



CUANTIFICACION DE SAPONINAS EN MUESTRAS DE CAÑIHUA

CHENOPODIUM PALLIDICAULE AELLEN

Bianca Guzmán^a; Dora L. Cruz^b; Juan A. Alvarado^c; Patricia Mollinedo^a

^aInstituto de Investigaciones en Productos Naturales (IIPN), Carrera de Ciencias Químicas, FCPN, UMSA, Campus Universitario UMSA, Edificio FCPN 2º Piso, Calle Andrés Bello y c. 27, Cota Cota, La Paz, Bolivia

Keywords: Cañihua, Quinoa, Cuantificación, saponinas.

ABSTRACT

The quantification of the saponin contents of grains of *Chenopodium pallidicaule* was carried out through UV/VIS analyses.

*Corresponding author: pattymollinedo@gmail.com

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la cuantificación de saponinas en extractos acuosos de 15 muestras de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* A) provenientes del Banco de Germoplasma PROINPA-La Paz, dos muestras adicionales, una muestra de quinua (*Chenopodium quinoa*) y otra de una especie reportada por su alto contenido de saponina denominada quentu (*Rumex acetosella*). Para la determinación y cuantificación de saponinas en las muestras se empleó el método de espuma los valores encontrados están entre 7.5 y 21,5 mg/g para la cañihua, por el método espectrofotométrico UV/VIS el rango determinado para el contenido de saponina es de 8,7 a 43,2 mg/g, observándose la diferencia que existe entre ambos métodos para la cuantificación. Adicionalmente se analizaron dos muestras, una de quinua desgrasada (Muestra 16) y otra de quentu (Muestra 17) esta última con una apreciable cantidad de saponina 121,6 mg/g de muestra. Para garantizar las determinaciones y resultados se empleó un estándar de saponina.

INTRODUCCION

Entre los granos andinos que en la actualidad se viene recuperando y difundiendo a nivel mundial, contamos paralelamente al de la quinua, a los granos de cañihua (su nombre local en Bolivia es cañahua) de la especie *Chenopodium pallidicaule*, cuya importancia radica en la composición nutricional alta que posee, en comparación con el pequeño diámetro de su grano. [2]

Tabla 1. Análisis nutricional de cereales

ALIMENTO	PROTEÍNA	GRASA	FIBRA CRUDA	CENIZA	GLÚCIDOS
Trigo Manitoba	16.0	2.9	2.6	1.8	74.1
Trigo Inglés	10.5	2.6	2.5	1.8	78.6
Cebada	11.8	1.8	5.3	3.1	78.1
Avena	11.6	5.2	10.4	2.9	69.8
Centeno	13.4	1.8	2.6	2.1	80.1
Triticale	15.0	1.7	2.6	2.0	78.7
Arroz	9.1	2.2	10.2	7.2	71.2
Maíz	11.1	4.9	2.1	1.7	80.2
Sorgo	12.4	3.6	2.7	1.7	79.7
Quinua	14.4	6.0	4.0	2.9	72.6
Cañihua	18.8	7.6	6.1	4.1	63.4
Amaranto	14.5	6.4	5.0	2.6	71.5

Fuente: Repo Carrasco et al (2009)



