta recolección de muestras, además se realizó una encuesta enfocada a la producción y control de residuos generados en el proceso de beneficiado.

Tabla 1. Datos sobre la materia prima y residuos generados en empresas beneficiadoras de quinua

Fuente: Elaboración propia en base a encuesta

N°	Empresa	Encuestado	Cargo	Materia Prima (Ton/año)	Residuos Generados (Ton/año)	% de Residuos Generados
1	Bio Andes	Oswaldo Diaz	Jefe de Producción	852	25,5	3,0
2	Jatary S.R.L.	Mario Miranda	Jefe de Planta	1500	42,9	2,9
3	QUIMBOLSUR	Edilberto Ignacio	Jefe de Planta	696	31,3	4,5
4	Real Andina	Javier Veliz Ramos	Jefe de Producción	516	27,8	5,4
5	CECAOT	Urbano Quispe Salinas	Presidente	732	36,5	5,0
6	Irupana Andean Organic Food S.A.	Dennis Nava	Supervisor de Producción	580	21,9	3,8
7	Andean Valley S.A.	Ariel Vargas	Jefe de Producción	876	70,1	8,0
8	SAITE S.R.L	Eduardo Ramos	Administrador de productos orgánicos	1920	96,0	5,0
9	CITY S.R.L.	Lourdes Luque	Aux. Control de Calidad	1080	86,4	8,0
10	ANAPQUI	Ovidio Silva	Responsable de Producción	6132	306,6	5,0
11	Quinua Food	Jesús Pérez	Jefe Control de Calidad	540	24,0	4,4
12	COMRURAL	Edwin Kantuta Q.	Jefe de Operaciones	2040	122,4	6,0

TOTALES

17464

891,3

La Tabla 1 presenta datos relevantes de la encuesta realizada. De acuerdo a estos datos se estima que se generan alrededor de 1 000 Ton al año de residuos, esto considerando que no se encuestaron a todas las empresas beneficiadoras de quinua y que, de acuerdo a investigaciones realizadas por PROINPA y el PIEB, se producen alrededor de 20 000 Ton de materia prima al año, las cuales en promedio generan alrededor de 4,5 % de residuos de escarificado. Como se puede observar en la Tabla 1, la empresa ANAPQUI es la principal generadora de este residuo, debido a que también es la que mayor cantidad de materia prima procesa. Luego están, las empresas SAITE, COMRURAL, CITY y Andean Valley generando junto a ANAPQUI alrededor del 70 % de residuos de escarificado. Por otra parte, se puede notar que el porcentaje de residuos generados varía entre un 3 a 8 % de la materia prima utilizada, este porcentaje depende sobre todo de las condiciones y estado del escarificador, observándose que las empresas CITY y Andean Valley cuentan con un proceso de escarificado muy eficiente por el constante seguimiento y mantenimiento de sus equipos. Además de los datos mostrados en la Tabla 1, se preguntó sobre la procedencia de la materia prima, el control de calidad de ésta y sobre el uso o destino de los residuos de escarificado generados. Así se determinó que en su mayoría adquieren la materia prima, quinua orgánica, de la zona intersalar. Entre los municipios productores tenemos: Santiago de Quillacas, Santiago de Huari, Salinas de Garci Mendoza, Pampa Aullagas, Uyuni, Llica, Tahua, San Pedro de Quemes, Colcha K, San Agustín y San Pablo de Lipes. En cuanto al control de calidad, en general solo cuentan con laboratorios básicos, aunque varios mencionaron que el principal control se realiza en el lugar de destino, vale decir en Europa y Estados Unidos. Sobre el uso de los residuos de escarificado, la mayor parte se desechan, una parte vuelve al lugar para utilizarlo como abono, otros pocos lo utilizan como pesticida junto a otras plantas y finalmente, existe una empresa que lo está vendiendo a Dinamarca (Andean Valley). Entre los residuos generados se puede observar diferentes coloraciones de acuerdo al color del ecotipo de quinua del que provienen, así por ejemplo tenemos: i) Mojuelo Rojo, correspondiente a los ecotipos pisankalla y ayrampu; ii) Mojuelo Blanco, correspondiente al ecotipo blanca real; iii) Mojuelo Rosado o mezcla, denominado así por ser producto de una mezcla de diferentes ecotipos y iv) Mojuelo Negro, correspondiente al ecotipo ajara. En general estos residuos se mezclan en las empresas beneficiadoras, lo cual no es aconsejable para el posterior uso de los mismos, ya que una diferente coloración también indica una diferente composición. Sin embargo, cabe mencionar que un 80 % de los residuos corresponden a quinua blanca. Finalmente, se pudo determinar que entre las empresas encuestadas se tienen un 21 % de empresas formadas por asociaciones de productores (como ANAPQUI, APQUISA, CECAOT), y el 79 % de empresas son privadas, aunque todas tienen estrecha relación con los productores para la adquisición de materia prima y es importante notar que los volúmenes de materia prima procesada por ANAPQUI son considerablemente mayores a las de las otras empresas, teniendo más del 30 % de la producción y exportación de quinua real.

