

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MOLUSQUICIDA DE EXTRACTO DE MOJUELO DE QUINUA FRENTE A CARACOLES DE LA ESPECIE *Helix pomatia*”

Tesis presentada por las Bachilleres:

Gómez Campos, Rocío del Pilar

Velásquez Portugal, Isamar Melina

Para optar el Título Profesional de:

Ingeniera Biotecnóloga

Asesora:

Ing. Córdova Barrios Cinthia Carol

Arequipa – Perú

2021

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: GOMEZ CAMPOS, Rocio del Pilar
VELASQUEZ PORTUGAL, Isamar Melina


PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"OBTENCION DE UN BIOPESTICIDA A PARTIR DE SAPONINAS EXTRAIDAS DE MOJUELO DE QUINUA, PELOS DE CHOCLO, HOJAS DE NOPAL Y SABELA CONTRA CARACOLES DEL GENERO *Lymnaea* PORTADORES DEL PARASITO DE LA FASCIOLA HEPATICA"

DICTAMINADORES: 1) Dr. José Villanueva Salas 2) Mgter. Jaime Barreda del Carpio

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, según lo encargado, hemos procedido a revisar el Plan de Tesis titulado: "EVALUACION DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS EXTRAIDAS DE *Chenopodium quinoa* SOBRE VECTORES DEL GENERO *Lymnaea* PORTADORES DEL PARASITO DE LA Fasciola hepática", y habiendo sido realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMAS:   (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 05 - 06 - 2017

ASESOR: Ing. Claudia Córdova Barrios

DICTAMEN ASESORÍA:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por los recurrentes, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: "EVALUACION DE LA ACTIVIDAD MOLUSQUICIDA DE EXTRACTO DE MOJUELO DE QUINUA FRENTE A CARACOLES DE LA ESPECIE *Helix pomatia*", considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

FIRMA  FECHA 14 - 09 - 2020

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. José Villanueva Salas 3) Dr. Freddy Molina Rodríguez
2) Mag. Jaime Barreda del Carpio

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por las recurrentes, y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA  (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 24 - 11 - 2020

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA HORA LOCAL

FIRMA DEL DECANO FECHA

Dedicatoria

Quiero dedicar esta tesis a mi madre, Livia Campos Flores, por darme su amor, paciencia y apoyo en cada momento; por forjar en mí, valores y principios para ser la persona que en la actualidad soy; por ser mi motivación más grande y mi fortaleza más profunda frente a las adversidades. Eres mi ejemplo de persona a seguir por tu lucha inagotable en el camino de la vida, por tu perseverancia y por tu buen corazón.

Este logro es tuyo también, porque tú mejor que nadie conoce el esfuerzo y sacrificio que ha significado para las dos la culminación de mis estudios de pregrado y la realización de este trabajo.

Gracias a Dios por la inmensa fortuna de permitirme tenerte como mamá, no lo hubiera logrado sin ti. Gracias por estar siempre ahí para mí. Desde el fondo de mi alma, TE AMO MAMÁ.

Pily

Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento:

Primero a Dios, por ser mi luz, mi guía, por estar siempre conmigo, por bendecirme con todo lo que tengo y por haber puesto en mi camino a cada una de las personas que hoy en día me rodean, de cada uno de ellos aprendo y me llevo lo mejor.

A mi madre por ser lo más sagrado que tengo, por confiar en mí, escucharme y aconsejarme siempre y por su esfuerzo, ya que sin ello mis estudios no hubiesen sido posible.

A mi hermano, Alejandro Campos, por su ser, su esencia, su cariño y quién sin saberlo, influye positivamente en mí y me impulsa a salir a delante. Te quiero.

A Andrés Chávez, por darme ánimo desde el primer momento, por ser una persona con quien puedo contar siempre, sin darme negativas y por compartir su tiempo para la realización de este trabajo. Gracias por tanto.

A Isamar Velásquez, mi compañera de tesis y más aún, una de mis mejores amigas, gracias por permitirme trabajar contigo durante este tiempo para lograr obtener este triunfo, Dios te bendiga y llegues a alcanzar todas tus metas.

A Mayron Candia y Juan Ramírez por la orientación, paciencia y ayuda con su conocimiento, que me permitieron comprender mejor el tema.

A mis amigas Andrea Delgado, Milagros Pinto y Liduvina Rebollo por su valiosa amistad y sobre todo por ser como mis hermanas, por los buenos y no tan buenos momentos que hemos compartido juntas. La vida nos enseña día a día tantas cosas, en lo profesional como en lo personal.

A mis maestros de la Universidad Católica de Santa María que me enseñaron tanto de la carrera y constituyeron el cimiento de mi vida profesional.

En general a todos los que me conocen, gracias infinitas.

Pily

Dedicatoria

Quisiera dedicar este trabajo a la persona más especial de mi vida: mi madre, Brenda Velásquez Portugal. En todo este tiempo a tu lado, sin excepción, me has enseñado tal vez una de las lecciones más importantes: la vida es una vía llena de obstáculos y pruebas: si te caes o tropiezas es para levantarte; si te levantas es para avanzar. Gracias por estar siempre a mi lado: en cada paso, en cada esfuerzo, en cada momento, en cada sonrisa, en cada llanto. Gracias por forjar la mujer que hoy en día soy y, sobre todo, gracias por darme una familia que amo demasiado, sin dudas. Este esfuerzo es de ambas y, especialmente, tuyo, todo tuyo.

Mi corazón sonrío hoy por darte este regalo. Dios, en su infinito amor, sabe cuán fundamental eres en mi vida. Siempre estaré dispuesta a todo por ti. Te amo, mamá.

Isamar

Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento:

Primero a Dios, por todo, por haberme dado una familia llena de amor incondicional. Gracias por permanecer junto a mí en este camino difícil pero hermoso que es la vida. Tu presencia y amor hacen llevadero mi recorrido, además de ponerme a personas maravillosas que sostienen cada paso que doy.

A mi padre, Jimmy Mendoza Ojeda, gracias a ti tengo un hogar, gracias a ti soy una mujer excelente, gracias por darme tu cariño sin que yo lo pida. Siempre, papá Jimmy, estaré agradecida por haberme dado esta familia, unas hermanas que amo inmensamente y sin límites. Eres el motor que impulsa mis deseos de superación.

A mis hermanas Pierina y Marina, por darme una vida llena de alegría. Son las personas más influyentes en mi día a día. Espero ser un ejemplo para ambas y que ayudarlas a ser mejores. A mi abuelo José Antonio Velasquez Flores, mi segundo papá. Te agradezco por recordarme siempre que debo ser la mejor. El orgullo que muestras hacia mí fue un impulso inconmensurable para culminar este trabajo.

A mi familia, familia VELÁSQUEZ y familia MENDOZA. Hoy puedo decir que soy la persona más afortunada por tenerlos. Dios no escatimó en llenarlas de virtudes que han influido de manera adecuada en mí. Los amo con ferviente devoción. Todos estuvieron presentes en cada lección aprendida.

A Pilar Gómez, mi compañera de tesis y una gran amiga. Gracias por acompañarme y siempre empujarme a la culminación del trabajo. Eres una mujer extraordinaria. Te deseo lo mejor en tu vida profesional. Lo mereces. A Mayron Candia y Juan Ramírez, por la paciencia, ayuda y amabilidad que aportaron en este trabajo. Sus conocimientos fueron de gran ayuda.

A mis amigos Françoise, Andrés y Yessenia. Gracias por estar en los momentos más difíciles de mi vida y por siempre impulsarme a ser una mejor persona. Los quiero. Finalmente, agradezco a mis maestros por ayudarme a conquistar lo único que falta en mi vida: mi espacio profesional. Gracias por educarme con ética, empatía y sentido de responsabilidad y respeto.

Isamar

RESUMEN

La importancia de controlar, adecuadamente, pestes agrícolas como ciertas especies de caracoles, que incluso forman parte del ciclo de vida de otros organismos que son parásitos y pueden tener repercusión considerable sobre la salud de animales domésticos y seres humanos; trae la necesidad de desarrollar pesticidas que además no sean tóxicos para otros organismos y plantas. Por lo que el presente estudio tiene el objetivo de elaborar un biomolusquicida a partir de extractos de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y blanca y evaluar su actividad molusquicida frente a *Helix Pomatia Linnaeus*.

El método usado para la obtención de los extractos de mojuelo de *Chenopodium quinoa* fue por percolación, donde se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 7.31% para la *Chenopodium quinoa* roja, y 6.83% para la *Chenopodium quinoa* blanca. Luego se identificó la presencia de saponinas por cromatografía en capa fina de sílica gel en los extractos antes mencionados, donde se usó para la fase móvil cloroformo:metanol (9:1) y el revelador vainillina-ácido sulfúrico, obteniendo una placa con manchas de color marrón, azul violeta y amarillo-marrón las cuales indican la presencia de saponinas en los extractos de *Chenopodium quinoa* y en el ácido oleanólico. Posteriormente se determinó el contenido de saponinas en los extractos mediante espectrofotometría UV/VIS, se hizo reaccionar el estándar de saponinas con el reactivo de Liebermann-Burchard obteniendo una longitud de onda máxima de absorción de 530 nm, después se procedió a elaborar la curva de calibración obteniéndose un valor

de $R^2 = 0.9968$, a partir de esto se cuantificó la cantidad de saponinas presentes en los extractos hidroalcohólicos del mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y blanca, dando valores de 4.64 mg/L y 4.51 mg/L de saponinas en *Chenopodium quinoa* roja y blanca, respectivamente.

Para la evaluación de la actividad molusquicida se realizaron los biomolusquicidas que contenían 0.5; 1.0; 2.0 y 5.0 % de extracto de mojuelos de *Chenopodium quinoa* roja o blanca, notándose que 5% de extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja produce muerte del 100% de caracoles en el cuarto día, mientras que el extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* blanca, el séptimo día recién produce la misma mortalidad, deduciendo que ambas variedades de *Chenopodium quinoa* producen una actividad molusquicida frente a *Helix Pomatia* Linnaeus.

Para la determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀), se experimentó con 5 caracoles en cada ecosistema artificial, se realizaron 3 repeticiones y los datos obtenidos fueron llevados a un software para su comparación, en donde la DL₅₀ de ambos extractos está en el rango de 3.38% y 0.65% para el extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y; en el rango de 5.25% y 0.65% para la *Chenopodium quinoa* blanca, siendo la actividad molusquicida dependiente de la concentración y tiempo de exposición de los caracoles en los extractos de mojuelo de *Chenopodium quinoa*.

Con esto se concluye que el residuo de *Chenopodium quinoa* es una fuente considerable de saponinas que presentan actividad molusquicida contra población de caracoles que puedan perjudicar la salud de animales y el ser humano.

Palabras clave: Mojuelo de *Chenopodium quinoa*, saponinas, *Helix Pomatia Linnaeus*, biomolusquicida, ácido oleanólico, extracción, cuantificación, dosis letal 50 (DL 50).

ABSTRACT

The importance of adequately controlling agricultural pests such as certain species of snails, which are even part of the life cycle of other organisms that are parasites and can have a considerable impact on the health of domestic animals and humans; It brings the need to develop pesticides that are also not toxic to other organisms and plants. Therefore, the present study aims to develop a bio-molluscicide from red and white quinoa extracts and evaluate its molluscicidal activity against *Helix Pomatia* Linnaeus.

The method used to obtain the quinoa mojuelo extracts was percolation, where a yield percentage of 7.31% was obtained for red quinoa, and 6.83% for white quinoa. Then the presence of saponins was identified by thin layer chromatography of silica gel in the aforementioned extracts, where were used for the mobile phase chloroform: methanol (9: 1) and the developer vanillin-sulfuric acid, obtaining a plate with spots of brown, blue violet and yellow-brown color which indicate the presence of saponins in the quinoa extracts and in the saponin standard. After the content of saponins in the extracts was determined by UV / VIS spectrophotometry, the standard of saponins was reacted with the Liebermann-Burchard reagent obtaining a maximum absorption wavelength of 530 nm, then the curve was developed calibration obtaining a value of $R^2 = 0.9968$, from this the quantity of saponins present in the hydroalcoholic extracts

of the mojuelo of red and white quinoa was quantified, giving values of 4.64 mg/L and 4.51 mg/L of saponins in quinoa red and white, respectively.

For the evaluation of molluscicidal activity, were made biomolluscicides containing 0.5; 1.0; 2.0 and 5.0% mojuelos extract of red or white quinoa, noting that 5% of extract of red quinoa mojuelo causes death of 100% of snails on the fourth day, while the extract of mojuelo white quinoa, on the seventh day recently produces the same mortality, deducing that both varieties of quinoa produce a molluscicidal activity against *Helix Pomatia* Linnaeus.

The determination of the Lethal Dose 50 (LD50), 5 snails were experimented in each artificial ecosystem, 3 repetitions were performed and the data obtained were taken to a software for comparison where the LD50 of both extracts is in the range 3.38% and 0.65% for red quinoa extract and 5.25% and 0.65% for white quinoa, being the molluscicidal activity dependent on the concentration and time of exposure of snails to quinoa extractsa mojuelo extracts.

With this it is concluded that the quinoa residue is a considerable source of saponins that present molluscicidal activity against snail populations that may harm the health of animals and being human.

Keywords: Mojuelo *Chenopodium quinoa*, saponins, *Helix Pomatia* Linnaeus, bio-molluscicide, acid oleanolic, extraction, quantification, lethal dose 50 (DL 50).

INTRODUCCIÓN

Los caracoles son una de las mayores plagas agrícolas en el mundo, debido a que estos se reproducen fácilmente y en gran número, se alimentan prácticamente de cualquier materia orgánica (por ejemplo, cultivos utilizados por el ser humano) y presentan una buena adaptabilidad a diversos habitats¹. Así se tiene, el género *Helix* Linnaeus, al cual pertenece la especie *Helix pomatia* Linnaeus que se encuentra ampliamente distribuida alrededor del mundo², pudiéndose convertir en un potencial problema agrícola, si no se controla su población.

Para el control de la población de estos caracoles, los molusquicidas químicos sintéticos son los más utilizados (por ejemplo, metaldehído, carbamatos, niclosamida, organofosforados, etc.); sin embargo, estos son extremadamente tóxicos para otros organismos (peces, crustáceos, algas, etc.) y para el medio ambiente³.

En los últimos tiempos, el uso de productos naturales ha ganado gran importancia en todo el mundo. Un gran número de familias de plantas han suministrado muchas clases de productos, que pueden variar en el grado de actividad molusquicida. Varios países han promovido el uso de productos vegetales debido a su amplia gama de propiedades ideales, tales como alta toxicidad dirigida a los caracoles, baja toxicidad para otros animales, bajo costo, solubilidad en el agua, fácil biodegradación, abundante crecimiento en áreas endémicas y seguridad para el operador⁴.

Asimismo, las saponinas son una clase de compuestos naturales, que se encuentran abundantemente en más de 100 familias de plantas. Uno de los efectos que se atribuyen a las saponinas es su actividad molusquicida. Existen muchas especies vegetales que presentan un alto contenido de saponinas como por ejemplo el mojuelo de la *Chenopodium quinoa* Willd (quinua)⁵.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar la actividad molusquicida de los extractos de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y blanca, contra la especie *Helix Pomatia* Linnaeus, en condiciones de laboratorio.

ÍNDICE

RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	x
HIPÓTESIS	xiv
OBJETIVOS	xv
CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.....	1
1.2. Saponinas.....	4
1.3. Caracoles.....	17
1.4. Molusquicidas.....	22
CAPÍTULO II	24
2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1. Materiales.....	24
2.2. Reactivos.....	26
2.3. Equipos	26
2.4. Métodos	26
CAPÍTULO III	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
3.1. Obtención de los extractos del mojuelo de la <i>Chenopodium quinoa</i>	34
3.2. Determinación de saponinas	36
3.3. Evaluación de la actividad molusquicida de los extractos de mojuelo de <i>Chenopodium quinoa</i>	41
CONCLUSIONES	47
SUGERENCIAS	48
REFERENCIA	49
ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulaciones del biopesticida	32
Tabla 2. Rendimiento de extracción del mojuelo la <i>Chenopodium quinoa</i> blanca y roja	35
Tabla 3. Valores de Rf de las principales manchas visibles en la placa cromatográfica para la detección de saponinas.....	37
Tabla 4. Contenido de saponinas en los extractos hidroalcohólicos del mojuelo de la <i>Chenopodium quinoa</i> roja y blanca	40
Tabla 5. Promedio de mortalidad del biomolusquida a base de extracto de mojuelo de <i>Chenopodium quinoa</i> roja.....	41
Tabla 6. Porcentaje de mortalidad del biomolusquida a base de extracto de mojuelo de <i>Chenopodium quinoa</i> roja	42
Tabla 7. Promedio de mortalidad del biomolusquida a base de extracto de mojuelo de <i>Chenopodium quinoa</i> BLANCA.....	42
Tabla 8. Porcentaje de mortalidad del biomolusquida a base de extracto de mojuelo de <i>Chenopodium quinoa</i> blanca	42
Tabla 9. Concentración de extracto de mojuelo de <i>Chenopodium quinoa</i> que produce la muerte del 50% de <i>Helix pomatia</i> Linnaeus.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Planta de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.....	3
Fig. 2. Ejemplos de saponinas con diferentes estructuras a) Ácido oleanólico -Genina triterpénica b) Shatavarina IV - Saponina con genina esteroídica c) Solanina - Saponina con genina alcaloide esteroideo.....	6
Fig. 3. Partes del caracol terrestre.	18
Fig. 4. Caracol <i>Helix Pomatia</i> Linnaeus	21
Fig. 5. Mojuelo de la <i>Chenopodium quinoa</i> roja.	24
Fig. 6. Caracol de la especie <i>Helix Pomatia</i> Linnaeus	25
Fig. 7. Tamizado del mojuelo de la <i>Chenopodium quinoa</i>	27
Fig. 8. Obtención del extracto del mojuelo de la <i>Chenopodium quinoa</i> por el método de percolación.....	28
Fig. 9. Cálculo de los valores de Rf.....	29
Fig. 10. Ecosistemas artificiales para los caracoles.	32
Fig. 11. Extracto obtenido del mojuelo de la <i>Chenopodium quinoa</i> . a) Después de la percolación, b) Después de la eliminación del solvente.	34
Fig. 12. Placa cromatográfica del extracto hidroalcohólico del mojuelo de la quinua roja (QR), del mojuelo de la <i>Chenopodium quinoa</i> blanca (QB) y del estándar de saponina (ST), después de la aplicación del revelador y observado en luz visible.	36
Fig. 13. Saponinas con geninas triterpénicas presentes en la <i>Chenopodium quinoa</i> , a) ácido oleanólico, b) hederagenina, c) gipsogenina, d) ácido espergulagénico, e) ácido serjanico y f) ácido fitolacagénico	38
Fig. 14 Espectro de absorción UV/VIS del estándar de saponina (ácido oleanólico).....	39
Fig. 15 Curva de calibración para la cuantificación de saponinas por espectrofotometría UV/VIS.	40
Fig. 16. Mortalidad del biomolusquicida con diferentes concentraciones de extracto de mojuelo de <i>Chenopodium quinoa</i> roja (0.5; 1.0; 2.0 y 5.0) %. Tratamiento durante 7 días.....	44
Fig. 17. Mortalidad del biomolusquicida con diferentes concentraciones de extracto de mojuelo de <i>Chenopodium quinoa</i> blanca (0.5; 1.0; 2.0 y 5.0) %. Tratamiento durante 7 días.....	44
Fig. 18. Dosis letal-50 del biomolusquicida para cada día evaluado.	46

HIPÓTESIS

Dado que existe una escasa disponibilidad de pesticidas biológicos y la falta de aprovechamiento del residuo orgánico de *Chenopodium quinoa* Willd con presencia de saponinas, es probable que las propiedades de sus saponinas puedan ser aprovechadas para la formulación de un biopesticida contra los caracoles de la especie *Helix Pomatia* Linnaeus.