La quinua y la cañihua han sido junto con la papa, los primeros cultivos que la cultura Chiripa, antecedente de la civilización de Tihuanaco) difundió en la región circunlacustre del Lago Titicaca. Como reporta David L. Browman, los granos quenopodiáceos formaron parte del primer patrón nutricional agrícola conformado en esa región. Browman, [1]. Los granos de cañihua nunca dejaron de ser utilizados por la población altiplánica donde este grano es aún cultivado, ya que cuenta además de un plus por su valor nutricional. Desde antiguo, era conocido que este grano estaba libre o tenía un menor contenido de saponinas [3]. Su consumo es más fácil que el de la quinua, pues se evitan los sucesivos lavados para su eliminación. Sin embargo, investigaciones de Rastrelli et al [3] reportaron, en varias líneas y variedades, que ese autor no identificó, el aislamiento y elucidación de siete saponinas triterpenoides por métodos químicos y espectroscópicos, dato importante para la caracterización del grano en estudio. La presencia de ácido vainílico en productos de cañihua ha permitido que fuesen utilizados sin problema por la población en formas muy diversas, en especial como refrescos, harinas, expandidos y como base para repostería. La determinación de éste compuesto fue realizado por Peñarrieta et al [5]. La composición química de éste grano está siendo revalorizada por la actividad antioxidante que posee, tornándola en un alimento funcional ideal. Repo Carrasco, Peñarrieta [5] y otros estudios en diferentes especies de este grano corroboran esta aseveración. Las saponinas son compuestos glucosídicos, poseen una estructura que contiene dos partes: glucona y aglucona. La parte glucona está compuesta por azúcares sencillos de 1 a 5 unidades; mientras que la parte aglucona, conocida como sapogenina, consta de un esqueleto de tipo del tipo esteroideal (C 27) o triterpenoide (C 30). [10] Se conoce que éstos metabolitos posee propiedad hemolítica en contacto con la sangre porque interaccionan con el colesterol de la membrana de los eritrocitos. El poder hemolítico es característico de los saponósidos triterpénicos, pero es variable según los sustituyentes de la estructura. Así, los saponósidos monodesmosídicos son hemolíticos mientras que los bidesmosídicos no lo son. Debido a su poder hemolítico resultan muy tóxicos si se administran por vía intravenosa, ya que de esta manera contactan directamente con la sangre, mientras que por vía oral su toxicidad es muy baja [6]. Además, la mayoría de los saponósidos son icotóxicos, es decir, son tóxicos para animales de sangre fría, sobre todo para los peces. De acuerdo a los antecedentes, se pretende cuantificar las saponinas, ya elucidadas en granos de cañihua, quinua y quentu para contribuir a la expansión de su empleo no solo a nivel regional, sino internacional, ya que de acuerdo a la Clasificación que realiza el IBNORCA (La Paz), los granos pueden ser muy amargos si contienen saponinas en concentración entre 1 a 3%, granos de contenido medio 0.1 a 1% y granos dulces entre 0.00 a 0.1, citado por Quiroga [6]. Además la Norma Boliviana NB NA 0038, establece niveles de consumo de saponinas menores a 0.02% en los alimentos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo fue realizado con muestras de granos que fueron otorgados por PROINPA con el nombre de accesiones en el Banco de Germoplasma, que actualmente se encuentra bajo la supervisión del INIAF. Las muestras seleccionadas son las más representativas por su uniformidad y pureza. La Tabla 2 muestra las características de origen de las muestras estudiadas.

Tabla 2. Muestras extraídas y cuantificadas

N°	Código	Lugar	Altura msnm	Longitud (19L)	Latitud (UTM)	Variedad	Propietario
1	A-475	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
2	A-399	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
3	GNAR	Independencia	-	-	-	Silvestre	Muestreo CEIQA 2008
4	A-636	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
5	A-197	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
6	A-137	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
7	A-173	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
8	A-166	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
9	A-300	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
9	A-616	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
10	A-771	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
11	A-151	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
12	A-155	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
13	A-222	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
14	A-187	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA

Para la extracción de las saponinas [2], de acuerdo a reportes bibliográficos en los que se evaluaron dos solventes en distintas proporciones y se determinó el rendimiento de extracción en medio alcohólico y acuoso, ambos rendimientos fueron similares, por lo que para el presente estudio se prefirió el medio acuoso debido a que el etanol inhibe el índice de espuma y es capaz de extraer otras moléculas que presenten absorbancia a la longitud de onda de 528 nm interfiriendo de esta manera con las lecturas para las pruebas cuantitativas. [12]. Además se tomó en cuenta que el consumo de este grano implica simplemente el lavado con agua, por parte de los consumidores, para remover los compuestos amargos o saponinas conocidos como “ajara” o amargos. Para la optimización del método de extracción se utilizaron las muestras de granos de cañihua que fueron otorgados por PROINPA, empleando como solvente agua destilada y como método de extracción la agitación continua de las muestras a temperatura ambiente. Se evaluaron previamente los parámetros de extracción como ser: tiempo de agitación, relación porcentual de solventes EtOH/H₂O y relación masa de cañihua /volumen de solvente, determinándose así como mejores resultados un tiempo de agitación de 24 hrs., relación masa de cañihua /volumen de solvente de 1/20 y como solvente agua destilada.