Método de extracción de saponinas

Para la optimización del método de extracción se utilizó una muestra de mojuelo de quinua real blanca de la empresa Irupana Andean Organic Food, empleando como solventes mezclas de EtOH/H₂O y como método de extracción la maceración a temperatura ambiente, de acuerdo a datos previos obtenidos en el Laboratorio [5]. Se evaluaron los siguientes factores: tiempo de maceración, relación porcentual H₂O/EtOH y relación masa de mojuelo/volumen de solvente. Todos los factores fueron evaluados inicialmente respecto al porcentaje de extracto obtenido, determinándose así como mejores valores: un tiempo de maceración de 72 h y una relación de masa de mojuelo/volumen de solvente de 1/9, dado que a mayores valores no se observa una mayor extracción. Sin embargo, el factor más influyente y que produjo mayores variaciones fue la composición H₂O/EtOH de la mezcla de extracción. Es por esto, que en este caso, no solo se consideró el rendimiento del extracto sino también el porcentaje de saponinas presentes en los extractos. Así se realizó el análisis de saponinas por HPLC del estándar y de cuatro extractos obtenidos con mezclas de EtOH/H₂O al 75, 50, 25, y 0 % (Figura 1). El análisis del perfil cromatográfico en HPLC del estándar muestra cuatro picos principales a *tr* de 15.4; 20.3; 21.2; 25.9 min que corresponderían a saponinas, los picos por debajo de 10 min no corresponden a saponinas. Comparando el perfil del estándar con el de los extractos podemos observar que el extracto de EtOH/H₂O al 75 % presenta una gran cantidad de otros compuestos por debajo de 10 min y una menor proporción de las saponinas a 25,9 min; el extracto de EtOH/H₂O al 50 % es el de mayor similitud al estándar. Finalmente, los cromatogramas c) y d) muestran perfiles muy similares entre sí, pero en comparación al estándar menor cantidad de saponinas, además es importante mencionar que el mayor porcentaje de agua dificulta más su secado y se observa la formación de una masa melosa probablemente correspondiente a azúcares libres. También se evaluaron las saponinas por los métodos de espuma y espectrofotometría UV/VIS, los resultados empleando las tres técnicas se muestran en la Tabla 2. Observándose que no hay grandes diferencias entre los 3 métodos aunque el método HPLC es el que tiene menos error y debería

utilizarse como método de control para los otros métodos que son más baratos y pueden emplearse en los laboratorios de control de las empresas beneficiadoras.