OBJETIVOS

1. Obtener los extractos del mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y blanca mediante el método de percolación.
2. Determinar la presencia de saponinas en los extractos del mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y blanca, cualitativamente mediante cromatografía en capa fina (TLC) y cuantitativamente mediante espectrofotometría UV/VIS.
3. Evaluar la actividad molusquicida de los extractos de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y blanca, sobre el caracol *Helix Pomatia* Linnaeus en un ecosistema artificial, mediante el cálculo de la DL₅₀

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Chenopodium quinoa* Willd.

1.1.1. Clasificación taxonómica

La planta estudiada en el presente trabajo, de acuerdo al Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS), presenta la siguiente clasificación taxonómica⁶:

- Reino: *Plantae*
- Subreino: *Viridiplantae*
- Superdivisión: *Embryophyta*
- División: *Tracheophyta*
- Subdivisión: *Spermatophytina*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Superorden: *Caryophyllanae*
- Orden: *Caryophyllales*
- Familia: *Amaranthaceae*
- Género: *Chenopodium L.*
- Especie: *Chenopodium quinoa* Willd.

1.1.2. Sinonimia

1.1.2.1. Sinonimia Científica

Chenopodium album subsp. *quinoa* (Willd.) Kuntze, *Chenopodium album* var. *quinoa* (Willd.) Kuntze, *Chenopodium album* f. *subspontaneum* Kuntze, *Chenopodium hircinum* f. *rubescens* (Moq.) Aellen⁷.

1.1.2.2. Sinonimia Vulgar

Quinoa, Ayara, Kiuna, Kuchikinwa, Achita, Kinua, Kinoa, Chisaya Mama (Quechua)⁷.

1.1.3. Origen y agroecología

Chenopodium quinoa se originó en la región andina de América del Sur (Bolivia, Perú, Ecuador, Norte de Chile y Colombia), siendo uno de los cultivos más antiguos del continente americano. Asimismo, se han encontrado hallazgos arqueológicos en Ayacucho/Perú, donde existe evidencia que la *Chenopodium quinoa* fue cultivada 5000 a.C.⁸.

Este cultivo presenta condiciones óptimas de crecimiento de -3°C por la noche a 30°C durante el día, y con precipitaciones anuales de 1.500 mm a más de 2.500 mm. Su área de cultivo tradicional es desde una latitud de 8°N hasta 30°S. Puede ser cultivada desde el nivel del mar hasta 3.800 m de altitud. Además, la *Chenopodium quinoa* prefiere un suelo semi-profundo, bien drenado y arenoso, pero también crece en suelos arcillosos. Crece a un rango de pH de 4,5 a 8. Igualmente, esta planta muestra tolerancia a la helada, la salinidad y la sequía, y tiene la capacidad de crecer en suelos de baja fertilidad⁷.

1.1.4. Descripción botánica

Chenopodium quinoa es una planta herbácea anual, que crece 0,20-3,00 m de altura, con el tallo angular, acanalado con rayas longitudinales verdes o rojas. La raíz puede alcanzar profundidades de hasta 0,30 m. Las hojas tienen forma de pie de ganso y están formadas por pecíolos y lámina; los pecíolos son largos y canalizados en su lado superior; la lámina es polimorfa en la misma planta: romboidal o triangular en la lámina de las hojas inferiores y triangular o lanceolada en las hojas superiores. La inflorescencia es una panícula, llena de racimos de flores en glomérulos, rojizos, purpurinos a dorados. Las flores son bisexuales, regulares, pequeñas, sésiles, pentámeras y no tienen pétalos. El fruto es un aquenio, protegido por un perigonio, que es del mismo color que la planta: blanco, amarillo, gris, marrón claro, rosa, negro o rojo, de paredes delgadas y de una sola semilla. Las semillas son de 1,0-2,6 mm, lenticulares, lisas, blancas, amarillas, rojas, púrpuras, marrones o negras (dependiendo de la variedad), con fina testa coriácea y endospermas^{7,8}. En la **Fig. 1** se observa la ilustración de *Chenopodium quinoa* Willd. con sus atributos botánicos característicos.



Fig. 1 Planta de *Chenopodium quinoa* Willd⁸.

1.1.5. Descripción fitoquímica

Se ha encontrado que la *Chenopodium quinoa* Willd, presenta los siguientes nutrientes esenciales: vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales. Además, se han identificado diversos componentes bioactivos en esta planta, tales como saponinas, compuestos fenólicos, fitoesteroles, fitoecdisteroides, alcaloides y péptidos bioactivos⁹.

Varias saponinas triterpénicas han sido reportadas en la *Chenopodium quinoa*. Se han encontrado tanto monodesmósidos como bidesmósidos, con sapogeninas como el ácido oleanólico, hederagenina, ácido fitolacagénico y ácido serjánico¹⁰. Las saponinas triterpénicas están presentes en todas las partes de la planta de *Chenopodium quinoa* como las hojas, flores, frutos y semillas¹¹. La concentración de las saponinas en esta planta varía de 0.01% a 4.65% de materia seca, esto depende de su genotipo y su exposición a diversas condiciones ambientales¹².

En el proceso de beneficiado de la *Chenopodium quinoa*, una de las operaciones para su desaponificación es el escarificado (separación de la cascarilla del grano por fricción), en el que se elimina un residuo denominado “mojuelo”, el cual posee un alto contenido de saponinas¹³. Entre las saponinas de la cascarilla del

grano de la *Chenopodium quinoa* se han encontrado a: ácido oleanólico, glucopiranosil éster de hederagenina, chikusetsusaponina IVa y quinoasaponinas⁷.

1.1.6. Usos y propiedades

Las hojas, tallos y grano de la *Chenopodium quinoa* han sido utilizados en la medicina tradicional como cicatrizantes, analgésicos, desinfectantes del tracto urinario, antiinflamatorios y repelentes de insectos. Asimismo, se ha comprobado que esta planta presenta diversas propiedades farmacológicas como: antioxidante, citotóxica, antilipídica, inmunoadyuvante, antihelmíntica, anticancerígena y hemolítica⁷.

Las saponinas de la *Chenopodium quinoa*, debido a sus cualidades químicas, tienen múltiples propósitos. Estas han sido utilizadas en la fabricación de jabones, detergentes líquidos, champús, pasta de dientes, removedores de manchas y estabilizadores de espuma; en bebidas, especialmente en la cerveza; como un insecticida; en un compuesto como extinguidor de fuego y en el procesamiento de fotos⁸.

1.2. Saponinas

1.2.1. Definición

La palabra saponina deriva de “soap”, debido a las propiedades similares del jabón.¹⁴ Estos compuestos son metabolitos secundarios (diversos grupos de moléculas que están involucrados en la adaptación de las plantas a su ambiente, pero no son parte de las principales vías bioquímicas de crecimiento celular y reproducción)¹⁵, glicosilados¹⁶ y anfifílicas¹⁷.

1.2.2. Localización

Las saponinas se pueden encontrar en un gran número de plantas, las cuales pertenecen aproximadamente a 100 familias. Se producen predominantemente en

las angiospermas, pero también pueden ser encontradas en algunas plantas inferiores, tales como helechos y algas, así como en ciertos invertebrados marinos. Se pueden localizar en las raíces, brotes, flores y semillas de las plantas¹⁸. Las saponinas pueden almacenarse en las células vegetales como precursores inactivos, que por los sistemas enzimáticos de la planta pueden ser activados como mecanismo de defensa¹⁹.

1.2.3. Función

Diversas plantas sintetizan metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, como parte de su naturaleza, o como mecanismo de defensa frente al ataque de patógenos o estrés²⁰. Las saponinas sintetizadas pueden proteger a la planta contra el ataque de hongos patógenos^{14,19,20} o la depredación realizada por insectos y animales^{17,21}.

1.2.4. Estructura

Las saponinas son heterósidos (glicósidos); por lo tanto, están compuestas por una parte azúcar (monosacárido, oligosacárido) y una parte no azúcar (aglicona o genina). Químicamente hablando, los heterósidos son acetales, donde un grupo hidroxilo de la parte azúcar se condensa con un grupo hidroxilo de la genina²².

Las saponinas forman un grupo muy diverso de compuestos con tres tipos básicos de esqueletos de aglicona (sapogeninas), los cuales son: triterpenoide, esteroide o alcaloide esteroideo (**Fig. 2**)^{18,23}.

La parte azúcar de las saponinas pueden variar en el número de cadenas; dándose el caso de, una cadena (monodesmósidos), dos cadenas (bidesmósidos), o incluso tres cadenas (tridesmósidos) (del griego desmos = cadena). Además, la composición de la cadena de azúcar (pentosas, hexosas, desoxihexosas, y ácidos urónicos) y su forma (lineal, ramificada) puede aumentar aún más la diversidad

estructural. Algunas estructuras de saponina pueden ser aciladas o acetiladas con diferentes grupos químicos^{15,18}.

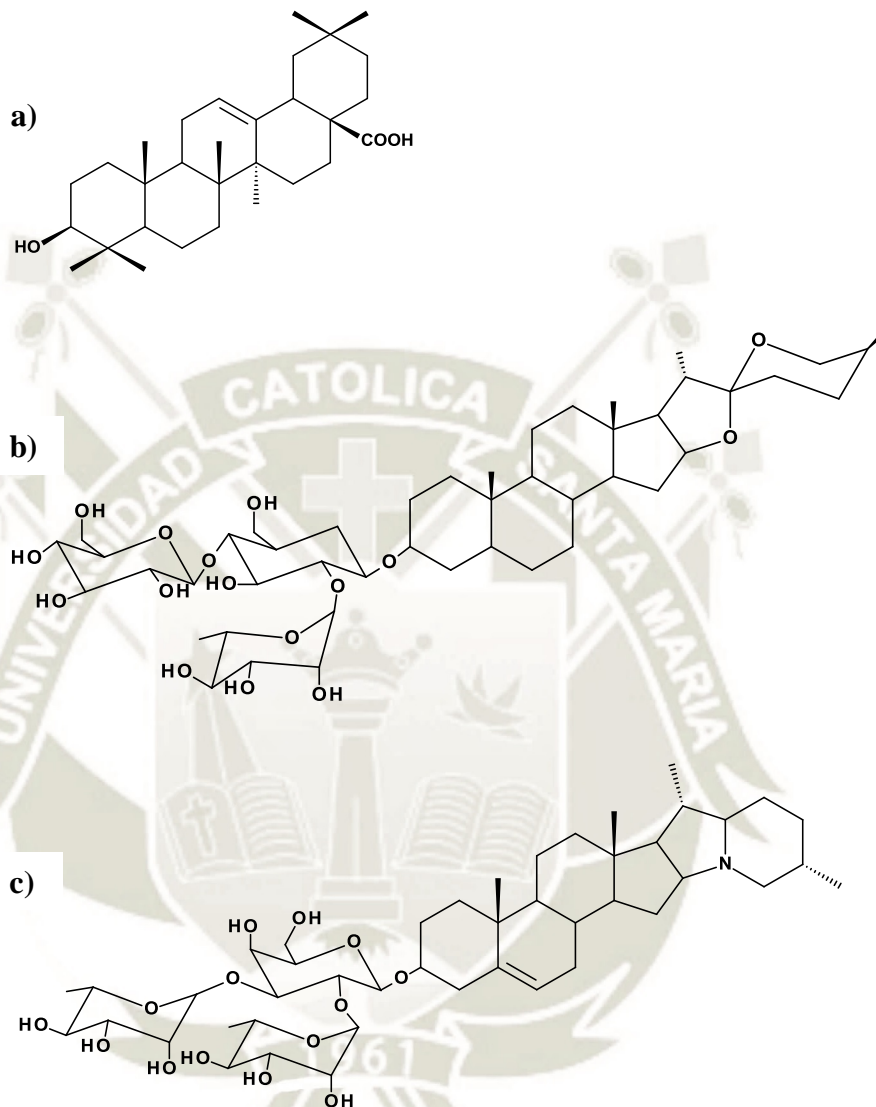


Fig. 2 Ejemplos de saponinas con diferentes estructuras a) Ácido oleanólico²⁴ - Genina triterpénica b) Shatavarina IV²⁵ - Saponina con genina esteroídica
c) Solanina²⁶ - Saponina con genina alcaloide esteroideo.

1.2.5. Extracción

La extracción es un proceso para separar un determinado componente de una matriz. Este proceso es un paso fundamental en la recuperación y purificación de compuestos bioactivos (solutos) de materiales vegetales. En general, las técnicas

empleadas para la extracción de saponinas pueden ser clasificadas en dos categorías, las convencionales y las tecnologías verdes²⁷.

La extracción convencional se basa en la solubilidad del soluto de la planta en el disolvente. Por lo tanto, a menudo se utiliza una gran cantidad de disolvente para extraer el soluto, a pesar de que a veces es asistida con calentamiento y agitación. Estas técnicas convencionales son²⁸:

1.2.5.1. Maceración

La extracción por maceración es una extracción sólido-líquido, donde el compuesto de interés es extraído por remojo del material vegetal en un solvente específico durante un determinado periodo de tiempo. Este proceso depende de dos factores principales, la solubilidad y la difusión efectiva. El agua, alcoholes (metanol y etanol) y mezclas entre ellos son los disolventes de extracción utilizados para extraer saponinas. El tiempo de extracción empleado por esta técnica es prolongado y puede tardar hasta semanas, por lo que a menudo se utiliza un sistema de agitación mecánica²⁸.

1.2.5.2. Percolación

El método de percolación es también una técnica convencional frecuentemente utilizado para la extracción de diversos metabolitos secundarios, en el que se utiliza un percolador; éste instrumento es un recipiente con una abertura superior ancha (forma de cono), por donde se agrega y se elimina el material vegetal; presenta también una válvula en la parte inferior, para regular el flujo del solvente extractor²⁹.

El procedimiento de la extracción mediante percolación consiste en la adición del material vegetal en el percolador, posteriormente se agrega el solvente hasta cubrir la planta, se deja macerar por unas cuantas horas y finalmente se deja fluir el solvente a una determinada velocidad de flujo³⁰. Además, Phrompittayarat *et al.*, compararon diferentes métodos de extracción

de saponinas, en el que la percolación con etanol, mostró una mayor extracción de saponinas totales³¹.

1.2.5.3. Soxhlet

Esta técnica de extracción emplea el proceso de destilación, el cual consiste en el calentamiento del disolvente a ebullición y el retorno de los vapores condensados al matraz original³². Las desventajas de esta técnica son el calentamiento y tiempo de extracción. El etanol es el disolvente más utilizado para esta técnica de extracción. Se han reportado diferentes estudios, en los cuales el tiempo de extracción por soxhlet varió de 24 a 72 horas²⁸.

Además, existen numerosos estudios llevados a cabo sobre extracción de saponinas usando este método de extracción. Mediante reflujo, la extracción por reflujo es realizada primero para remover los lípidos del material vegetal usando como disolvente al cloroformo y al hexano³³.

Por otro lado, las técnicas de extracción mediante tecnologías verdes involucran el uso de compuestos químicos de forma más segura, eficiencia energética, uso de materias primas renovables y prevención de la contaminación. Debido a esto, el agua es usada como solvente de extracción por la manipulación de la presión y la temperatura del sistema de extracción. Las tecnologías verdes de extracción son²⁸:

1.2.5.4. Sonicación

La extracción de compuestos bioactivos por medio de ultrasonidos provoca efectos mecánicos de cavitación acústica (formación, crecimiento y colapso implosivo de las burbujas formadas en líquidos irradiados con ultrasonidos de alta intensidad), lo cual mejora la penetración del solvente dentro del material vegetal y la liberación de los productos intracelulares por disrupción de las paredes celulares.