Tabla 3. Determinación de absorbancias de saponinas en extractos con diferentes proporciones de agua-etanol como solvente. Método espectrofotométrico.

Nº	Relación de solventes	Absorbancia en el UV/VIS $\lambda=528$ nm
1	Agua	0.262
2	EtOH/Agua 10/90	0.174
3	EtOH/Agua 20/80	0.148
4	EtOH/Agua 50/50	0.135

Por tanto, se determinó que el mayor porcentaje de rendimiento de extracción de saponinas se logra con agua destilada, empleándose para la extracción de todas las muestras en el estudio.

La determinación y cuantificación de saponinas en las muestras de cañihua se realizó por los métodos espectrofotometría UV/VIS y espuma, empleando el método de determinación por curva estándar para ambos Graf 3 y 4.

Curva estándar de Saponina.

Por el método espectrofotométrico UV/VIS.

La curva estándar promedio de saponinas fue determinada siguiendo el protocolo de Monje y Raffaellie [8]. Los resultados muestran la curva estándar promedio de los ensayos por quintuplicado. La curva de calibración toma en cuenta la interferencia de color de las muestras en la determinación del blanco para cada determinación con el reactivo color Lieberman-Burchard, también se consideró la desviación estándar de las medidas. Los resultados se muestran en la Graf. 1. En la que se puede comprobar el comportamiento lineal de la relación entre absorbancia y concentración de saponina cumpliendo la Ley de Beer para determinaciones de concentraciones desconocidas de saponinas de muestras de granos.

Curva estándar promedio de saponinas

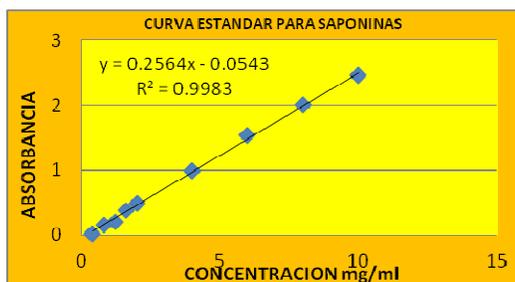


Gráfico 1. Curva Estándar – espectrofotometría

Por el método de espuma

Los resultados de la cuantificación de saponinas por el método de espuma, ampliamente aplicado para la determinación de concentración de saponinas de quinua y reportado por Lozano M. [9], se muestran en la Graf. 2, en la que se determina la curva promedio estándar por quintuplicado de saponinas.
Curva estándar promedio de saponinas