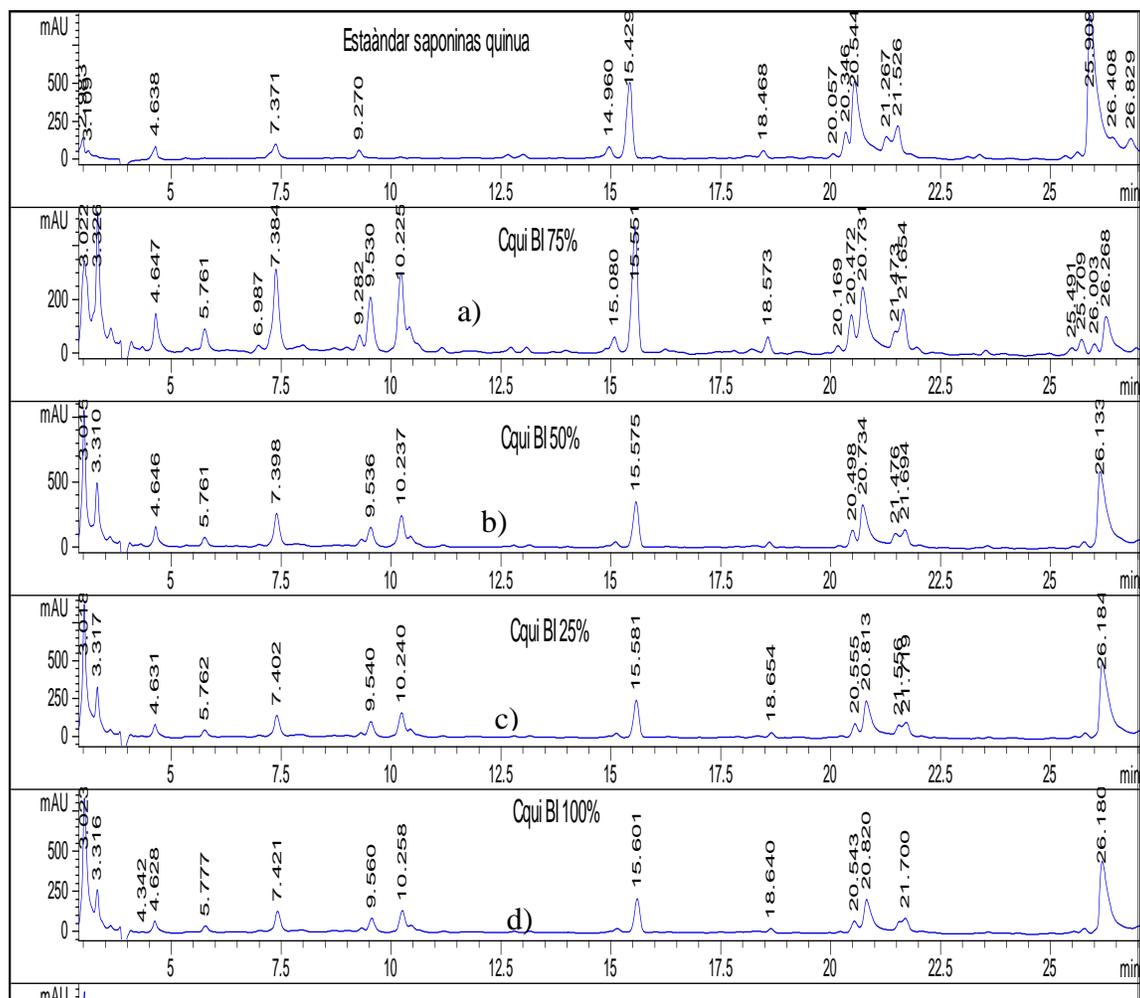


Figura 1. Cromatogramas RP- HPLC. a) estándar; b) extracto al 75 % EtOH/H₂O; c) extracto al 50 % EtOH/H₂O; d) extracto al 25 % EtOH/H₂O; e) extracto al 100 % de H₂O

Tabla 2. Análisis de saponinas en extractos obtenidos a diferentes concentraciones de EtOH/H₂O

Solventes/Método	UV 528 nm	Espuma	HPLC
75 % EtOH/H ₂ O	39,6 ± 1,6	37,9 ± 1,1	36,3 ± 0,1
50 % EtOH/H ₂ O	58,5 ± 1,6	57,0 ± 1,0	56,7 ± 0,2
25 % EtOH/H ₂ O	45,0 ± 1,3	44,7 ± 1,5	43,0 ± 0,2
H ₂ O	38,4 ± 1,6	41,0 ± 1,7	36,9 ± 0,1

Por tanto, se determinó que la mejor mezcla de solventes es EtOH/H₂O al 50 % y el mejor método es la cromatografía HPLC, aunque los otros métodos también se pueden utilizar, en particular el método de espuma, que resulta mucho más barato, pero teniendo en cuenta que preferentemente la agitación no debe ser manual, que los tubos deben tener una medida estándar y las lecturas de altura de espuma se deben realizar como mínimo tres veces por cada tubo, registrando solamente el promedio de la medida, además siempre se debe tener un estándar de saponinas de quinua como muestra de referencia, debido a que estándares de saponinas que no son de quinua generan mucho error.