Las ventajas de este método son: el tiempo de procesamiento reducido, el bajo consumo de solventes y la extracción se puede realizar a bajas temperaturas. Por consiguiente, existen diversas investigaciones de la extracción de saponinas utilizando esta técnica^{34,35}.

1.2.5.5. Microondas

Las microondas son ondas electromagnéticas no ionizantes con un rango de frecuencia de 0.3 a 300 GHz. Las microondas son capaces de penetrar en el material vegetal y generar calor mediante la interacción con moléculas polares, tales como el agua presente en el interior de estos materiales. El agua contenida en el material vegetal permite la absorción de la energía de microondas, la cual provoca un sobrecalentamiento interno y una disrupción de la estructura celular, y consecuentemente, facilita la difusión del compuesto bioactivo desde la matriz de la planta. Las ventajas de esta técnica son: una corta duración de la extracción, un uso de disolventes mínimo y un alto rendimiento³⁶. Esta técnica ha sido aplicada para la extracción de saponinas³⁷.

1.2.5.6. Extracción acelerada con disolventes

Es una técnica de extracción rápida y automatizada, que usa la mínima cantidad de disolvente a temperatura y presión elevadas. El aumento de la temperatura mejora la solubilidad y la transferencia de masa, y la presión elevada mantiene al disolvente por debajo de su punto de ebullición, permitiendo una extracción rápida, segura y eficiente. El proceso de extracción es completado usualmente en 15-25 minutos usando solo 15-45 mL de disolvente²⁸. Esta técnica recién está siendo utilizada para la extracción de saponinas³⁸.

1.2.5.7. Extracción en fase sólida

En esta técnica el material de soporte utilizado es un sólido, a través del cual pasa un líquido o un gas. Los compuestos bioactivos son absorbidos en el

soporte (fase estacionaria), seguidamente estos compuestos son eluidos de acuerdo a la afinidad que presenten con la fase estacionaria o con la fase móvil. Esta técnica permite la extracción y purificación de las saponinas, para lo cual se usa distintos materiales absorbentes (C18, C8, resinas XAD, etc.). El extracto es cargado sobre el material de soporte, luego se da una primera lavada con agua, para eliminar a los polisacáridos. En la siguiente etapa, el material de soporte es lavado con una proporción adecuada de alcohol:agua, la cual permita una buena purificación de las fracciones de saponina¹⁸.

Algunas saponinas pueden ser sensibles a distintos parámetros de extracción (calor, pH y la presencia de metanol). El calor puede degradar grupos acilo muy sensibles, mientras que el pH puede influir tanto en los grupos acilo y la parte azúcar. El uso de metanol como disolvente usualmente conduce a la formación de derivados de $-OCH_3$ y lactonas, los cuales han sido identificados en plantas, pero son producto del proceso de extracción. Debido a esto, se recomienda una extracción en frío, por medio de un proceso de sonicación con etanol-agua¹⁸.

La extracción de saponinas en caliente utilizando una mezcla agua-alcohol, seguido de una evaporación a sequedad, continuando con una disolución en agua y finalmente una extracción liquido-liquido con n-butanol³⁹; presenta algunas desventajas, tales como: la evaporación de la solución acuosa que contiene saponinas es un proceso complicado, debido a la formación de espuma; además, la extracción liquido-liquido con n-butanol permite una cierta purificación de saponinas con respecto a compuestos altamente polares (principalmente polisacáridos), pero el extracto resultante puede presentar muchos interferentes. Asimismo, la extracción con n-butanol puede ser incompleta; ya que algunas saponinas altamente polares (bidesmósidos y tridesmósidos), que contienen 7-8 componentes de azúcar, difícilmente pasan a la fase n-butanol¹⁸.

1.2.6. Determinación

La determinación (cualitativa y cuantitativa) de las saponinas se puede llevar a cabo por diversas técnicas, las cuales son descritas a continuación:

1.2.6.1. Espectrofotométrica

La porción del espectro electromagnético, denominada UV/Visible (UV 185-400nm y Visible 400-700nm), generalmente rinde poca información de la estructura del analito, pero es muy útil para las determinaciones cuantitativas del mismo. La concentración de un analito en solución puede determinarse midiéndose la absorbancia a determinada longitud de onda y aplicando la ley de Lambert-Beer⁴⁰.

Esta técnica se ha convertido en un método popular en la cuantificación de saponinas de materiales vegetales, debido a su simplicidad, rapidez y su bajo costo. El ensayo de vainillina-ácido sulfúrico, es el método espectrofotométrico comúnmente utilizado para la determinación de saponinas totales en materiales vegetales. El principio básico de este método es la oxidación de las saponinas por el ácido sulfúrico, una vez dada la oxidación, estas reaccionan con la vainillina, normalmente este ensayo se mide a una longitud de onda máxima (λ_{\max}) de 544 nm²⁸. Asimismo, la determinación de saponinas esteroidales totales, también está basada en las reacciones coloreadas con anisaldehído o vainillina, ácido sulfúrico y acetato de etilo. Este ensayo se mide a una λ_{\max} de 430 nm. La diferencia entre los ensayos para la determinación de las saponinas totales y las saponinas esteroidales totales es el solvente utilizado en la preparación de los reactivos. Para saponinas totales, la vainillina es disuelta en etanol y el ácido sulfúrico en agua, mientras que para la saponinas esteroidales totales, tanto el anisaldehído como el ácido sulfúrico son disueltos en acetato de etilo¹⁵.

1.2.6.2. Cromatografía en Capa Fina (TLC)

La cromatografía, es el proceso mediante el cual se pueden separar los componentes de una mezcla. El principio básico de esta técnica, se basa en la

afinidad de los compuestos de interés, hacia dos fases inmiscibles. Una se llama fase estacionaria, porque está inmobilizada dentro de una columna o fijada sobre un soporte; mientras que la segunda, llamada fase móvil, es forzada a través de la primera. Las fases son seleccionadas de acuerdo a la solubilidad que presenten los compuestos de interés en cada una de ellas. La migración diferencial de los compuestos conduce a su separación⁴⁰.

En la cromatografía de capa fina. La fase estacionaria, normalmente está compuesta por sílica gel depositada sobre un soporte de aluminio. La fase móvil, son disolventes de diferentes polaridades. La fase móvil interactúa con la fase estacionaria por capilaridad, moviendo los componentes de la muestra a diferentes velocidades, lo que depende de su grado de interacción con la matriz y su solubilidad en el disolvente⁴⁰.

La cromatografía de capa fina ha sido utilizada para determinar la presencia de las saponinas. En cuanto a la fase estacionaria se utiliza placas de sílica gel. Asimismo, las fases móviles normalmente usadas son la mezcla de cloroformo-metanol-agua o butanol-ácido acético-agua para las saponinas y benceno-acetona para las sapogeninas. Los reveladores frecuentemente usados incluyen al reactivo de Carr-Price, reactivo Liebermann-Burchard, ácido fosfotúngstico, 10% ácido sulfúrico en etanol, 0.5% p-anisaldehído 1% ácido sulfúrico en ácido acético, vainillina-ácido acético⁴¹.

1.2.6.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica comúnmente usada para separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla. Esta presenta un fundamento similar al explicado en la sección anterior. En esta técnica, una muestra líquida o una muestra sólida disuelta en un disolvente adecuado, se lleva a través de una columna cromatográfica por medio de una fase móvil líquida. La separación está determinada por interacciones entre soluto/fase estacionaria, incluyendo adsorción líquido-sólido, separación

líquido-líquido, intercambio de iones y exclusión de tamaños; y por interacciones de soluto/fase móvil⁴².

El HPLC es la técnica más utilizada para la determinación de saponinas, debido a que esta puede tratar eficazmente compuestos no volátiles y polares. Está ha sido extensamente usada tanto para la determinación de sapogeninas como para saponinas intactas. Las separaciones son realizadas usualmente en columnas normales (silica gel) y de fase reversa (C₈, C₁₈). La fase móvil que es utilizada varía de acuerdo al compuesto y al tipo de columna que se utilice. Si se utiliza una columna C₁₈, usualmente la fase móvil utilizada es acetonitrilo-agua; en el caso de una columna de silica gel, la fase móvil normalmente corresponde a hexano-etanol-agua⁴¹.

El principal problema del análisis de saponinas por HPLC es la detección, dado que solo unas pocas saponinas; por ejemplo, el ácido glicirretínico y las curcubitacinas, poseen una absorción máxima en el rango UV, entonces son las únicas saponinas que pueden ser detectadas fácilmente a 254 nm. La mayoría de saponinas no presentan los cromóforos necesarios para su detección UV, por lo que estas saponinas deben ser detectadas a longitudes de onda UV más bajas en un rango de 200 - 210 nm. Se han reportado estudios que indican una adecuada sensibilidad de este modo de detección, dándose un rango de 50-300 ng, el cual depende del tipo de saponina. Sin embargo, la detección a bajas longitudes de onda, limita la selección de solventes y la gradiente que puede ser utilizada. Se ha visto que el acetonitrilo absorbe mucho menos a longitudes bajas, en comparación al metanol; la selección de gradientes de acetonitrilo-agua es el modo de elección. La alternativa para la detección a bajas longitudes de onda UV, ha sido la derivatización en pre-columna de las saponinas con el fin de que se unan a grupos cromóforos que faciliten su detección altas longitudes de onda UV (254 nm). Los cromóforos que se ha utilizado para la detección de saponinas incluyen: cumarinas, cloruro de benzoilo, bromuro de 4-bromofenacilo⁴¹.

1.2.6.4. Otros métodos

Aprovechando las propiedades de las saponinas, diversos estudios señalan la detección de éste metabolito secundario mediante las siguientes pruebas:

1.2.6.4.1. Formación de espuma

Como se observó en la definición de saponinas, éstas presentan propiedades similares a la del jabón¹⁴, por lo que en solución acuosa, se produce la formación de espuma.

La prueba de la espuma, normalmente se realiza antes de realizar la cuantificación de saponinas. El procedimiento consiste en tomar una cantidad del material vegetal y llevarlo a un tubo de ensayo, se agrega agua destilada y se agita vigorosamente durante dos minutos. La formación de espuma estable y persistente, indica la presencia de saponinas^{28,43}.

1.2.6.4.2. Hemólisis

Aprovechando también la propiedad hemolítica de las saponinas¹⁵, es posible efectuar la determinación de este grupo de compuestos mediante espectrofotometría luego de la reacción con sangre y por ende la liberación de oxihemoglobina. El procedimiento consiste en hacer reaccionar el extracto que contiene las saponinas con sangre fresca en presencia de EDTA durante 30 minutos a 30°C, posteriormente se centrifuga (3000 rpm, durante 10 minutos) la solución y se procede a determinar la absorbancia del sobrenadante a 545 nm de longitud de onda^{28,44}. Como estándar, normalmente se utiliza diosgenina¹⁵.

Sin embargo, ésta determinación podría brindar una información parcial del contenido total de saponinas en una determinada muestra, debido a que éstos metabolitos secundarios presentan diferentes niveles de actividad hemolítica, dependiendo principalmente de la estructura química que presentan⁴⁵.

1.2.7. Propiedades biológicas y farmacológicas

La presencia de ambos grupos polar (oligosacárido) y no polar (sapogenina), proporciona a las saponinas grupos con fuertes propiedades tensoactivas, que son responsables de muchos de sus efectos adversos y beneficiosos¹⁵.

El efecto biológico primario de saponinas es la interacción con los componentes celulares. Por ejemplo, las saponinas producen hemólisis de los glóbulos rojos por interacciones no específicas con proteínas de la membrana, fosfolípidos y colesterol de los eritrocitos¹⁵.

1.2.8. Aplicaciones

Las saponinas son utilizadas en un gran número de aplicaciones comerciales, debido a sus propiedades fisicoquímicas, farmacológicas y biológicas. Los sectores donde se ha aplicado a las saponinas son: alimentario, cosmético, agrícola y farmacéutico.

1.2.8.1. Sector Alimentario

Las saponinas de diversas plantas, son utilizadas como aditivos alimentarios. Debido a sus propiedades espumantes se utilizan en bebidas; además, se utilizan como emulsificantes en preparados que contienen colorantes o saborizantes lipofílicos, los cuales son añadidos a bebidas, vegetales fermentados y aderezos. Asimismo, las saponinas son utilizadas como agentes flavorizantes en alimentos como: bebidas, goma de mascar, dulces, hierbas y condimentos, productos de proteínas vegetales y suplementos dietéticos de vitaminas y minerales⁴⁶.

En los alimentos, las saponinas también son utilizadas como antimicrobianos y antifúngicos⁴⁷. Por otro lado, las propiedades fisicoquímicas de las saponinas también son utilizadas en el procesamiento de alimentos. Se ha reportado que las saponinas pueden formar complejos con el colesterol, permitiendo la remoción del colesterol de productos lácteos⁴⁸. Además, las saponinas pueden aumentar la hidrofobicidad de las grasas facilitando su

floculación; debido a esto, las saponinas han sido utilizadas en la precipitación selectiva de glóbulos de grasa en productos lácteos⁴⁹.

1.2.8.2. Sector Cosmético

Debido a sus propiedades tensoactivas, las saponinas se utilizan como surfactantes naturales en productos del cuidado personal tales como: champús, acondicionadores de cabello, lociones, jabones líquidos, pastas dentales y productos para el cuidado de los bebés⁵⁰. Además, las saponinas también se comercializan como ingredientes bioactivos en formulaciones cosméticas, donde se les atribuye propiedades de retraso del envejecimiento de la piel y prevención del acné.^{51,52} Asimismo, debido a las propiedades tensoactivas de las saponinas, estas son utilizadas como detergentes, agentes emulsionantes y espumantes⁵³.

1.2.8.3. Sector Agrícola

Existen investigaciones que reportan el uso de las saponinas como reguladores del crecimiento vegetal, ya que están relacionadas con el sistema de defensa de las plantas (actúan sobre hongos, nematodos, moluscos y patógenos); por lo tanto, son utilizadas en la formulación de biopesticidas⁵⁴. Por otro lado, se ha reportado el uso de las saponinas en la remediación de suelos, debido a que estos metabolitos secundarios son compuestos anfifílicos, los cuales pueden mejorar la solubilidad de contaminantes apolares en la fase acuosa, y su estructura molecular posee grupos hidroxilo y carboxilo, los cuales pueden formar complejos con metales pesados⁵⁵.

1.2.8.4. Sector Farmacéutico

Las saponinas como la diosgenina ha sido ampliamente utilizada como materia prima en la producción de hormonas esteroideas y fármacos⁵⁶. Las saponinas son usadas como adyuvantes inmunológicos en formulaciones de vacunas veterinarias debido a sus propiedades de mejora inmunológica; además,

se han producido avances significativos en el desarrollo de vacunas humanas (vacunas contra el cáncer, VIH y enfermedades infecciosas) que utilizan como adyuvantes a las saponinas⁵⁷.

Se han reportado investigaciones donde se estudia extractos de plantas que contienen saponinas, los cuales exhiben actividades como antitumorales, anticarcinogénicas, anticoagulantes, antiflogísticas, antidiabéticas, espermicidas, antiinflamatorias, antioxidantes, inmunomoduladoras, antihepatotóxicas, antivirales, hipoglicémicas, antigenotóxicas, neuroprotectoras, antiulcerosas, anticolesterolémicas, antiestres, antirreumatoides, antialérgicas, antimicrobianas, antiparasitarias y antifúngicas⁵⁸. Asimismo, se ha estudiado el uso de las saponinas en preparaciones farmacéuticas como adyuvantes, para potenciar la absorción de sustancias o fármacos farmacológicamente activos⁴⁶.

Las saponinas han demostrado actividad molusquicida, contra *Biomphalaria glabrata* (huésped intermedio de la esquistosomiasis intestinal), *Lymnaeidae* (huésped intermedio de la *Fasciola*) y caracoles (perjudiciales en una gran variedad de cultivos)⁵⁸.

1.3. Caracoles

Los caracoles son un tipo de moluscos gasterópodos, sus cuerpos presentan una consistencia suave y húmeda y sus conchas son duras y espiraladas. La mayoría de los órganos de un caracol están ocultos bajo su concha. La concha también protege al caracol de sus enemigos. Los caracoles que viven en la tierra presentan dos pares de tentáculos. Al final del par más largo están los ojos del caracol. Además, los caracoles de agua tienen solo un par de tentáculos y sus ojos están en la base de los tentáculos. Los tentáculos ayudan al caracol a ver, sentir, oler y saborear. Su boca se encuentra en la parte inferior de su cabeza. El resto del cuerpo de un caracol está enrollado dentro de su concha. Las conchas de los caracoles se pueden encontrar de muchos colores, formas y tamaños. La mayoría son levemente puntiagudas, pero algunas son planas. A

medida que un caracol crece, se agregan nuevas capas a su concha, por lo que la concha se hace cada vez más grande⁵⁹, como se observa en la **Fig. 3**.