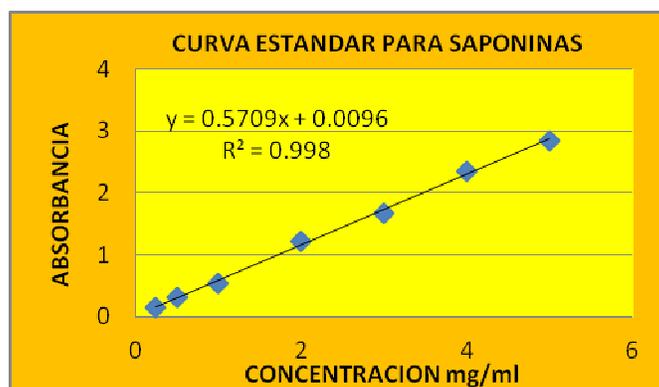


Gráfico 2. Curva Estándar – Índice de Espuma

Análisis de saponinas en muestras de granos de cañihua

Con el método de extracción determinado en ensayos previos se obtuvieron extractos acuosos de saponinas de las 17 muestras de las cuales 15 son muestras de cañihua, una muestra de quinua y otra de quentu. La cantidad de saponina en las muestras de cañihua, determinada por espectrofotometría UV/VIS varía de 8,7 (muestra 4) a 43,2 mg/g (muestra 14) como se puede observar en el Graf. 3 y por el método de espuma varía entre 7.5 (muestra 4) y 21,5 mg/mL (muestra 14) como se muestra en el Graf 4.

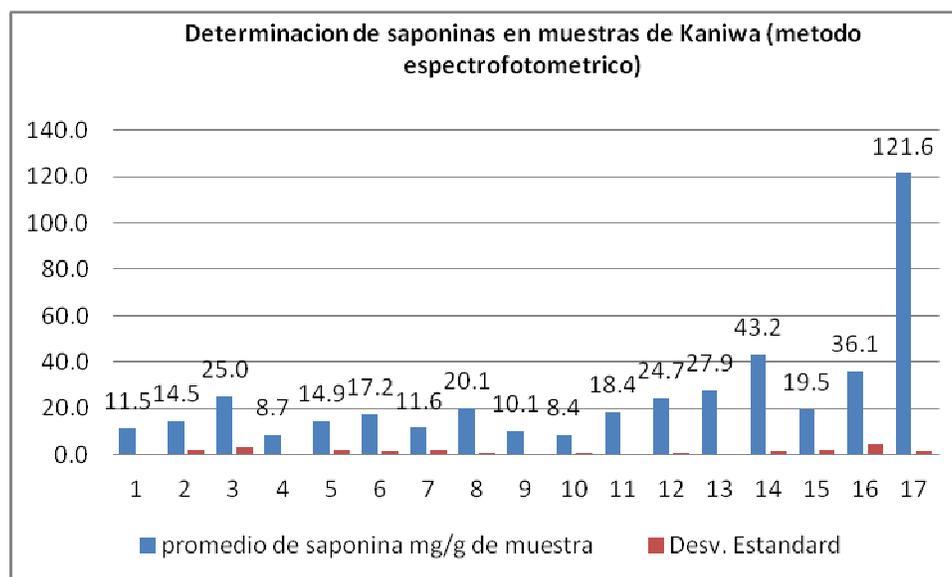


Gráfico 3. Cuantificación de saponinas en las muestras de cañihua en mg de saponina por g de muestra determinadas por espectrofotometría UV/VIS y sus respectivas desviaciones estándar

La cuantificación espectrofotométrica permitió establecer que las muestras contienen una apreciable cantidad de saponinas. El quentu (muestra 17) contiene 121.6 mg/g de muestra, la cañihua varía entre 8,7 (muestra 4) a 43,2 mg/g (muestra 14) y la quinua contiene 36.1 mg/g, valores superiores al 0.1%.