Análisis de saponinas en residuos industriales de beneficiado de quinua

Con el método de extracción determinado se obtuvieron extractos hidroalcohólicos de saponinas de las muestras de mojuelo de ocho empresas exportadoras de quinua real: Irupana Andean Organic Food; Saite; Andean Valley; APQUISA; Jatary; PROAMBOL; Real Andina y CECAOT. En los extractos obtenidos se evaluaron el rendimiento de extracción en % p/p y el contenido de saponinas en % p/p respecto al extracto y al mojuelo, utilizando el método de Espuma (Figura 2). Los rendimientos de extracción varían desde 36,0 % p/p en el caso de la empresa Real Andina hasta 59,4 % p/p en el caso de la empresa Irupana, mientras que el porcentaje de saponinas en el extracto varía desde 47,3 % hasta 56,2 % y de saponinas en el mojuelo desde 17,3 % hasta 22,1 %. Las empresas donde se observa mayor porcentaje de saponinas en sus extractos son: Irupana, Saite y Andean Valley, que tienen las mejores condiciones de almacenamiento de residuos, ya que poseen depósitos de almacenamiento de mojuelo. La letra B indica que el mojuelo es de quinua blanca, R de quinua roja y M de mezcla de residuos, determinándose que el ecotipo de Quinua Real Blanca es el que tiene mayor concentración de saponinas, esto debido a que en los otros ecotipos aumenta el porcentaje de colorantes.

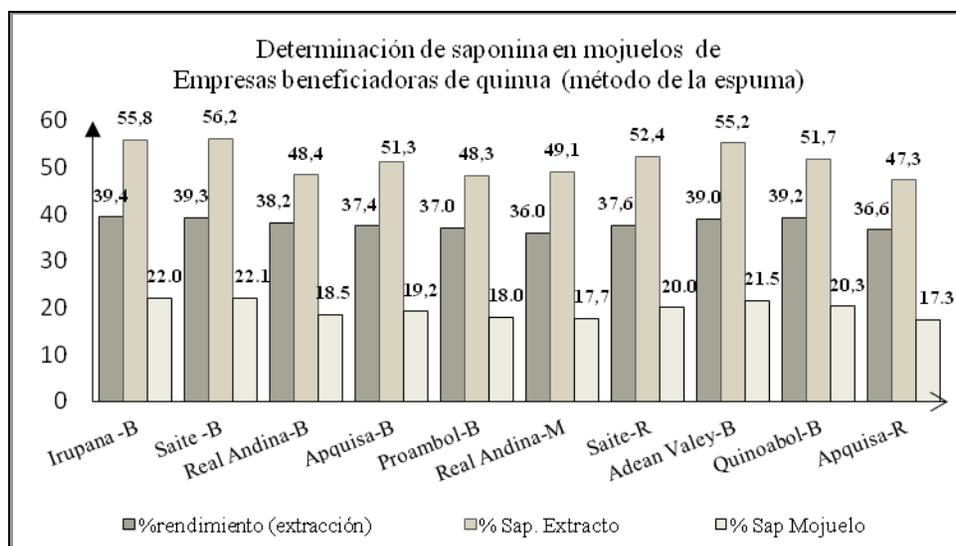


Figura 2. Evaluación de % Extractivos, % de saponina en el extracto y % de saponina en el mojuelo por el método de espuma, de residuos obtenidos en diferentes empresas beneficiadoras de Bolivia.

Por tanto, se determinó que el contenido de saponinas en el mojuelo de las empresas beneficiadoras de quinua está alrededor del 20 %, lo cual resulta muy interesante considerando que las saponinas tienen diversas aplicaciones en la industria de pesticidas orgánicos [6-9], en la industria farmacéutica [10-12] y en las industrias de detergentes y de bebidas espumantes [13,14]

SECCION EXPERIMENTAL

Equipos y Reactivos

Las mediciones por el método espectrofotométrico se realizaron en un Espectrofotómetro UV-Vis Aquarius 7000 series, el método de cromatografía líquida de alta resolución se desarrolló en un equipo HPLC Agilent 1100 series, con detector DAD y utilizando una columna RP C₁₈. Los solventes utilizados para la extracción (EtOH y H₂O) tenían grado q.p. pero fueron purificados por destilación previamente a su uso, el solvente utilizado para el análisis espectrofotométrico (MeOH) tenía grado p.a. y los solventes utilizados para el análisis cromatográfico (ACN y H₂O) calidad HPLC.