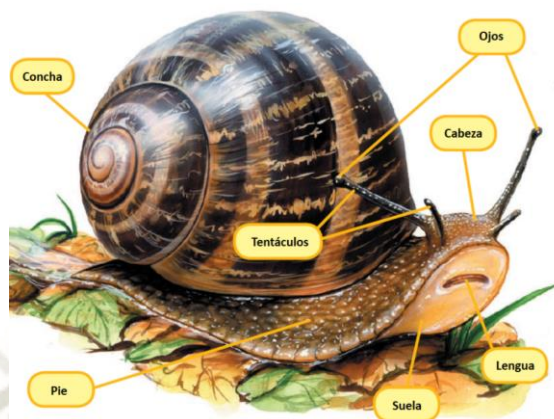


Fig. 3 Partes del caracol terrestre.⁵⁹

Por lo general, se encuentran en hábitats calientes y húmedos. Existen miles de diferentes tipos de caracoles. Algunos viven en tierra, pero la mayoría viven en el mar. Otros se encuentran en ríos, lagos y estanques. Asimismo, los caracoles se mueven muy lentamente. A medida que se arrastran, se deslizan sobre una capa lisa de moco viscoso. Esto les ayuda a moverse sobre terrenos irregulares y protege la parte inferior de sus cuerpos. Por otro lado, la mayoría de los caracoles se alimentan de plantas muertas, hongos y algas; a otros les gusta comer hojas jugosas, frutas y flores, pudiendo ser plagas para estas plantas; y algunos se alimentan de otros animales e incluso pueden atacar caracoles más pequeños. Los caracoles tienen una lengua especial llamada rádula. La cual está cubierta con miles de dientes pequeños y afilados que le sirven para raspar su comida, casi como un rallador de queso⁵⁹.

Los caracoles generalmente se aparean una vez al año, a fines de la primavera o al comienzo del verano. La mayoría de caracoles son hermafroditas. Los caracoles depositan hasta cien huevos unas pocas semanas después del apareamiento. Estos huevos presentan una forma esférica pequeña de color blanquecino. Los huevos comienzan a eclosionar aproximadamente dos semanas después. Unos meses después de la eclosión, los caracoles bebés comienzan a verse como versiones en miniatura de sus padres. Los caracoles generalmente se vuelven adultos después de un año, pero los

tipos más grandes pueden demorar cuatro años. La mayoría de los caracoles viven entre dos y ocho años⁵⁹.

1.3.1. Plaga de caracoles

Los caracoles se reproducen con relativa facilidad. Comen casi cualquier cosa orgánica, y un solo individuo puede tener cientos de crías cada año. Entonces, cuando la población aumenta a niveles excesivos y comienza a afectar a los humanos u otros animales, se convierte en un problema⁶⁰.

Una plaga es un daño ocasionado por una irrupción multitudinaria de insectos, animales u otros organismos de una misma especie; que afecta a una gran parte de la población o sus actividades. Pueden competir por alimentos o transportar organismos que comprometan la salud de las personas. Desde esta perspectiva, algunas especies de caracoles se convierten en plagas peligrosas que han afectado principalmente a la agricultura. Sin embargo, una especie puede ser una plaga en un lugar y no en otro, ya que sus efectos dañinos no son los mismos en todas partes.

A menudo, los animales introducidos en áreas donde no son nativos se convierten en plagas una vez que preceden a algunas especies locales o alteran el equilibrio ecológico de su nuevo hábitat. Pueden prosperar tan bien allí que su número aumenta tan rápidamente y sus efectos dañinos en el sitio se multiplican⁶⁰.

El problema con los caracoles terrestres con respecto a la agricultura es que muestran una preferencia importante por el consumo de cultivos económicamente valiosos para los humanos, como el cacao, la calabaza, la papaya y otros. Cuando comen estas plantas, causan pérdidas económicas y escasez de alimentos. Por otro lado, muchos caracoles albergan parásitos capaces de llegar a otros animales y personas, causando enfermedades peligrosas como la esquistosomiasis, fascioliasis, paragonimiasis, etc⁶¹.

1.3.1.1. *Helix pomatia*

1.3.1.1.1. Clasificación taxonómica

El caracol estudiado en el presente trabajo, presenta la siguiente clasificación taxonómica, según el ITIS⁶²:

- Reino: *Animalia*
- Subreino: *Bilateria*
- Infrarreino: *Protostomia*
- Superfilo: *Lophozoa*
- Filo: *Mollusca*
- Clase: *Gastropoda*
- Orden: *Stylommatophora*
- Familia: *Helicidae*
- Género: *Helix* Linnaeus
- Especie: *Helix pomatia* Linnaeus

1.3.1.1.2. Nombre común

Caracol romano, caracol de Borgoña, caracol de viña, Escargot, etc⁶².

1.3.1.1.3. Descripción

El *Helix Pomatia* Linnaeus presenta una concha que mide 3-4.5 cm de alto y 3-5 cm de ancho aproximadamente. Constituye aproximadamente un tercio del peso total del caracol y protege sus órganos internos. Tiene un color marrón, 3 a 5 bandas o rayas más oscuras y 4 a 5 espirales. La apertura del caparazón es grande, con bordes blancos⁶⁰.

El *Helix Pomatia* Linnaeus es un caracol terrestre (**Fig. 4**), que posee un solo pulmón y un pie muscular que ayuda con su locomoción. El pie se contrae para producir movimiento y las glándulas dentro de él liberan un moco que reduce la fricción con la superficie inferior, reduciendo los riesgos de dañar su piel. Otra característica anatómica importante son los dos pares de tentáculos en la cabeza. El par superior tiene los ojos, mientras que el inferior contiene sensores de olor⁶⁰.



Fig. 4 Caracol *H. pomatia*⁶⁰.

1.3.1.1.4. Distribución y hábitat

El caracol romano habita en muchas partes del centro, sureste, oeste, este, norte y sur de Europa. Sin embargo, ha sido trasladado por los humanos a Oceanía, Asia, África, y las Américas, donde existe una gran industria de cría de caracoles de esta y algunas otras especies comestibles. El hábitat de este caracol generalmente está por debajo de los 2.000 m.s.n.m. en lugares con temperatura moderada y alta humedad. No habitan en lugares con mucha luz, ya que no pueden tolerar la luz solar directa. Sin embargo; estos caracoles presentan una gran resiliencia, adaptándose para vivir en varios tipos de hábitats².

1.3.1.1.5. Alimentación

El *H. pomatia* es un herbívoro que se alimenta de frutas, verduras, hojas, flores, savia de los árboles y otros elementos de las plantas. Al igual que otros gasterópodos, este caracol raspa su comida con la ayuda de una estructura bucal llamada rádula, que contiene varias filas de pequeños dientes de quitina. Por lo general, su alimentación la realiza durante la noche, pero puede encontrarlos durante las primeras horas de la mañana o los días lluviosos. Estos caracoles necesitan consumir una cantidad considerable de calcio para preservar sus caparazones lo más duro posible, y cuando no

pueden obtenerlo de sus alimentos, se alimentarán de otros materiales que contienen calcio, incluso tierra o rocas⁶³.

1.3.1.1.6. Reproducción

EL *Helix Pomatia* Linnaeus coloca huevos. Estos caracoles son hermafroditas, ya que tienen órganos reproductores masculinos y femeninos. Sin embargo, pueden aparearse con otros individuos de su especie. Estos caracoles alcanzan la madurez sexual entre los 2-4 años de edad. Cuando los huevos están listos, seleccionan un lugar subterráneo donde colocan de 8 a 30 huevos, de los cuales nacen los caracoles bebés y no reciben ningún cuidado de sus padres. Este proceso se puede repetir de 2 a 6 veces al año, dependiendo de las condiciones climáticas⁶⁰.

1.3.1.1.7. Aplicaciones

Los gasterópodos como el *Helix Pomatia* Linnaeus han sido utilizados por su valor culinario durante siglos, y las propiedades curativas de la baba de caracol para tratar quemaduras, abscesos y otras heridas ya han sido mencionadas en la antigüedad por Hipócrates. Recientemente, la baba de caracol es también utilizada en el sector cosmético, ya sea directamente o como crema comercial, con promesas de un efecto de regeneración de la piel, lucha contra el acné, cicatrizante o antienvjecimiento⁶⁴.

1.4. Molusquidas

Como se indicó en la sección anterior, se sabe que algunos caracoles son portadores de enfermedades y vectores de plagas; asimismo, pueden afectar la agricultura, debido a su preferencia por alimentarse de cultivos útiles para los seres humanos. Existe una gran población de caracoles que habita en aguas dulces, donde las larvas de trematodos parásitos también pasan a ser parte de su ciclo de vida; por lo tanto, causan una serie de enfermedades. Existen enfermedades transmitidas por los caracoles acuáticos, la fascioliasis y la esquistosomiasis, las cuales causan un daño inmenso al hombre y a

sus animales domésticos. Debido a esto, se han probado diferentes de compuestos sintéticos para la erradicación de caracoles. Aunque eficaces, estos molusquicidas hasta ahora no han demostrado ser enteramente satisfactorios; ya que, pueden causar contaminación ambiental. Asimismo, se están haciendo esfuerzos para encontrar molusquicidas de origen vegetal⁶⁵.

1.4.1. Molusquicidas sintéticos

Existen varios tipos de molusquicidas sintéticos disponibles para el control de los caracoles, entre los principales tenemos: metaldehído (causa un efecto irritante, provocando que los caracoles segreguen grandes cantidades de moco y se dessequen), carbamatos (son agentes anticolinesterasa), organofosforados (potentes inhibidores de la colinesterasa) y piretroides sintéticos (actúan principalmente sobre la membrana nerviosa, alterando su permeabilidad a Na^+ y K^+ , esto provoca descargas repetitivas de los nervios en las sinapsis y las uniones neuromusculares). Sin embargo, estos molusquicidas sintéticos pueden causar serios riesgos medioambientales⁶⁶.

1.4.2. Molusquicidas de origen vegetal

Los molusquicidas de origen vegetal o biomolusquicidas, son producto de la biosíntesis de las especies vegetales; por lo tanto, son potencialmente más biodegradables y de menor costo en comparación a los sintéticos. Además, estos biomolusquicidas presentan una alta toxicidad sobre las plagas diana, pero baja toxicidad sobre los otros seres vivos⁶⁵.

Se ha encontrado que diversas plantas presentan varios grupos de compuestos que son tóxicos para los caracoles. Entre estos compuestos tenemos: saponinas, taninos, alcaloides, alquifenoles, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas, terpenoides, cumarinas, naftoquinonas y los ésteres de forbol, los cuales son venenosos para los caracoles a dosis aceptables que oscilan entre $<1-100 \text{ ppm}^{67}$.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Material biológico

2.1.1.1. Mojuelo de la *Chenopodium quinoa*

Los mojuelos de la *Chenopodium quinoa* roja y blanca (**Fig. 5**) fueron obtenidos de la empresa Fondo América, localizada en el distrito de La Joya, perteneciente a la provincia de Arequipa del departamento de Arequipa, Perú. La recolección se realizó en el mes de abril del 2017.



Fig. 5 Mojuelo de la *Chenopodium quinoa* roja.

2.1.1.2. Animales de experimentación

Los experimentos fueron realizados en 150 caracoles de la especie *Helix pomatia* Linnaeus (**Fig. 6**), con un peso de 4-6 gramos y una edad entre 4 a 6 semanas. Estos animales fueron adquiridos en el fundo majes de la Universidad Católica de Santa María. Los animales se mantuvieron en un ambiente cerrado, a temperatura ambiente (20 °C), con alimentación a base de hojas de limón y naranja.



Fig. 6 Caracol de la especie Helix Pomatia Linnaeus

2.1.1.3. Material de laboratorio

- Espátula
- Bolsas de cierre hermético
- Tamices de 250 – 850 μm
- Papel filtro
- Perlas de vidrio
- Probetas de 100 y 1000 mL
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL
- Vasos de precipitados 100 y 250 mL
- Luna de reloj
- Fiolas de 5, 10 y 25 mL
- Tubos de ensayo
- Papel aluminio
- Balón de vidrio fondo plano
- Desecador de vidrio
- Cuba de desarrollo cromatográfico
- Placa de sílica gel
- Capilares
- Atomizadores
- Bandejas de plástico
- Malla de plástico

2.2. Reactivos

- Etanol 96% (Merck)
- Etanol 70% (Merck)
- Cloroformo (Merck)
- Metanol (Merck)
- Agua destilada
- Ácido sulfúrico (Merck)
- Vainillina (Merck)
- Sulfato de amonio (Merck)
- Anhídrido acético (Merck)
- Estándar de saponina (Ácido Oleanólico >97%) (Merck)

2.3. Equipos

- Balanza Analítica (OHAUS® PIONEER™)
- Equipo de Percolación (Equipo casero)
- Equipo de baño María (GIMA STAR®)
- Rotavapor (BUCHI Labortechnik AG CH-9230 Flawil)
- Estufa (MEMMERT Western Germany)
- Espectrofotómetro UV/VIS (Shimadzu UV 1700)

2.4. Métodos

2.4.1. Obtención de extractos de mojuelo de la *Chenopodium quinoa*

2.4.1.1. Recolección y procesamiento del material vegetal

El mojuelo de la *Chenopodium quinoa* obtenido se guardó en bolsas con cierre hermético, para su adecuado traslado al laboratorio de la Universidad Católica de Santa María. En el laboratorio se procedió a completar el secado, para lo cual se dejó bajo la sombra a temperatura ambiente (aproximadamente

20°C) durante 3 días. Para obtener partículas pequeñas y homogéneas el material vegetal fue tamizado en un rango de tamaño de 250-850 μm , como se observa en la **Fig. 7**. La parte tamizada se guardó en un recipiente cerrado herméticamente y se almacenó en un ambiente seco y apartado de la luz solar, con el fin de lograr una adecuada conservación.



Fig. 7 Tamizado del mojuelo de la *Chenopodium quinoa*.

2.4.1.2. Obtención de los extractos

La extracción de los metabolitos activos del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* se ejecutó por el método de percolación (**Fig. 8**). Este método de extracción se fundamenta en el uso de un percolador, en el cual se deposita el material en estudio; luego, se adiciona un determinado disolvente, que arrastra los metabolitos activos de interés, siendo recolectados por la parte inferior del equipo. Éste proceso depende esencialmente de la solubilidad y la difusión efectiva que tienen los principios activos de interés; además, este proceso se ve favorecido por el área superficial del material, que está en contacto con el solvente²⁹.



Fig. 8 Obtención del extracto del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* por el método de percolación

El procedimiento para la obtención del extracto consistió en pesar 200 g del mojuelo de *Chenopodium quinoa* tamizado. Seguidamente, se agregó el material vegetal en el equipo de percolación. Asimismo, en la parte superior del material vegetal se colocó papel filtro y perlas de vidrio; a continuación, se añadió 2000 mL de solvente (etanol al 70%). Se dejó macerar durante 24 horas y finalmente se dejó fluir el solvente a una velocidad aproximada de 20 gotas/minuto, en un recipiente ámbar. El extracto obtenido fue almacenado a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) y alejado de la luz. Este procedimiento fue realizado por triplicado. Además, cabe señalar que se eligió etanol al 70% como disolvente, debido a que las saponinas son glucósidos hidrosolubles, tomando en cuenta que un solvente polar disuelve a un soluto polar⁶⁸.

2.4.1.3. Rendimiento de la extracción

El porcentaje de rendimiento de extracción (RE%), se realizó por medio del método gravimétrico. El procedimiento consistió en llevar el extracto obtenido al rotavapor, con la finalidad de eliminar el solvente y obtener un extracto blando. Seguidamente, el extracto fue colocado en un balón de fondo plano previamente pesado y se llevó a baño María de aproximadamente 50 °C, con el objetivo de evaporar los restos de solvente. Posteriormente, se colocó los

balones en el desecador para obtener un peso constate. El recipiente con el extracto blando fue pesado y se le resto la masa inicial del balón vacío, obteniéndose así la masa del extracto blando. Finalmente, se aplicó la **Ecuación (1)** para hallar el RE%. Este procedimiento se realizó por triplicado.

$$RE\% = \frac{\text{Masa extracto (g)}}{\text{Masa material vegetal (g)}} \times 100\% \quad \text{Ecuación (1)}$$

2.4.2. Determinación de saponinas del mojuelo de la *Chenopodium quinoa*

2.4.2.1. Detección de saponinas

Se efectuó la detección de saponinas presentes en el extracto etanólico del mojuelo de la *Chenopodium quinoa*, utilizando el método de cromatografía de capa fina (TLC). La TLC es un tipo de cromatografía, su fase móvil es líquida (mezcla de solventes) y su fase estacionaria es una capa delgada de material (generalmente silica gel) en la parte superior de una plataforma plana (aluminio). Esta capa de material se conoce como sorbente. La fase móvil transporta los solutos a través de la fase estacionaria. La velocidad a la que el soluto se mueve a través de la fase estacionaria depende de la atracción de la fase móvil, ya que disuelve el soluto y lo desplaza hacia arriba; y de la afinidad por el sorbente⁶⁹.

El factor de retención (Rf) se usa para la evaluación cualitativa de una separación por TLC. Este factor se calcula mediante el cociente entre la distancia que recorre el compuesto y la distancia recorrida por la fase móvil, como se observa en la **Fig. 9**⁷⁰.

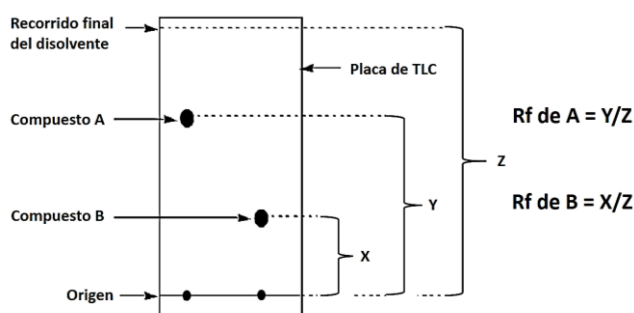


Fig. 9 Cálculo de los valores de Rf⁷⁰.