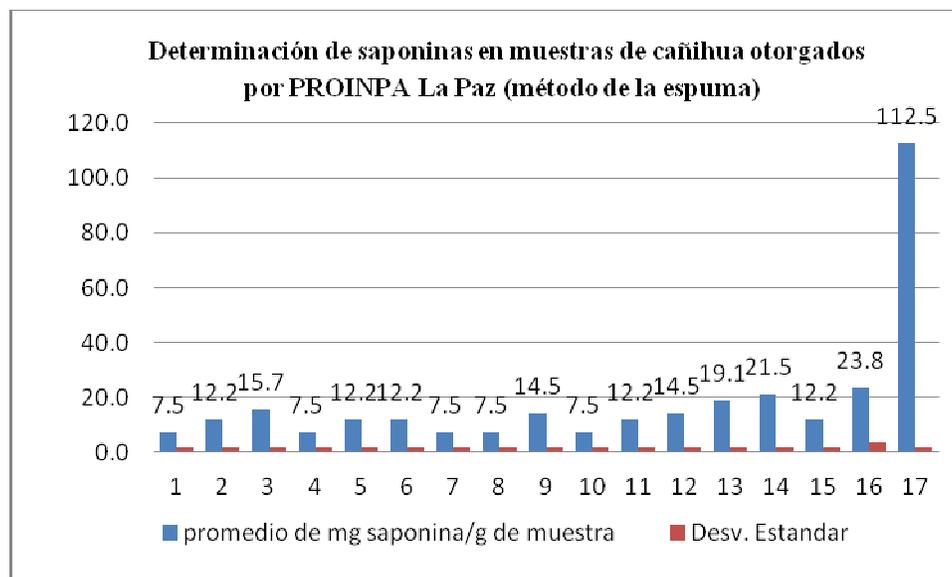


Grafico 4. Cuantificación de saponinas en las muestras de cañihua en miligramos de saponina por gramo de muestra determinadas por el método de espuma y sus respectivas desviaciones estándar.

Con los resultados obtenidos por el método de espuma se pudo establecer que las muestras contienen saponina, debido a la formación de espuma. En el Graf. 4 se puede apreciar los miligramos de saponina por gramo de muestra, observando que el quentu (muestra 17) contiene 112.5 mg/g en comparación con las muestras de cañihua (muestra de 1 a 15) y quinua (muestra 16) que presentaron cantidades menores a 23.8 mg/g. En base a los resultados obtenidos se cuantificó las saponinas, pudiéndose observar que el quentu (muestra 17) presenta mayor cantidad de saponina con 121,6 mg/g, en comparación con las muestras de cañihua, siendo menores a 43 mg/g, y la quinua que presenta 36,1 mg por gramo de muestra, determinados por el método espectrofotométrico, considerando que ambos métodos correlacionan en los valores máximos de cada muestra, aunque en los valores de límite superior, no muestran una correlación en magnitud. Por otra parte ambos métodos utilizados son importantes en la cuantificación de saponinas, como se observa en los resultados obtenidos. En el quentu (muestra 17) se observa la correlación de los resultados obtenidos por los dos métodos, debido a la notable cantidad de saponina presente en esta última muestra. Por último, se puede inferir que las muestras presentan valores superiores al 0.1% lo cual resulta interesante teniendo en cuenta que las saponinas tienen diversas aplicaciones en las industrias de detergentes, biocontroladores y como componente en los extinguidores.

EXPERIMENTAL

Equipos y Reactivos

Las lecturas de absorbancia se realizaron en un Espectrofotómetro UV/VIS PERKIN ELMER. El solvente utilizado para la extracción fue agua destilada y el reactivo color contenía sustancias de grado p.a. También se utilizó un estándar de saponina.

Materia prima

Las muestras de cañihua provienen de cultivos del Altiplano de La Paz, colectados por PROINPA que cuenta con una hoja de registro de todos los datos botánicos. Sólo una de las muestras proviene como parte de los muestreos realizados por el Equipo CEIQA (Carrera de Química, Centro de Estudios e Investigaciones en Química de Alimentos) que proviene de la región de Independencia, Cochabamba.

Cuantificación de saponinas por el método de espuma



Para esta prueba se elaboró una recta de calibración con un estándar de saponina. A partir de una solución madre de concentración 20 mg/mL, utilizando como solvente agua destilada, se prepararon siete soluciones de concentración 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/mL. Estas soluciones se agitaron vigorosamente durante 30 s. dos veces, para las lecturas se necesitan 15 min de reposo, realizándose así las medidas de altura de espuma de cada uno. Esta prueba se realizó 6 veces para cada estándar obteniéndose un promedio de altura de espuma para cada tubo. De esta forma se obtuvo la recta de calibración correspondiente a la gráfica [2].