Materia prima

Las muestras de mojuelo, o residuos de escarificado, se recolectaron entre agosto de 2008 y mayo de 2009 de empresas beneficiadoras localizadas en los departamentos de La Paz, Oruro y Potosí (Tabla 1), las cuales procesan

quinua proveniente principalmente de la zona intersalar del Altiplano Sur de Bolivia. Durante la recolección de muestras se hizo también la recolección de información a través de encuestas, sin embargo no en todas las empresas visitadas y encuestadas nos facilitaron los residuos de escarificado en la cantidad suficiente para realizar el presente trabajo, esto debido a la inexistencia de estos residuos en el momento de la encuesta o porque no estaba la persona responsable de la dotación, por este motivo el número de residuos analizados no se corresponde con el número de empresas encuestadas. En total se seleccionaron 10 muestras de mojuelo, las cuales fueron clasificadas de acuerdo al color que presentaban en: Blanca (B), Roja (R) y Mezcla (M), para luego ser nombradas de acuerdo a la empresa de la que provenían y el color que presentaban, así por ejemplo Saite-R corresponde a una muestra de la empresa Saite y la letra R indica su color rojo (ecotipo pisankalla o ayrampo).

Optimización del método de extracción

Para optimizar el método de extracción de saponinas del mojuelo de quinua real, se trabajó con una muestra de residuos de quinua real blanca de la empresa Irupana Andean Organic Food S.R.L., debido a que en ésta empresa se nos brindó facilidades para el control y acceso a estos residuos, además de que se encuentra localizada en la ciudad de La Paz. Para la extracción se eligió la técnica de maceración a temperatura ambiente debido a que las saponinas son termolábiles, pudiendo sufrir hidrólisis sobre los 70°C. Por otra parte se eligieron como solventes mezclas de etanol y agua, debido a datos previos del grupo [5] además que se pretende que este método sirva para posteriores aplicaciones industriales y estos solventes son económicos y de gran disponibilidad en Bolivia. En base a estos datos, para la optimización se evaluaron los siguientes factores: tiempo de maceración, relación porcentual H₂O/EtOH y relación masa de mojuelo/volumen de solvente, para cada factor se tomaron en cuenta cuatro niveles correspondientes a cada experimento como E-1, E-2, E-3, E-4; como se describen en la siguiente tabla 3.

Tabla 3. Factores de evaluación para la optimización del método de extracción de Saponinas

PARAMETRO	E-1	E-2	E-3	E-4
Tiempo de extracción (h)	24	48	72	96
Mezcla agua/etanol (%)	100	75	50	25
Relación masa/volumen [mg/ml]	1:1	1:2	1:3	1:4

En cada experimento se evaluó como variable respuesta el rendimiento de la extracción. La variable más importante es la mezcla de solventes empleada donde además se determinó el % de saponina en el extracto mediante los métodos: espectrofotometría UV-Vis, cromatografía líquida de alta resolución HPLC, y altura de espuma. En cada caso, el extracto obtenido fue concentrado a presión reducida hasta la evaporación total del etanol, el residuo acuoso luego fue congelado a -18°C durante 24 h y a -80°C durante 3 h para ser llevado a liofilización por un periodo de 72 h, luego del cual el extracto seco se pesó para los cálculos posteriores de rendimiento de la extracción.

Determinación del contenido de saponina por el método de espuma

Para esta prueba se siguió el método establecido por Koziol [14] que en primera instancia requiere la elaboración de una curva de calibración con un estándar. El estándar de saponinas de quinua real fue obtenido en la Universidad de Santiago de Chile y tiene en su composición 80 % de saponinas. Con este estándar se prepararon cinco soluciones en concentración creciente que fueron procesadas de la siguiente manera: Se disponen 5 ml de agua destilada en tubos de ensayo de 18 mm de diámetro, por triplicado. Se introducen en los tubos 0,8; 1,6; 2,4; 3,2 y 4 mg del estándar y se tapa cada tubo con parafilm. Se dispone cada tubo en posición vertical y se agita vigorosamente 30 s, luego de los cuales se coloca el tubo en una superficie horizontal y se retira el parafilm. La primera medición (altura de espuma en cm) se toma luego de transcurridos 30 segundos después de la agitación. La segunda medición (altura de espuma en cm) se toma luego de transcurridos 15 minutos de la agitación. Después de la segunda medición, se agita nuevamente cada tubo por 30 segundos y se registra nuevamente la altura de espuma a los 30 s después de la agitación y luego de 15 min de reposo. Con esta metodología se realizó la curva de calibración obteniéndose una recta que corresponde a la ecuación: $Y = 2,154X + 0,455$ con $R^2 = 0,988$. En base a la ecuación de la recta de calibración se calculó el porcentaje de saponinas de cada muestra utilizando las siguientes ecuaciones:

$$Y = 2,154X + 0,455$$

$$Z = X/W * 100$$

Dónde: X = mg de saponina en 5ml de solución acuosa; Y = Altura de espuma en cm; Z = Porcentaje de saponina en el extracto y W = mg de extracto en 5 ml de solución acuosa.

Determinación del contenido de saponina por espectrofotometría UV-VIS

Para esta determinación se siguió el protocolo establecido por Monje y Raffailac [15] en el cual se hace uso de la adición del reactivo de Lieberman-Burchard (LB) para formar productos coloridos al reaccionar con saponinas. El reactivo LB consiste en una mezcla al 16,7 % de Anhídrido acético en Ácido sulfúrico concentrado. Al igual que en el anterior caso, inicialmente se elaboró una curva de calibración Absorbancia vs. Concentración utilizando el estándar obtenido en Chile. Para esta curva se prepararon soluciones a las siguientes concentraciones: 0,00; 0,05; 0,1; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35 mg/ml, de cada concentración se prepararon 2 ml, a los cuales se adicionaron 7 ml del reactivo de LB, se agito 20 s con un vortex y se dejó en reposo 30 min. Finalmente para determinar la longitud de onda de la máxima absorción (λ_{\max}) para realizar las lecturas posteriores en el espectrofotómetro, se realizó un barrido con el estándar. La λ_{\max} determinada fue de 528 nm y a esta longitud de onda se realizaron las mediciones para la curva de calibración y posteriormente para las muestras de mojuelo seleccionadas. La curva de calibración dio una recta de ecuación $Y = 0,912X - 0,003$ y $R^2 = 0,995$. De manera similar al anterior método, a partir de la curva de calibración se pudo cuantificar el porcentaje de saponinas presentes en cada muestra evaluada.

Determinación de saponinas por cromatografía líquida de alta resolución HPLC

Para el análisis de saponinas por HPLC se acondicionó un método en base a los métodos desarrollados por San Martín & Briones [16] y Madl *et al* [17]. El análisis fue realizado en un equipo HPLC Agilent 1100 series. Las separaciones fueron corridas en una columna Kromasil RP C₁₈ de 4 mm*125 mm d.i., 5µm a 20°C y 210 nm. Se inyectaron 5µl de muestras de concentración 30 mg/ml de extracto de mojuelo. Para la separación se empleó como fase móvil agua al 0,1 % en ácido fórmico como solvente "A" y Acetonitrilo como solvente "D", para la elución se trabajó con un sistema en gradiente lineal de 75 % a 65 % de solvente "A" con un flujo constante de 0,7 ml/min durante 15 min, luego se cambió de flujo de 0,7 a 1,0 ml/min en los siguientes 20 min con un gradiente lineal de 65 % a 55 % de solvente "A". Las muestras, previamente a la inyección al equipo, fueron preparadas por disolución de 30 mg/ml de extracto en agua grado HPLC con agitación magnética de 3 min en vasos de precipitado de 10 ml cerrados con parafilm, luego se pasaron por un filtro de mezcla éster celulosa (Mixed cellulose Ester DISMIC-25) de 0,45 µm y se repartieron en ependorfs de 1ml previamente autoclavados a 121 °C. Para la cuantificación de saponinas por este método se realizó inicialmente el cromatograma del estándar, luego con el mismo método y por duplicado de cada una de las muestras, los resultados se dan en porcentaje relativo de la composición total de saponinas en el extracto, mediante una comparación de áreas totales de la muestra respecto con el estándar de saponinas considerando que este tiene una pureza del 80 %. Es así que se empleó las ecuaciones que se muestran a continuación:

$$X = A/B * 80 ; Y = X * R / 100$$

Dónde: X = porcentaje de saponina en el extracto; A = área total de la muestra; B = área total del estándar; Y = porcentaje de saponina en el mojuelo y R = rendimiento de extracción