En la presente investigación, se utilizó la técnica de cromatografía de capa fina para detectar la presencia de saponinas en el extracto etanólico del mojuelo de la *Chenopodium quinoa*. Se dispuso de una placa de sílica gel de 100 x 40 mm, en la que se marcó los puntos de origen a 10 mm del borde inferior, con una distancia entre ellos de 5 mm y en el siguiente orden: uno para el ácido oleanólico (estándar de saponina) y uno para cada muestra del extracto etanólico del mojuelo de la *Chenopodium quinoa*. La solución de ácido oleanólico y de los extractos fueron preparadas disolviendo 0.005 g en 5 mL de metanol (concentración final: 1 mg/mL). Seguidamente, se aplicó utilizando tubos capilares de vidrio, en su correspondiente punto de origen, aproximadamente 10 μ L solución de los extractos y 2 μ L de la solución de ácido oleanólico, en alícuotas de no más de 1 μ L cada vez., dejando secar cada área después de cada aplicación. Se colocó la placa en la cámara cromatográfica conteniendo como fase móvil cloroformo:metanol (9:1). El proceso de la cromatografía terminó cuando el solvente por capilaridad alcanzó 1 cm antes del borde de la placa de sílica gel. Al retirar la placa de la cámara cromatográfica se marcó rápidamente la distancia alcanzada con un lápiz.

La detección se realizó con el revelador vainillina-ácido sulfúrico, que se basa en la reacción de la vainillina con las saponinas triterpénicas oxidadas por el ácido sulfúrico, generándose compuestos de color rojo purpura⁷¹. Para lo cual, la placa se pulverizó con ácido sulfúrico al 5% en etanol, seguida inmediatamente por vainillina al 1% en etanol. Después se calentó a 100 °C durante 5 minutos y se observó en el rango visible⁷².

2.4.2.2. Cuantificación de saponinas

Para la cuantificación de saponinas del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* se empleó el ensayo espectrofotométrico UV/VIS desarrollado por Lozano et al⁷³. Este método consiste en la utilización del reactivo de Liebermann-Burchard (16.7% de anhídrido acético en ácido sulfúrico concentrado). El método espectrofotométrico UV/VIS es normalmente utilizado para la cuantificación de estos metabolitos secundarios en materiales vegetales,

debido a su fácil realización, su bajo costo y obtención de resultados a corto tiempo. Esta técnica se basa en la oxidación de las saponinas por el ácido sulfúrico, las saponinas oxidadas reaccionan con anhídrido acético, formando productos coloridos⁷³.

Se determinó la longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}), para lo cual se realizó un barrido con el ácido oleanólico (90%). Luego se preparó una curva de calibración absorbancia/concentración, para ello se elaboró una solución madre de 100 mg/L con el ácido oleanólico. Las disoluciones obtenidas a partir de esta solución fueron de 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8.0, 16.0 y 24.0 mg/L a un volumen total de 2 mL con agua, a estas diluciones se les añadió 7 mL del reactivo Liebermann-Burchard, se agitó durante 20 segundos utilizando un agitador vórtex y se dejó inmóvil durante 30 minutos. Seguidamente, se determinó la absorbancia de cada disolución a la λ_{\max} , construyendo con los datos la curva de calibración y encontrando la ecuación que la describe. Este proceso se realizó por triplicado⁷³.

Una vez obtenida la curva de calibración se procedió a determinar el contenido de saponinas en el extracto alcohólico del mojuelo de la *Chenopodium quinoa*. La cantidad que se tomó del extracto fue de 10 mg disueltos en 2 mL de agua. A continuación, se procedió de forma similar como el procedimiento descrito para las soluciones estándar.

2.4.3. Evaluación de la actividad molusquicida de los extractos de mojuelo de *Chenopodium quinoa*

2.4.3.1. Elaboración del biomolusquicida

Una vez comprobada la presencia de saponinas en el extracto etanólico del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* roja y blanca, se procedió a darle una formulación para su aplicación por medio de un pulverizador. La formulación estuvo dada por la mezcla del extracto, agua y sulfato de amonio (fertilizante inorgánico que permite agregar nitrógeno a suelos deficientes)⁷⁴ en diferentes proporciones, como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1 Formulaciones del biopesticida

Composición	Formulaciones				Control Negativo
	I	II	III	IV	
Extracto	0.5%	1.0%	2.0%	5.0%	0.0%
Sulfato de amonio	2.0%	2.0%	2.0%	2.0%	2.0%
Agua	97.5%	97.0%	96.0%	93.0%	98.0%

2.4.3.2. Preparación del ecosistema artificial

Se preparó cinco ecosistemas artificiales, con el fin que los caracoles se encuentren en un ambiente similar a su hábitat habitual. Se recolectaron caracoles adultos de 1 año de edad aproximadamente, del mismo tamaño y de color marrón. En bandejas de plástico (30 cm de largo, 12 cm de ancho y 10 cm de alto) se colocó tierra procedente de su hábitat natural hasta una altura de 5 cm aproximadamente, esta tierra fue humedecida con 10 mL de agua destilada utilizando un esparcidor; además, se añadió hojas de limón (3 a 4 hojas) las cuales son el alimento natural de estos caracoles. Finalmente, se instaló una malla en la parte superior de la bandeja, para evitar que los caracoles salgan del ecosistema artificial. Los ecosistemas artificiales se muestran en la **Fig. 12**. Se trabajó en condiciones de humedad ambiental y sombra.



Fig. 10 Ecosistemas artificiales para los caracoles.

2.4.3.3. Evaluación del efecto molusquicida

Para evaluar el efecto molusquicida del extracto etanólico del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* roja y blanca, se determinó la dosis letal 50% (DL₅₀). La DL₅₀ es la dosis del biopesticida que produce la muerte del 50% de los caracoles.

Para encontrar la DL₅₀, se colocó 5 caracoles en cada ecosistema artificial, se dejó que estos animales se adecúen a este medio durante 3 días. Luego de transcurrido este tiempo, por medio de un esparcidor se dispersó

aproximadamente 2 mL cada una de las formulaciones y el control negativo sobre los caracoles; este proceso se realizó una vez por día durante siete días. Se evaluó el tiempo de muerte y cuantos caracoles murieron durante este periodo. Los caracoles se consideraban muertos si permanecían inactivos cuando se les pinchaba con un objeto punzante o si permanecían retraídos en el caparazón o si el color del caparazón y el pie cambiaba a un blanco brumoso. Este estudio se realizó por triplicado.

2.4.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron llevados a una matriz y analizados mediante el software Microsoft Excel 2016, el mismo que también se utilizó para realizar una estadística descriptiva determinando el promedio aritmético y desviación estándar de estos datos.

Por otra parte, se realizó una estadística diferencial, que permitió la comparación de los grupos experimentales, mediante un análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de múltiples rangos de menor diferencia significativa (LSD) al 95% de nivel de confianza, para el mismo que se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI.I.

La determinación de la dosis del biopesticida que produce el 50% de caracoles muertos (DL₅₀), se realizó mediante el método de Miller y Tainter descrito por Randhawa⁷⁵, el cual consistió en transformar el porcentaje de animales que murieron a cada dosis en probitos, los valores de probitos se representaron en función de las dosis logarítmicas y luego se determinó la dosis correspondiente al probito 5, es decir, 50%. Además, los valores se presentan considerando el error estándar (SE) de la DL₅₀ el cual se determinó mediante la ecuación planteada por Randhawa, donde N es el número de animales en cada grupo y los probitos de 84 y 16 son 5.99 y 4.01; respectivamente⁷⁵.

$$SE = \frac{(\text{Log}DL_{84} - \text{Log}DL_{16})}{\sqrt{2N}} \quad \text{Ecuación (2)}$$

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de los extractos del mojuelo de la *Chenopodium quinoa*

La obtención de los extractos del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* roja y blanca se realizó por el método de percolación. La **Fig. 11a** muestra la obtención de los extractos después de la percolación con etanol al 70%. Asimismo, se ha reportado en la literatura científica diversos estudios que utilizan a la percolación con soluciones hidroalcohólicas, para la extracción de saponinas de diversas especies vegetales, señalando que este método es adecuado para la extracción de este tipo de metabolitos secundarios, debido a su polaridad^{76,77}.

La coloración de los extractos obtenidos fue amarillenta, tanto para el caso de la *Chenopodium quinoa* roja y blanca (**Fig. 11a**), similar al extracto que obtuvieron en el trabajo realizado por Apaza et al.¹³ Por otro lado, se eliminó el solvente obteniéndose un extracto blando (**Fig. 11b**), el cual mostro una apariencia blanda y consistente, con un color amarillo-verdoso. El extracto obtenido por Coello⁷⁸ reportó características similares al extracto presentado en esta investigación, en el cual se identificó la presencia de saponinas⁷⁸.



Fig. 11 Extracto obtenido del mojuelo de la *Chenopodium quinoa*. a) Después de la percolación, b) Después de la eliminación del solvente.

Además, se determinó el porcentaje de rendimiento (%RE) de la extracción de los extractos del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* blanca y roja. El %RE está referido como porcentaje peso/peso (% p/p), que equivale a gramos de extracto obtenido por cada 100 gramos de la especie vegetal utilizada. La **Tabla 2** presenta los resultados conseguidos con respecto al %RE, los cuales refieren un rendimiento promedio para la *Chenopodium quinoa* roja de $7.31 \pm 0.63\%$ y para la *Chenopodium quinoa* blanca de $6.83 \pm 0.47\%$.

*Tabla 2 Rendimiento de extracción del mojuelo la *Chenopodium quinoa* blanca y roja*

%RE <i>Chenopodium quinoa</i> Roja				%RE <i>Chenopodium quinoa</i> Blanca			
N° de extracción	Mojuelo (g)	Masa del extracto blando (g)	Rendimiento (%p/p)	N° de extracción	Mojuelo (g)	Masa del extracto blando (g)	Rendimiento (%p/p)
1	200.00	13.56	6.78	1	200.00	12.94	6.47
2	200.00	15.11	7.56	2	200.00	14.76	7.38
3	200.00	14.48	7.24	3	200.00	12.51	6.26
4	200.00	13.89	8.24	4	200.00	14.38	7.19
5	200.00	13.43	6.72	5	200.00	13.67	6.84
Promedio (\bar{x})			7.31	Promedio (\bar{x})			6.83
Desviación estándar (σ)			0.63	Desviación estándar (σ)			0.47

En el trabajo de investigación reportado por Lozano et al.⁷⁹ señalan que obtuvieron un rendimiento de extracción en un rango de 36.0 – 39.4% de los residuos de escarificado (mojuelo) generados por empresas exportadoras de *Chenopodium quinoa*⁷⁹. La diferencia en el rendimiento de extracción en comparación a la presente investigación podría estar dado debido al uso de otro método de extracción, ya que la investigación referida utilizó la maceración y como disolvente etanol al 50%; asimismo, al utilizar una mayor proporción de agua, se produciría una mayor solubilidad de compuestos polares, provocando un mayor rendimiento de extracción. Por otro lado, en el trabajo realizado por Carrasco⁸⁰ obtuvieron un rendimiento de 11.6% del extracto alcohólico del mojuelo de la *Chenopodium quinoa*⁸⁰, el cual es más cercano al obtenido en el presente trabajo, esto se debe probablemente a que usaron alcohol absoluto para la extracción, evitando así la solubilidad de gran parte de los compuestos polares.

3.2. Determinación de saponinas

3.2.1. Detección de saponinas

La detección de las saponinas en los extractos hidroalcohólicos del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* roja y blanca, se realizó mediante el método de cromatografía de capa fina. La fase móvil utilizada fue cloroformo:metanol (9:1) y el revelador vainillina-ácido sulfúrico, este último permite detectar a las saponinas en el rango de luz visible, ya que las saponinas reaccionan con este revelador produciendo manchas de color azul, azul violeta y algunas veces rojo o amarillo-marrón⁷². La **Fig. 12** muestra la placa cromatográfica de los extractos del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* roja y blanca luego de la aplicación del revelador vainillina-ácido sulfúrico, esta figura corresponde a la luz visible. Esta figura muestra manchas de color marrón, azul violeta y amarillo-marrón, las cuales corresponderían a las saponinas presentes en los extractos de *Chenopodium quinoa* y en el ácido oleanólico. De acuerdo, al artículo reportado por Le et al⁷¹, el principio básico de este método es la oxidación de las saponinas por el ácido sulfúrico, seguido de su reacción con la vainillina en medio ácido formando compuestos coloreados⁷¹.



Fig. 12 Placa cromatográfica del extracto hidroalcohólico del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* roja (QR), del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* blanca (QB) y del ácido oleanólico (ST), después de la aplicación del revelador y observado en luz visible.

La **Tabla 3** presenta los valores de Rf de las principales manchas observadas en la **Fig. 12**. En el presente estudio se utilizó un estándar de saponina (ácido oleanólico) como referencia, la mancha del ácido oleanólico tiene un Rf de 0.33, la cual también se encuentra en el extracto hidroalcohólico del mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y blanca, por lo que se podría corroborar la presencia de este compuesto en ambos extractos. En la investigación realizada por Ng et al., en la cual utilizaron la cromatografía de capa fina para analizar la presencia de saponinas en la *Chenopodium quinoa*, encontrándose al ácido oleanólico (**Fig. 13a**) como componente de esta especie vegetal⁸¹.

Tabla 3 Valores de Rf de las principales manchas visibles en la placa cromatográfica para la detección de saponinas

Mancha en placa con revelador	Rf del ácido oleanólico	Rf del extracto de <i>C. quinoa</i> roja	Rf del extracto de <i>C. quinoa</i> blanca
1 ^a	-	0.22	0.22
2 ^a	0.33	0.33	0.33
3 ^a	-	0.48	0.48
4 ^a	-	0.56	0.56
5 ^a	-	-	0.62
6 ^a	-	0.72	0.72
7 ^a	-	0.91	-

Asimismo, los extractos hidroalcohólicos del mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y blanca presentan otras manchas que corresponderían a otros tipos de saponinas, cuyos Rfs se muestran en la **Tabla 3**. En los estudios realizados por Ahumada et al.^{81,82} y Kuljanabagavad et al.^{81,82} señalan que la *Chenopodium quinoa* presenta diversas saponinas con geninas triterpénicas, entre ellas el ácido oleanólico, la hederagenina, la gipsogenina, el ácido serjanico, el ácido espergulagénico y el ácido fitolacagénico, en la **Fig. 13** se observa la estructura química de estos compuestos^{81,82}. Es así que, las manchas que representan las demás saponinas en la placa cromatográfica, posiblemente podrían ser alguno de estos compuestos.

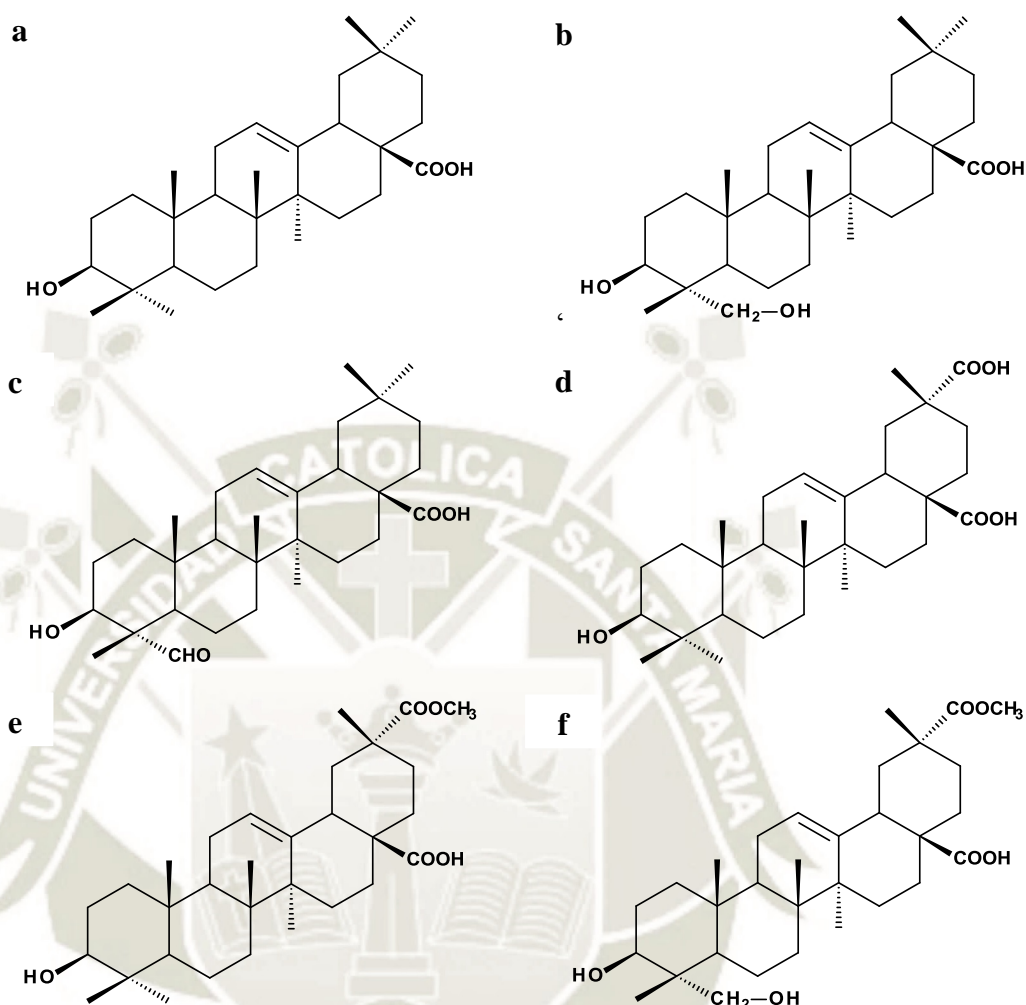


Fig. 13 Saponinas con geninas triterpénicas presentes en la *Chenopodium quinoa*, a) ácido oleanólico, b) hederagenina, c) gipsogenina, d) ácido espergulagénico, e) ácido serjanico y f) ácido fitolacagénico⁸².