Cuantificación de saponinas por espectrofotometría UV-VIS

Para la determinación y cuantificación de saponinas se hace uso del reactivo Lieberman-Burchard para formar productos coloridos. Este reactivo color consiste en una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado (1:5). Para lo cual también se elaboró una curva de calibración con un estándar de saponina. Para esta curva se preparó una solución madre de 20 mg/mL a partir de la cual se prepararon diluciones de 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10 mg/mL respectivamente, se tomaron 0.6 mL de las diluciones se adicionaron a los en tubos de ensayo a 1.0 mL de reactivo color, se agitó cada tubo en un vortex 30 s y se dejó en reposo 37 min.

De esta forma se obtuvo la recta de calibración correspondiente al Graf. [1] Para determinar la longitud máxima de Absorción se realizó un barrido con un estándar de saponina, obteniéndose una longitud de onda máxima a 528 nm, longitud de onda a la cual se realizaron las lecturas correspondientes a la curva de calibración de la gráfica [1]. De la misma forma fueron analizadas todas las demás muestras.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los fondos concursables de IDH.

REFERENCIAS

1. BROWMAN, DAVID L., 1983. Aspectos de Nutrición Prehistórica en la Cuenca del Lago Titicaca. Revista "Diálogo Andino" No 2. Departamento de Historia y Geografía. Universidad de Tarapacá, Arica-Chile
2. REPO-CARRASCO R, ACEVEDO DE LA CRUZ A, ICOCHEA J, KALLIO H Plant Foods Human Nutrition, 2009, 1-8. doi 10.1007/s11130-009-0109-0.) Chemical and Functional Characterization of Kañiwa (Chenopodium pallidicaule) Grain, Extrudate and Bran.
3. LOUIS GIRAUULT Journal de la Societe des Americanistes, 1966, Paris 55 (1): 155-200. Classification vernaculaire des plantes medicinales chez les callawayas, medecin empiriques, Bolivie.
4. RASTRELLI L, DE SIMONE F, SCETTINO O, DINI A J. Agric. Food Chem, 1996, 44(11): 3528-3533. Constituents of Chenopodium pallidicaule (Cañihua) Seeds: isolation and characterization of new triterpene Saponins.
5. PEÑARRIETA M, ALVARADO J, AKESSON B, BERGENSTÅHL B. Mol. Nutr. Food Res, 2008, 52: 708-717. doi 10.1002/mnfr.200700189. Total antioxidant capacity and content of flavonoids and other phenolic compounds in cañihua (Chenopodium pallidicaule): An Andean pseudocereal.
6. KELLER H. Darwiniana, 2009, Vol 47. N°1. San Isidro ene/jun El vyvyraro, un árbol icotóxico de los guaraníes de Misiones, Argentina. Arqueo botánica y Etnobotánica.
7. QUIROGA C, ESCALERA R. Investigación & Desarrollo, 2010, 10:23-36. Evaluación de la Calidad Nutricional y Morfología del Grano de Variedades Amargas de Quinoa Beneficiadas en Seco, Mediante el Novedoso Empleo de un Reactor de Lecho Fluidizado del Tipo Surtidor. 7. MONJE C. Y., RAFFAILLAC J. P. "Determinación de saponina total en quinoa (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. Fitotecnia – FCAPV UTO. ABPV. Oruro, Bolivia, pp. 217-218.
8. LOZANO M. "Obtención, cuantificación y determinación de la actividad anti fúngica de saponinas totales de residuos de quinoa real (Chenopodium quinoa)" tesis de licenciatura 2010.9. DINI, I.; SCETTINO, O.; SIMIOLI, T.; DINI, A. "Studies on the constituents of Chenopodium quinoa seeds: Isolation and characterization of new triterpene saponins". J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 741-746.10. ZEGARRA, G. "Actividad deterrente y acaricida de principios activos de quinuas amargas, aceites esenciales y tarwi" Pontificia Universidad Católica del Perú, Facultad de Ciencias e Ingeniería, tesis de licenciatura, 2010, 29.
11. YARKO M, PIERRE R. "Determinación de Saponinas totales en quinoa (Chenopodium quinoa Wild) por espectrofotometría",2006