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Agencia Sueca ASDI por el financiamiento a los proyectos "Estudio de la Biodiversidad Vegetal" y "Pesticidas Orgánicos a partir de Especies Vegetales Andinas de Bolivia (Parte I)" gracias a los cuales se pudieron realizar las investigaciones del presente trabajo. Así mismo, quieren agradecer al personal de las empresas beneficiadoras visitadas, por toda su colaboración, en particular al de la empresa Irupana Andean Organic Food S.R.L. que permitió la observación y control de las muestras de residuos de escarificación colectadas.

REFERENCIAS

1. Quintanilla R. J. Capítulo I Producción de Quinoa: Oruro Potosí. La Paz, Bolivia, 2010, pp 32-63
2. IBCE (Instituto Boliviano de Comercio Exterior) *La Quinoa: Oportunidades para su comercialización a nivel mundial*, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, Junio 2010. N° 183
3. Maestbroek H., Limburg H., Gilles T., Marvin H. Occurrence of saponin in leaves and seeds of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of the Science of food and Agriculture* 2000, 80, pp 152-156
4. Centro de Promociones de Tecnologías Sostenibles (CPTS). *Estudio de caso PML, Empresa Andean Valley S.A.* 2006, AVSA 01
5. Flores Y., Díaz C., Garay F., Colque O., Sterner O., Almanza G. R. "Oleanane-type triterpenes and derivatives from seed coat of Bolivian *Chenopodium quinoa* genotype salar" *Revista Boliviana de Química* 2005, 22, N°1, pp 71-77
6. Kuljanabagavad, T. and Wink, M. "Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd". *Phytochemistry Review* 2009, 8, pp 473-490

7. San Martín R., Ndjoko K., Hostettmann K. "Novel molluscicide against *Pomacea canaliculata* based on quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins", *Crop Protection* 2008, 27, pp 310-317
8. ES 1940232 (Patente Europea) *Method and a composition of a biopesticida based on quinoa saponins (Chenopodium quinoa)*. 2005
9. Estrada A., Redmond M. J.; Laarveld B., US005688772A (Patente norteamericana) *Quinoa saponin compositions and methods of use* Saskatoon, Canada, 1997
10. Cui M., Song F., Zhou Y., Liu Z. and Liu S. "Rapid identification of saponins in plant extracts by electrospray ionization multi-stage tandem mass spectrometry and liquid chromatography/ tandem mass spectrometry". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000, 14, pp. 1280–1286.
11. Vega A., Miranda M., Vergara J., Uribe E., Puente L. y Martínez E. "Nutritional facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), an ancient grain: a review". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2010, 90, pp. 2541–2547.
12. Reichert R. D., Tatarynovich J. T., Tyler R.T. "Abrasive Dehulling of Quinoa (*Chenopodium quinoa*): Effect on Saponin Content as Determined by an Adapted Hemolytic Assay". *Cereal Chemistry* 1986. 63 N° 6, pp 471-475
13. Güclü-Üstundaga O. & Mazzaa G. "Saponins: Properties, Applications and Processing", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2007, 47, N° 3, pp. 231-258
14. Koziol M.J. "Afrosimetric estimation of threshold saponin concentration for bitterness in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd)" *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1991, 54 N°2 pp. 211–219
15. Monje C. Y., Raffailac J. P. "Determinación de saponina total en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) método Espectrofotométrico". Memoria IV Congreso Nacional de la Asociación Boliviana de Protección Vegetal. Oruro, 5 al 7 de abril de 2006. C.E.A.C. -Dpto. Fitotecnica-FCAPV UTO. ABPV. Oruro, Bolivia, pp. 217-218
16. San Martín R., Briones R. "Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC", *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000, 80, pp. 2063- 2068.
17. Madl T., Sterk H., Mittelbach M. "Tandem Mass Spectrometric Analysis of a Complex Triterpene Saponin Mixture o *Chenopodium quinoa*", *J. Agric. Food Chem* 2006, 17, pp. 795–806.