3.2.2. Cuantificación de saponinas

Demostrándose la presencia de saponinas en los extractos del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* blanca y roja, se procedió a cuantificar el contenido de las mismas en estos extractos. Como se describe en la parte metodológica, la cuantificación de las saponinas se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico UV/VIS. El ácido oleanólico reaccionó con el reactivo Liebermann-Burchard, formando un producto de color naranja-marrón, al cual se le hizo un barrido espectral dentro del rango UV/VIS, permitiendo elucidar que la longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}) fue a 530 nm, como se aprecia en la **Fig. 14**.

La formación de este producto coloreado se produce por la oxidación del ácido oleanólico por el ácido sulfúrico, este ácido oleanólico oxidado reacciona con el anhídrido acético produciendo grupos cromóforos; estos reactivos forman parte del reactivo de Liebermann-Burchard⁷⁸. Además, en el estudio realizado por Lozano et al.⁷³ utilizaron el mismo método de determinación de saponinas obteniendo una λ_{\max} de 528 nm⁷³, un dato aproximado al obtenido en la presente investigación con una λ_{\max} de 530 nm, la diferencia podría deberse al tipo de espectrofotómetro UV/VIS utilizado, la pureza del ácido oleanólico y reactivos de trabajo, entre otras.

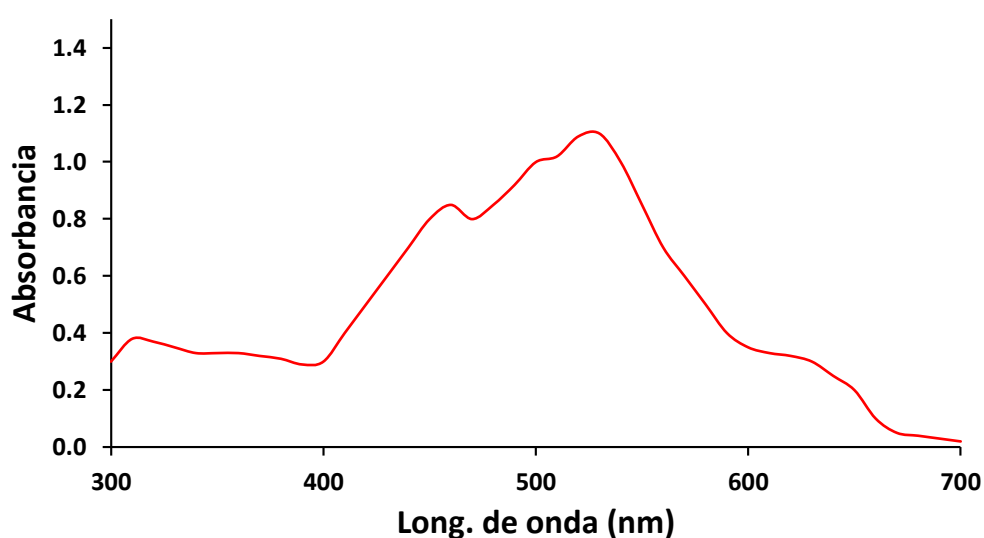


Fig. 14 Espectro de absorción UV/VIS del estándar de saponina (ácido oleanólico).

Una vez obtenida la λ_{\max} , se procedió a la elaboración de la recta de calibración absorbancia/concentración, la cual se muestra en la **Fig. 15**. La ecuación de esta curva fue de $y = 0.0477x - 0.0765$, donde “y” representa a la absorbancia (variable dependiente), “x” representa a la concentración (variable independiente), 0.0477 es la pendiente de la línea y -0.0765 es el intercepto en “y”. Asimismo, se determinó el coeficiente de determinación (R^2) de los datos, obteniéndose un valor de 0.9968. El R^2 es una medida estadística de cuán cerca están los datos de la línea de regresión ajustada⁸³. Muchos investigadores consideran un valor de R^2 mayor a 0.99 como una aproximación de linealidad (alta correlación)⁸⁴, es por ello que se podría afirmar que los datos obtenidos para la cuantificación de las saponinas presentan una adecuada correlación.

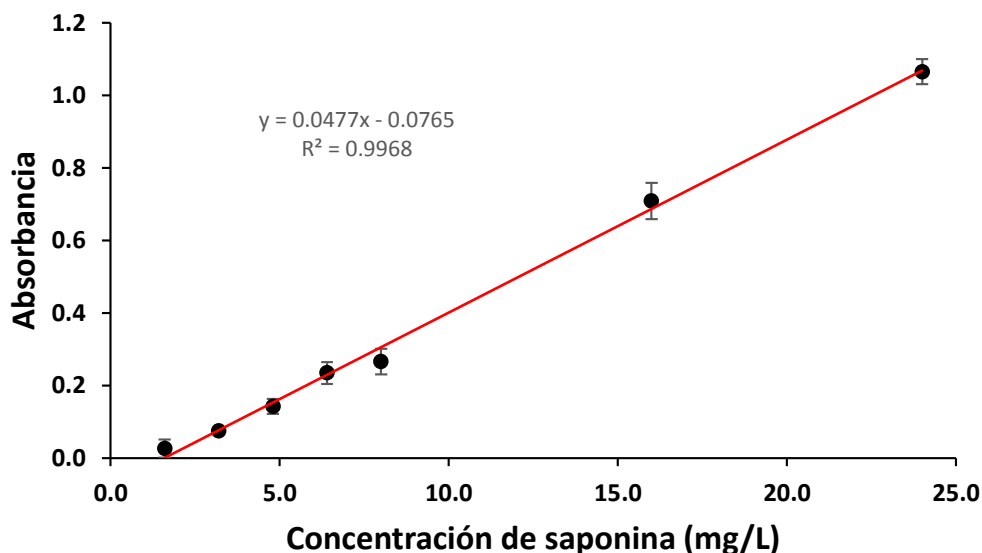


Fig. 15 Recta de calibración para la cuantificación de saponinas por espectrofotometría UV/VIS.

Con la recta de calibración preparada, se procedió a cuantificar la cantidad de saponinas presentes en los extractos hidroalcohólicos del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* roja y blanca (Tabla 4). El contenido de saponinas en los extractos del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* roja fue de 4.64 ± 0.14 mg/L de extracto y de la *Chenopodium quinoa* blanca fue de 4.51 ± 0.06 mg/L.

Tabla 4 Contenido de saponinas en los extractos hidroalcohólicos del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* roja y blanca

<i>Chenopodium quinoa</i> Roja				<i>Chenopodium quinoa</i> Blanca		
Absorbancia	Concentración de saponinas en la muestra			Absorbancia	Concentración de saponinas en la muestra	
	mg/L	mg/100mg			mg/L	mg/100mg
1	0.1485	4.72	0.09	0.1412	4.56	0.09
2	0.1371	4.48	0.09	0.1384	4.51	0.09
3	0.1493	4.73	0.09	0.1357	4.45	0.09
\bar{x}	0.1450	4.64	0.09	0.1384	4.51	0.09
σ	0.0068	0.14	0.003	0.0028	0.06	0.001

En el trabajo de investigación de Lozano et al. señalan que el extracto hidroalcohólico del mojuelo de la *Chenopodium quinoa* tuvo un contenido de saponinas entre 47,3-56,0 mg/100mg de extracto⁷³. Asimismo, Miranda et al. determinaron el contenido de saponinas en los extractos de cáscara de seis ecotipos

de *Chenopodium quinoa*, obteniendo entre 10.0-40.0 mg/100 mg de extracto⁸⁵. De acuerdo a esto, la cantidad de saponinas de los extractos obtenidos en la presente investigación se encuentran lejanos a los datos de estos trabajos. Sin embargo, la diferencia entre el contenido de saponinas se podría deber principalmente al tipo de clima, ya que según Garcia et al. cuando las condiciones ambientales no son favorables (falta de agua, temperaturas extremas, radiación solar inestable), las especies vegetales en respuesta a estos problemas favorecen la síntesis de metabolitos secundario como por ejemplo las saponinas⁸⁶, lo que podría explicar la variabilidad que existen entre un ecotipo y otro.

3.3. Evaluación de la actividad molusquicida de los extractos de mojuelo de *Chenopodium quinoa*.

3.3.1. Actividad biomolusquicida

Se realizó biomolusquicidas que contenían 0.5; 1.0; 2.0 y 5.0 % de extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja o blanca; los mismos que contienen 4.64 mg/L y 4.51 mg/L de saponinas, respectivamente (**ver Tabla 4**). Por lo que las concentraciones de saponina en cada preparado son: 0.023; 0.046; 0.093 y 0.232 mg/L, con el extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja, y 0.023; 0.045; 0.090 y 0.225 mg/L de saponina en el preparado con el extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* blanca. Como se observa las cantidades de saponina que contienen los preparados son similares.

Tabla 5 Promedio de mortalidad del biomolusquicida a base de extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja.

Día de evaluación	Control	0.50%	1.00%	2.00%	5.00%
1	0	0,00	0,00	0,33	2,00
2	0	0,67	0,67	1,00	3,67
3	0	1,00	1,00	1,67	4,67
4	0	1,33	1,67	2,67	5,00
5	0	2,00	2,00	3,00	5,00
6	0	2,00	2,33	3,67	5,00
7	0	2,33	2,67	4,33	5,00

Tabla 6 Porcentaje de mortalidad del biomolusquicida a base de extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja

Día de evaluación	Control	0.50%	1.00%	2.00%	5.00%
1	0.00	0.00	0.00	6.67	40.00
2	0.00	13.33	13.33	20.00	73.33
3	0.00	20.00	20.00	33.33	93.33
4	0.00	26.67	33.33	53.33	100.00
5	0.00	40.00	40.00	60.00	100.00
6	0.00	40.00	46.67	73.33	100.00
7	0.00	46.67	53.33	86.67	100.00

Las **Tablas 5 y 7**, indican el promedio de mortalidad del biomolusquicida a base de mojuelo de *Chenopodium quinoa* blanca y roja, durante el periodo de evaluación de 7 días; en base a estos datos se calculó el porcentaje de mortalidad que produce los biomolusquicidas.

Tabla 7 Promedio de mortalidad del biomolusquicida a base de extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* blanca.

Día de evaluación	Control	0.5 0%	1.00%	2.00%	5.00%
1	0	0,00	0,00	0,33	1,33
2	0	0,33	0,67	1,00	2,67
3	0	1,00	1,00	2,00	3,67
4	0	1,33	2,00	2,67	4,00
5	0	2,00	2,33	3,33	4,33
6	0	2,00	2,33	3,67	4,67
7	0	2,33	2,67	4,33	5,00

Tabla 8 Porcentaje de mortalidad del biomolusquicida a base de extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* blanca

Día de evaluación	Control	0.50%	1.00%	2.00%	5.00%
1	0.00	0.00	0.00	6.67	26.67
2	0.00	6.67	13.33	20.00	53.33
3	0.00	20.00	20.00	40.00	73.33
4	0.00	26.67	40.00	53.33	80.00
5	0.00	40.00	46.67	66.67	86.67
6	0.00	40.00	46.67	73.33	93.33
7	0.00	46.67	53.33	86.67	100.00

Las **Tablas 6 y 8**, muestran el porcentaje de mortalidad que produce los biomolusquicidas a base de extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y

blanca, respectivamente, durante una semana. Nótese que en ambos casos la actividad molusquicida es mínima o nula durante las primeras 24 horas hasta con 2% de extracto; sin embargo, estudios realizados por San Martín *et al.* y Joshi *et al.* en los que reportan que concentraciones bajas de saponinas producen la muerte de casi el 100% de otras especies de caracoles dentro de las 24 y 48 horas (respectivamente)^{87,88}. La diferencia puede deberse, por un lado, a la diferencia de especie de caracol, pero principalmente por las condiciones experimentales, mientras en esos estudios son realizados en medio acuoso, el presente estudio pretende evaluar la actividad molusquicida en un medio semejante en el que habitan los caracoles utilizados.

En el segundo y tercer día se observa para ambos extractos un aumento leve de la mortalidad, siendo mayor para el extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja al 5% de concentración. En el cuarto, quinto y sexto día se notó ascenso de la mortalidad en ambos extractos, pero al 5% de extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja se produce la muerte del 100% de caracoles. Al séptimo día, la mortalidad sigue en aumento con el uso de ambos extractos, en donde se aprecia que 5% de concentración es mortal para los caracoles con ambos extractos de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y blanca, con un nivel de confianza de 95% para este último, estos grupos de datos son similares (**anexo 1.1**). Por lo que, observando la mortalidad que producen las otras concentraciones de extracto, se puede deducir que ambas variedades de *Chenopodium quinoa* producen una actividad molusquicida, similar entre sí, frente a *Helix pomatia*.

Además, las **Figuras 16 y 17** muestran gráficamente los datos de mortalidad que produce el biomolusquicida, en los que se puede observar que, a mayor concentración de extracto y mayor tiempo de exposición, se produce un mayor nivel de toxicidad en los caracoles, este fenómeno sucede con extractos de ambas variedades de *Chenopodium quinoa*, conclusión a la que también llegaron Joshi *et al.*, quienes evaluaron la eficacia molusquicida de saponinas de *Chenopodium quinoa*⁸⁸. Así mismo, luego de realizar un análisis de varianza, entre las cuatro concentraciones de extracto en cada día evaluado (**anexo 1.2**), se determinó que existe diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$) y mediante la prueba LSD, se determinó que con 5% de extractos de mojuelo de *Chenopodium quinoa*, se produce

una mortalidad, significativamente mayor, de caracoles durante todos los días evaluados (con excepción del séptimo día con extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* blanca, en el que estadísticamente es similar al efecto molusquicida producido con el 2% de extracto).

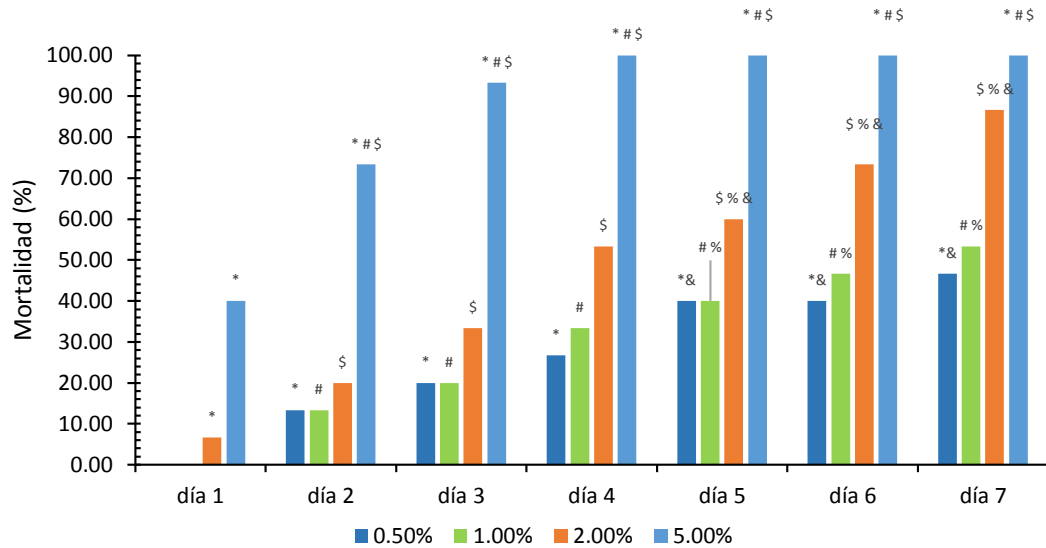


Fig. 16 Mortalidad del biomolusquida con diferentes concentraciones de extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja (0.5; 1.0; 2.0 y 5.0) %. Tratamiento durante 7 días. *, #, &, \$ y % representan una diferencia significativa en cada día. ($p < 0.05$).

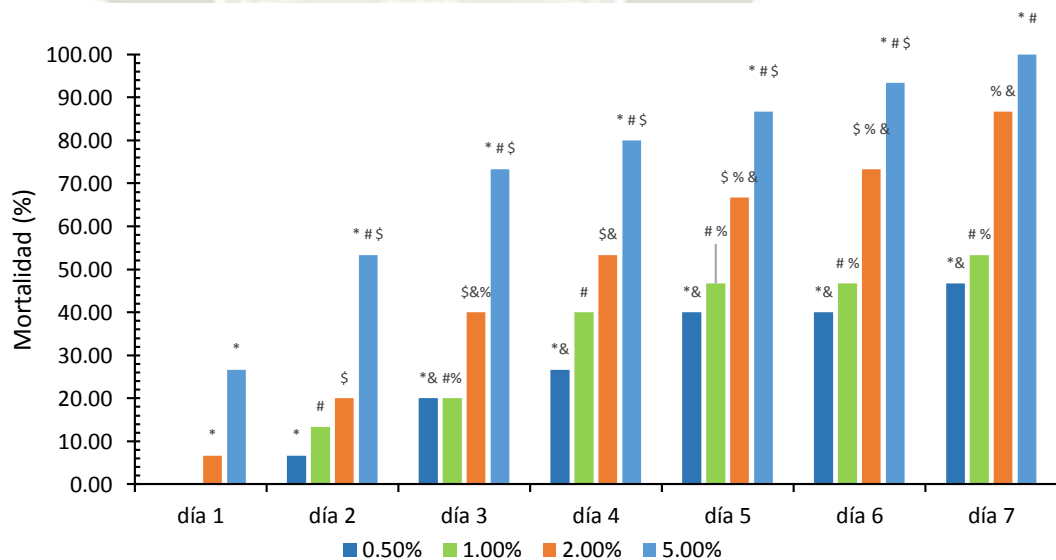


Fig. 17 Mortalidad del biomolusquida con diferentes concentraciones de extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* blanca (0.5; 1.0; 2.0 y 5.0) %. Tratamiento durante 7 días. *, #, &, \$ y % representan una diferencia significativa en cada día. ($p < 0.05$).

3.3.2. Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀)

La **tabla 9** muestra los valores de DL₅₀ para ambos extractos de mojuelo de *Chenopodium quinoa*. Estos valores fueron determinados haciendo uso de una conversión a “probitos”, descrito en la parte metodológica; además, los límites inferior y superior fueron hallados con un nivel de confianza de 95%, según la ecuación 2 (**ver metodología**). Nótese que no se tiene valores de DL₅₀ para el primer día de evaluación, esto es debido a que en muchos casos se obtuvo una mortalidad nula y no es posible tener un probito para un valor de cero.

Además, la **figura 18** muestra estos mismos valores de forma gráfica; en el que se observa que la DL₅₀ es inversamente proporcional al tiempo de exposición, es decir, que a mayor tiempo de contacto de los caracoles se requiere menor cantidad de biomolusquicida para producir la muerte del 50% de la población en estudio, por ende, mayor es la toxicidad observable (mortalidad).

Tabla 9 Concentración de extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* que produce la muerte del 50% de *Helix pomatia* Linnaeus

Día	Cáscara de <i>Chenopodium quinoa</i> roja				Cáscara de <i>Chenopodium quinoa</i> blanca			
	LD50	SE*	Límite inferior	Límite superior	LD50	SE*	Límite inferior	Límite superior
2	3.38 ± 0.37		3.02	3.75	5.25 ± 0.41		4.84	5.66
3	1.74 ± 0.27		1.47	2.01	2.45 ± 0.41		2.04	2.85
4	1.89 ± 0.54		1.35	2.42	1.47 ± 0.43		1.03	1.90
5	1.26 ± 0.75		0.51	2.01	0.91 ± 0.45		0.47	1.36
6	0.86 ± 0.43		0.43	1.29	0.85 ± 0.34		0.51	1.20
7	0.65 ± 0.32		0.33	0.97	0.65 ± 0.32		0.33	0.97

*Error estándar al 95% de nivel de confianza

Evaluando los datos mostrados de DL₅₀, en el segundo y tercer día de estudio existe una diferencia significativa entre las dos variedades de mojuelo de *Chenopodium quinoa*, debido a que esos valores se encuentran fuera de los límites mostrados; sin embargo, se podría aseverar que, a partir del cuarto día, ambas variedades de *Chenopodium quinoa* producen la misma toxicidad sobre los caracoles utilizados en el presente estudio, es decir, no hay diferencia significativa de

la actividad molusquicida entre los dos mojuelos de *Chenopodium quinoa* estudiados en los días 4, 5, 6 y 7.

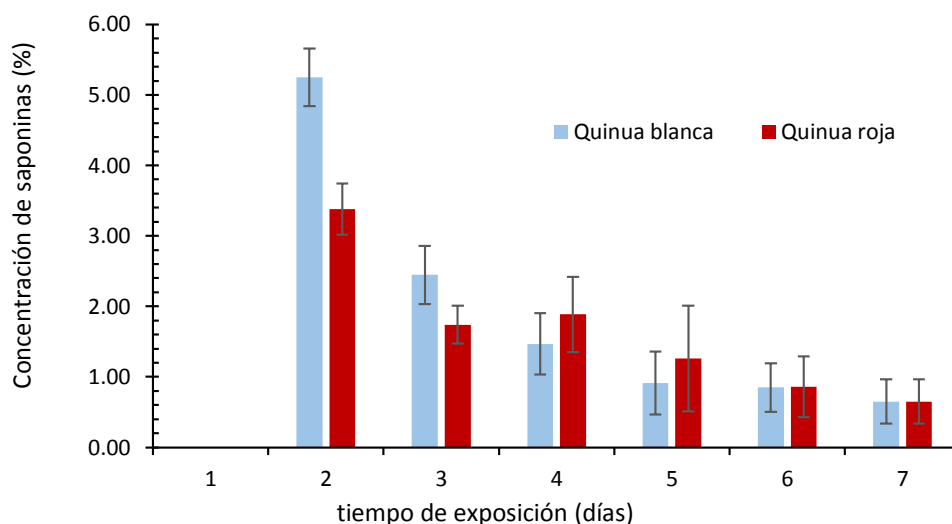


Fig. 18 Dosis letal-50 del biomolusquicida para cada día evaluado.

Por otro lado, estudios en las que evaluaron la actividad molusquicida de saponinas en diferentes especies de caracoles, señalan valores de DL₅₀ expresados incluso en ppm ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); tales son el caso de: Yang *et al.*, quienes reportaron DL₅₀ entre 5.5 y 12.4 ppm en 72 horas⁸⁹; y Castillo-Ruiz *et al.*, quienes reportaron una DL₅₀ de 12.1ppm en 48 horas⁹⁰. Ambos estudios realizados en ambientes acuáticos y esa podría ser la causa de diferencia con los valores del presente estudio, ya que el ecosistema artificial planteado (específicamente la tierra) podría estar interfiriendo en la actividad molusquicida.

Finalmente, a pesar de la diferencia de los valores de DL₅₀ del presente estudio y los mencionados, es importante considerar la aproximación a una situación real; por lo que los resultados del presente estudio brindan una mayor aproximación a la realidad y que muestra una excelente opción para ser usado como molusquicida. Además, el biomolusquicida desarrollado presenta una cualidad única al haber sido preparado aprovechando los recursos de “desecho” como es el caso del mojuelo de *Chenopodium quinoa*, el mismo que como se observó presenta considerable cantidad de saponinas incluso, se sabe que molusquicidas a base de saponinas de *Chenopodium quinoa* no son tóxicas para otras especies probadas en condiciones de experimentales tal como lo señala Lin *et al.*⁹¹ y Castillo- Ruiz *et al.*⁹⁰

CONCLUSIONES

Primero. Se obtuvo extractos de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y blanca, mediante el método de percolación con etanol al 70%. Además, se determinó un porcentaje de rendimiento de $7.31\% \pm 0.63$ para la *Chenopodium quinoa* roja, y $6.83\% \pm 0.47$ para la *Chenopodium quinoa* blanca.

Segundo. Se evidenció la presencia de saponinas en los extractos, mediante cromatografía de capa fina; además, mediante espectrofotometría UV-Vis, se determinó que los extractos de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y blanca contienen 0.09 mg/100mg de saponinas.

Tercero. Se determinó valores de DL_{50} entre 3.38% - 0.65% para el extracto de mojuelo de *Chenopodium quinoa* roja y valores entre 5.25% - 0.65% para la *Chenopodium quinoa* blanca. Así mismo, la actividad molusquicida es dependiente de la concentración y el tiempo de exposición con los caracoles.

SUGERENCIAS

1. Evaluar la actividad de molusquicida utilizando una variedad de especies de caracoles, y determinar si es efectiva.
2. Realizar estudios con mayor profundidad e identificar los metabolitos activos de los extractos.
3. Realizar estudios de la actividad molusquicida a partir de diferentes variedades de *Chenopodium quinoa*.
4. Agricultores deben apostar por el uso de pesticidas biológicos que sean amigables con el cultivo y con el medio ambiente.
5. Se recomienda investigar la actividad molusquicida en concentraciones superiores a 5% para que la efectividad de mortalidad sea iniciada desde el día 1 de su aplicación.

REFERENCIA

1. El-Zemity S, Mohamed S, Radwan M, Sherby S. Molluscicidal efficacy and repellency of some naturally occurring monoterpenoids against the land snail, *Helix aspersa*, Muller (Mollusca: Pulmonata). *Ann Agric Sci.* 2001;46(1):339–46.
2. Pollard E. Aspects of the Ecology of *Helix pomatia* L. *J Anim Ecol.* 1975;44(1):305–29.
3. Castle G, Mills G, Gravell A, Jones L, Townsend I, Cameron D, *et al.* Review of the molluscicide metaldehyde in the environment. *Environ Sci Water Res Technol.* 2017;3(3):415–28.
4. Singh S, Yadav R, Singh A. Molluscicides from some common medicinal plants of eastern Uttar Pradesh, India. *J Appl Toxicol.* 2010;30:1–7.
5. Jiang X, Chr H, Hansen B, Strobel B, Cedergreen N. What is the aquatic toxicity of saponin-rich plant extracts used as biopesticides? *Environ Pollut.* Elsevier Ltd; 2018;236:416–24.
6. ITIS. *Chenopodium quinoa* Willd. Integrated Taxonomic Information System. 2018.
7. Lim T. *Chenopodium Quinoa*. In: *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Springer; 2013. p. 115–31.
8. Wrigley C, Corke H, Seetharaman K, Faubion J. *Quinoa: Overview*. In: *Encyclopedia of Food Grains - The World of Food Grains*. 2nd Editio. Elsevier; 2015. p. 348.
9. Vilcacundo R, Hernández-Ledesma B. Nutritional and biological value of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Curr Opin Food Sci.* 2017;14:1–6.
10. Kuljanabagavad T, Thongphasuk P, Chamulitrat W, Wink M. Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochem Rev.* 2008;69:1919–1926.
11. Mastebroek H, Limburg H, Gilles T, Marvin H. Occurrence of sapogenins in leaves and seeds of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *J Sci Food Agric.* 2000;80(1):152–6.
12. Koziol M. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa

- (Chenopodium quinoa Willd.). *J Food Compos Anal.* 1992;5(1):35–68.
13. Apaza R, Smeltekop H, Flores Y, Almanza G, Salcedo L. Efecto de saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd contra el fitopatógeno *Cercospora beticola* Sacc. *Rev Protección Veg.* 2016;31(1):63–9.
 14. Osbourn A. Saponins and plant defence — a soap story. *Trends Plant Sci.* 1996;1(1):4–9.
 15. Makkar HPS, Siddhuraju P, Becker K. Plant secondary metabolites. In: *Saponins*. New Jersey: Humana Press; 2007. p. 93–100. (Methods in Molecular Biology™; vol. 393).
 16. Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22):12923–8.
 17. Oleszek W, Marston A, editors. *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2000.
 18. Krzyzanowska J, Kowalczyk M, Oleszek W. Analysis of Plant Saponins. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Poland: John Wiley & Sons; 2014. p. 1–21.
 19. Mert-Türk F. Saponins versus plant fungal pathogens. *J Cell Mol Biol.* 2006;(5):13–7.
 20. Morrissey JP, Osbourn a E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(3):708–24.
 21. Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. *Nature.* 2001;411(6839):843–7.
 22. Franz G. Glycosylation of Heterosides (Glycosides). In: *Plant Carbohydrates I*. New York: Springer; 1982. p. 384–93.
 23. Mahato SB, Garai S. Triterpenoid saponins. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Vienna: Springer; 1998. 1–196 p.
 24. Kitagawa I, Yoshikawa M, Yosioka I. Saponin and Sapogenol. XIII. Structures of Three Soybean Saponins: Soyasaponin I, Soyasaponin II, and Soyasaponin III. *Chem Pharm Bull.* 1976;24(1):121–9.
 25. Hayes PY, Jahidin AH, Lehmann R, Penman K, Kitching W, De Voss JJ. Structural revision of shatavarins I and IV, the major components from the

- roots of *Asparagus racemosus*. *Tetrahedron Lett.* 2006;47(39):6965–9.
26. Nishie K, Gumbmann MR, Keyl AC. Pharmacology of solanine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1971;19(1):81–92.
 27. Heng MY, Tan SN, Yong JWH, Ong ES. Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Trends Anal Chem.* Elsevier; 2013;50:1–10.
 28. Cheok CY, Salman HAK, Sulaiman R. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Res Int.* Elsevier; 2014;59:16–40.
 29. Kostova I, Ojala T, Lacy A, O’Kennedy R, Widelski J, Melliou E, *et al.* Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. *J Nat Prod.* 2010;5(8):440.
 30. Jones WP, Kinghorn AD. Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: *Natural Product Isolation.* 2012. p. 341–66.
 31. Phrompittayarat W, Putalun W, Tanaka H, Jetiyanon K, Wittaya-areekul S, Ingkaninan K. Comparison of Various Extraction Methods of *Bacopa monnieri*. *Naresuan Univ J.* 2007;15(1):29–34.
 32. Bart H-J. Extraction of Natural Products from Plants - An Introduction. In: *Industrial Scale Natural Products Extraction.* Weinheim: Wiley; 2011. p. 1–25.
 33. Tava A, Mella M, Avato P, Biazzini E, Pecetti L, Bialy Z, *et al.* New triterpenic saponins from the aerial parts of *Medicago arabica* (L.) Huds. *J Agric Food Chem.* 2009;57(7):2826–35.
 34. Wu J, Lin L, Chau FT. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrason Sonochem.* 2001;8(4):347–52.
 35. Kowalski RJ, Medina-Meza IG, Thapa BB, Murphy KM, Ganjyal GM. Extrusion processing characteristics of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) var. Cherry Vanilla. *J Cereal Sci.* Elsevier; 2016;70:91–8.
 36. Takeuchi TM, Pereira CG, Braga MEM, Maróstica MR, Leal PF, Meireles MAA. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. In: *Extracting bioactive compounds for food products – Theory and Applications.* Boca Raton: CRC press; 2009. p. 137–218.

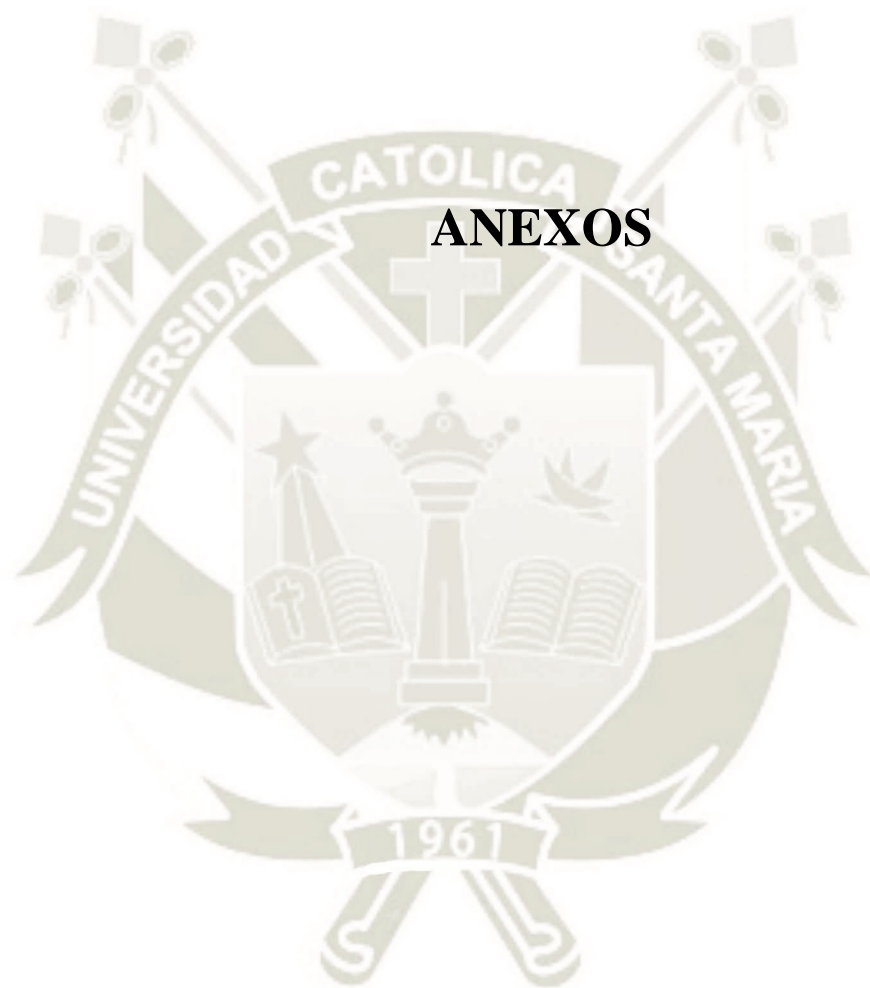
37. Chen Y, Xie MY, Gong XF. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *J Food Eng.* 2007;81(1):162–70.
38. Zhang Y, Liu C, Qi Y, Li S, Wang J. Application of accelerated solvent extraction coupled with counter-current chromatography to extraction and online isolation of saponins with a broad range of polarity from *Panax notoginseng*. *Sep Purif Technol.* 2013;106:82–9.
39. Yoshikawa T, Furuya T. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 1987;6:449–53.
40. Rouessac F, Rouessac A. *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques.* 2nd ed. John Wiley & Sons; 2007. 1–574 p.
41. Oleszek WA. Chromatographic determination of plant saponins. *J Chromatogr A.* 2002;967(1):147–62.
42. Harvey D. Chromatographic and Electrophoretic Methods. In: *Modern Analytic Chemistry.* 1st Ed. USA: McGraw-Hill; 2000. p. 543–621.
43. Chen YF, Yang CH, Chang MS, Ciou YP, Huang YC. Foam properties and detergent abilities of the saponins from *Camellia oleifera*. *Int J Mol Sci.* 2010;11(11):4417–25.
44. Habicht SD, Kind V, Rudloff S, Borsch C, Mueller AS, Pallauf J, *et al.* Quantification of antidiabetic extracts and compounds in bitter melon varieties. *Food Chem. Elsevier Ltd;* 2011;126(1):172–6.
45. Segal R, Shatkovsky P, Milo-Goldzweig I. On the mechanism of saponin hemolysis—I. *Biochem Pharmacol.* 1974 Mar;23(5):973–81.
46. Güçlü-Ustündağ O, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2007;47(3):231–58.
47. Pistelli L, Bertoli A, Lepori E, Morelli I, Panizzi L. Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus verrucosus*. *Fitoterapia.* 2002;73(4):336–9.
48. Micich TJ, Foglia TA, Holsinger VH. Polymer-supported saponins: an approach to cholesterol removal from butter oil. *J Agric Food Chem.* 1992 Aug;40(8):1321–5.
49. Hwang D-C, Damodaran S. Selective Precipitation of Fat Globule Membranes

- of Cheese Whey by Saponin and Bile Salt. *J Agric Food Chem.* 1994;42(9):1872–8.
50. Aghel N, Moghimipour E, Raies A. Formulation of a Herbal Shampoo using Total Saponins of *Acanthophyllum squarrosum*. *Iran J Pharm Res.* 2007;6(3):167–72.
51. Ruiz C, Falcocchio S, Xoxi E, Villo L, Nicolosi G, Pastor FIJ, *et al.* Inhibition of *Candida rugosa* lipase by saponins, flavonoids and alkaloids. *J Mol Catal B Enzym.* 2006;40:138–43.
52. Yoo BH, Kang BY, Yeom MH, Sung DS, Han SH, Kim HK, *et al.* Nanoemulsion comprising metabolites of ginseng saponin as an active component and a method for preparing the same, and a skin-care composition for anti-aging containing the same. USA patent; US8263565 B2, 2012. p. 1–16.
53. San Martín R, Briones R. Industrial Uses and Sustainable Supply of. *Econ Bot.* 1999;53(3):302–11.
54. Andresen M, Cedergreen N. Plant growth is stimulated by tea-seed extract: A new natural growth regulator? *HortScience.* 2010;45(12):1848–53.
55. Song S, Zhu L, Zhou W. Simultaneous removal of phenanthrene and cadmium from contaminated soils by saponin, a plant-derived biosurfactant. *Environ Pollut.* 2008;156(3):1368–70.
56. Al Jasem Y, Khan M, Taha A, Thiemann T. Preparation of steroidal hormones with an emphasis on transformations of phytosterols and cholesterol - a review. *Mediterr J Chem.* 2014;3(2):796–830.
57. Sun H, Xie Y, Ye Y. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine.* 2009;27:1787–96.
58. Lacaille-Dubois M a., Wagner H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine.* Gustav Fischer Verlag · Stuttgart · Jena · New York; 1996;2(4):363–86.
59. Woodward J. *Snail.* New York: Infobase Publishing; 2010. 1–32 p.
60. *BioExpedition.* Snail pest. 2017.
61. Cruz-Reyes A, Camargo-Camargo B. Glosario de términos en parasitología y ciencias afines. México: Plaza y Valdes; 2000. 151–162 p.

62. ITIS. *Helix pomatia* Linnaeus. Integrated Taxonomic Information System. 2018.
63. Arrebola J, Alvarez R. La explotación de los caracoles terrestres en España: aspectos ecológicos y socioculturales. *Temas Antropol Aragon*. 2001;11:139–72.
64. Greistorfer S, Klepal W, Cyran N, Gugumuck A, Rudoll L, Suppan J, *et al.* Snail mucus – glandular origin and composition in *Helix pomatia*. *Zoology*. 2017 Jun;122:126–38.
65. Singh A, Singh DK, Misra TN, Agarwal RA. Molluscicides of plant origin. *Biol Agric Hortic*. 1996;13(3):205–52.
66. Agarwal RA, Singh DK. Harmful gastropods and their control. *Acta Hydrochim Hydrobiol*. 1988;16(2):113–38.
67. Marston A, Hostettmann K. Review article number 6. Plant molluscicides. *Phytochemistry*. 1985;24(4):639–52.
68. Mena Valdés L, Tamargo Santos B, Salas Olivet E, Plaza Paredes LE, Blanco Hernández Y, Otero González A, *et al.* Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Rev Cuba Plantas Med*. 2015;20(1):106–16.
69. Santiago M, Strobel S. Thin Layer Chromatography. In: *Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate*. Elsevier; 2013. p. 303–24.
70. Spangenberg B, Poole CF, Weins C. Quantitative thin-layer chromatography: A practical survey. In: *Theoretical Basis of Thin Layer Chromatography (TLC)*. Springer; 2011. p. 13–52.
71. Le A, Parks S, Nguyen M, Roach P. Improving the Vanillin-Sulphuric Acid Method for Quantifying Total Saponins. *Technologies*. 2018;6(84):1–12.
72. Wagner H, Bladt S. Saponin Drugs. In: *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2nd ed. Springer; 1996. p. 305–27.
73. Lozano M, Ticona E, Carrasco C, Flores Y, Almanza G. Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real *Chenopodium quinoa* Willd. *Rev Boliv Quim*. 2012;29(2):131–8.
74. Xue B, Huang H, Mao M, Liu E. An investigation of the effect of ammonium sulfate addition on compound fertilizer granulation. *Particuology*. Chinese

- Society of Particuology; 2017;31:54–8.
75. Randhawa M. Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2009;21(3):184–5.
 76. San Martín R, Briones R. Industrial uses and sustainable supply of Quillaja saponaria (Rosaceae) saponins. *Econ Bot*. 1999;53(3):302–11.
 77. Phrompittayarat W, Wittaya-areekul S, Jetiyanon K, Putalun W, Tanaka H, Ingkaninan K. Determination of Saponin Glycosides in *Bacopa monnieri* by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *Thai Pharm Heal Sci J*. 2007;2(1):26–32.
 78. Coello-Izurieta R. Evaluación del efecto de la saponina extraída de la quinua (*Chenopodium quinoa*) sobre el crecimiento in vitro de *Cercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum* en el cultivo de banano (*Musa x paradisiaca*). Universidad San Francisco de Quito; 2015.
 79. Lozano M, Ticona E, Carrasco C, Flores Y, Almanza G. Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real *Chenopodium quinoa* Willd. *Rev Boliv Química*. 2012;29(2):131–8.
 80. Carrasco-Machicao C. Evaluación de las propiedades detergentes y capacidad formadora de espuma en lavavajillas preparado con saponinas extraídas del mojuelo de quinua. Universidad Mayor San Andrés; 2015.
 81. Ng K, Price K, Fenwick R. A TLC method for the analysis of quinua (*Chenopodium quinoa*) saponins. *Food Chem*. 1994;49:311–5.
 82. Ahumada A, Ortega A, Chito D, Benítez R. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Rev Colomb Cienc Quím Farm*. 2016;45(3):438–69.
 83. Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 7: Correlation and regression. *Crit Care*. 2003;7:451–9.
 84. Sonnergaard J. On the misinterpretation of the correlation coefficient in pharmaceutical sciences. *Int J Pharm*. 2006;321:12–7.
 85. Miranda M, Delatorre J, Vega A, Jorquera E, Quispe I, Martínez E. Antimicrobial Potential and Phytochemical Content of Six Diverse Sources of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Agric Sci*. 2014;5:1015–24.
 86. Garcia M, Plazas N, Carvajal D, Ferreira S, Parra J. Descripción de las

- saponinas en quinua (“*Chenopodium quinoa*” willd) en relación con el suelo y el clima: Una revisión. *Inf Tec*. 2018;82(2):241–9.
87. San Martín R, Ndjoko K, Hostettmann K. Novel molluscicide against *Pomacea canaliculata* based on quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins. *Crop Prot*. Elsevier; 2008 Mar 1;27(3–5):310–9.
 88. Joshi RC, San Martín R, Saez-Navarrete C, Alarcon J, Sainz J, Antolin MM, *et al*. Efficacy of quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins against golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in the Philippines under laboratory conditions. *Crop Prot*. Elsevier; 2008 Mar 1;27(3–5):553–7.
 89. Yang C, Zhang M, Lei B, Gong G, Yue G, Chang X, *et al*. Active saponins from root of *Pueraria peduncularis* (Grah. ex Benth.) Benth. and their molluscicidal effects on *Pomacea canaliculata*. *Pest Manag Sci*. John Wiley & Sons, Ltd; 2017 Jun 1;73(6):1143–7.
 90. Castillo-Ruiz M, Cañon-Jones H, Schlotterbeck T, Lopez MA, Tomas Á, San Martín R. Safety and efficacy of quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins derived molluscicide to control of *Pomacea maculata* in rice fields in the Ebro Delta, Spain. *Crop Prot*. 2018 Sep;111:42–9.
 91. Lin M, Han P, Li Y, Wang W, Lai D, Zhou L. Quinoa Secondary Metabolites and Their Biological Activities or Functions. *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2019 Jul 9;24(13):2512.



ANEXOS

Anexo 1

1.1 Comparación de datos de la actividad molusquicida con 5% de extracto

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	57.3333	13	4.41026	26.46	0.0000
Intra grupos	4.66667	28	0.166667		
Total (Corr.)	62.0	41			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
blanca_1	3	1.33333	X
roja_1	3	2.0	XX
blanca_2	3	2.66667	X
blanca_3	3	3.66667	X
roja_2	3	3.66667	X
blanca_4	3	4.0	XX
blanca_5	3	4.33333	XXX
roja_3	3	4.66667	XX
blanca_6	3	4.66667	XX
roja_7	3	5.0	X
roja_6	3	5.0	X
roja_5	3	5.0	X
blanca_7	3	5.0	X
roja_4	3	5.0	X

1.2 Comparación de datos de la actividad molusquicida, según los días evaluados

1.2.1 Mojuelo de quinua roja

1.2.1.1 Día 1

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8.25	3	2.75	33.00	0.0001
Intra grupos	0.666667	8	0.0833333		
Total (Corr.)	8.91667	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d1_0.5	3	0	X
d1_1.0	3	0	X
d1_2.0	3	0.333333	X
d1_5.0	3	2.0	X

1.2.1.2 Día 2

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	19.0	3	6.33333	25.33	0.0002
Intra grupos	2.0	8	0.25		
Total (Corr.)	21.0	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d2_0.5	3	0.666667	X
d2_1.0	3	0.666667	X
d2_2.0	3	1.0	X
d2_5.0	3	3.66667	X

1.2.1.3 Día 3

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	27.5833	3	9.19444	55.17	0.0000
Intra grupos	1.33333	8	0.166667		
Total (Corr.)	28.9167	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d3_0.5	3	1.0	X
d3_1.0	3	1.0	X
d3_2.0	3	1.66667	X
d3_5.0	3	4.66667	X

1.2.1.4 Día 4

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	24.6667	3	8.22222	32.89	0.0001
Intra grupos	2.0	8	0.25		
Total (Corr.)	26.6667	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d4_0.5	3	1.33333	X
d4_1.0	3	1.66667	X
d4_2.0	3	2.66667	X
d4_5.0	3	5.0	X

1.2.1.5 Día 5

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	18.0	3	6.0	24.00	0.0002
Intra grupos	2.0	8	0.25		
Total (Corr.)	20.0	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d5_0.5	3	2.0	X
d5_1.0	3	2.0	X
d5_2.0	3	3.0	X
d5_5.0	3	5.0	X

1.2.1.6 Día 6

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16.9167	3	5.63889	33.83	0.0001
Intra grupos	1.33333	8	0.166667		
Total (Corr.)	18.25	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d6_0.5	3	2.0	X
d6_1.0	3	2.33333	X
d6_2.0	3	3.66667	X
d6_5.0	3	5.0	X

1.2.1.7 Día 7

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14.9167	3	4.97222	19.89	0.0005
Intra grupos	2.0	8	0.25		
Total (Corr.)	16.9167	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d7_0.5	3	2.33333	X
d7_1.0	3	2.66667	X
d7_2.0	3	4.33333	X
d7_5.0	3	5.0	X

1.2.2 Mojuelo de quinua blanca

1.2.2.1 Día 1

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3.58333	3	1.19444	7.17	0.0118
Intra grupos	1.33333	8	0.166667		
Total (Corr.)	4.91667	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d1_0.5	3	0	X
d1_1.0	3	0	X
d1_2.0	3	0.333333	X
d1_5.0	3	1.33333	X

1.2.2.2 Día 2

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9.66667	3	3.22222	12.89	0.0020
Intra grupos	2.0	8	0.25		
Total (Corr.)	11.6667	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d2_0.5	3	0.333333	X
d2_1.0	3	0.666667	X
d2_2.0	3	1.0	X
d2_5.0	3	2.66667	X

1.2.2.3 Día 3

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14.25	3	4.75	57.00	0.0000
Intra grupos	0.666667	8	0.0833333		
Total (Corr.)	14.9167	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d3_0.5	3	1.0	X
d3_1.0	3	1.0	X
d3_2.0	3	2.0	X
d3_5.0	3	3.66667	X

1.2.2.4 Día 4

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	11.6667	3	3.88889	23.33	0.0003
Intra grupos	1.33333	8	0.166667		
Total (Corr.)	13.0	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d4_0.5	3	1.33333	X
d4_1.0	3	2.0	XX
d4_2.0	3	2.66667	X
d4_5.0	3	4.0	X

1.2.2.5 Día 5

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	10.0	3	3.33333	13.33	0.0018
Intra grupos	2.0	8	0.25		
Total (Corr.)	12.0	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d5_0.5	3	2.0	X
d5_1.0	3	2.33333	X
d5_2.0	3	3.33333	X
d5_5.0	3	4.33333	X

1.2.2.6 Día 6

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	13.6667	3	4.55556	18.22	0.0006
Intra grupos	2.0	8	0.25		
Total (Corr.)	15.6667	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d6_0.5	3	2.0	X
d6_1.0	3	2.33333	X
d6_2.0	3	3.66667	X
d6_5.0	3	4.66667	X

1.2.2.7 Día 7

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14.9167	3	4.97222	19.89	0.0005
Intra grupos	2.0	8	0.25		
Total (Corr.)	16.9167	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
d7_0.5	3	2.33333	X
d7_1.0	3	2.66667	X
d7_2.0	3	4.33333	X
d7_5.0	3	5.0	X

Anexo 2



Figura 1: Quinoa blanca.



Figura 2: Tamizado de quinoa blanca



Figura 3: Quinoa blanca después de ser tamizada



Figura 4: Quinoa roja.



Figura 5: Tamizado de quinoa roja.



Figura 6: Percoladores artesanales para la obtención de extractos hidroalcohólicos de quinoa roja y blanca.



Figura 7: Extracto hidroalcohólico de quinua roja y blanca en el rotavapor.

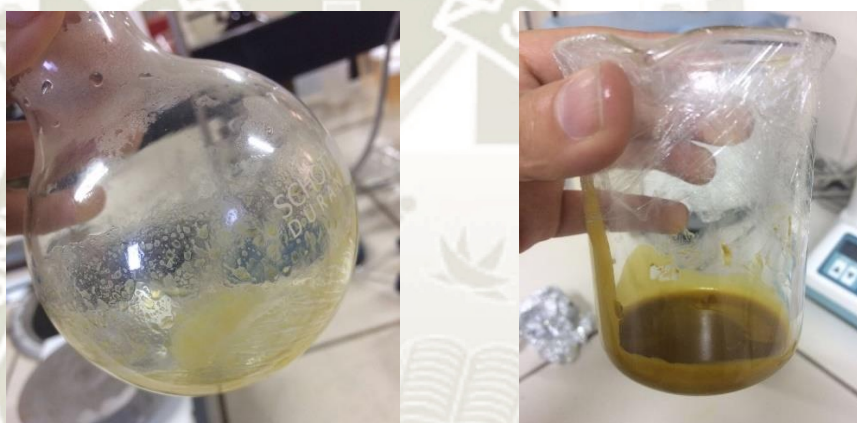


Figura 8: Extractos obtenidos después de pasar por el rotavapor,



Figura 9: Extractos de quinua blanca, roja y estándar se saponina para su cromatografía.

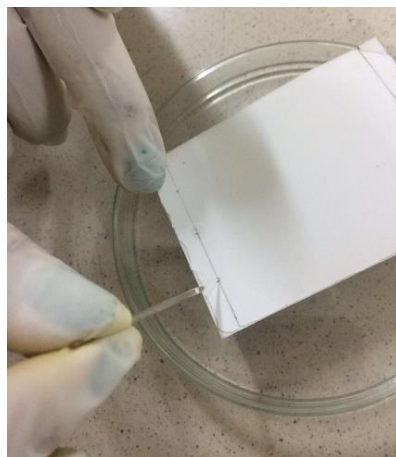


Figura 10: Cromatografía, sembrado de extractos de mojuelo de quinua roja y blanca y estándar de saponinas en la placa de sílica gel.

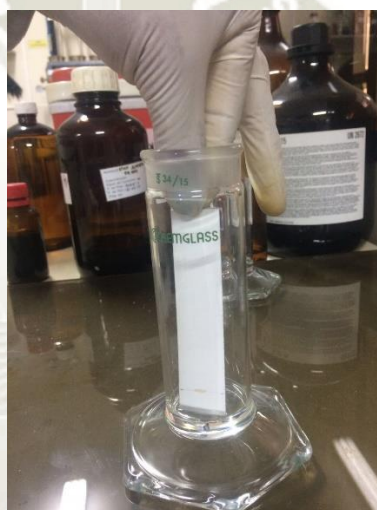


Figura 11: Revelado de la placa cromatográfica con el revelador vainillina-ácido sulfúrico.



Figura 12: Espectrofotometría, preparación de las soluciones madres de quinua blanca y roja.

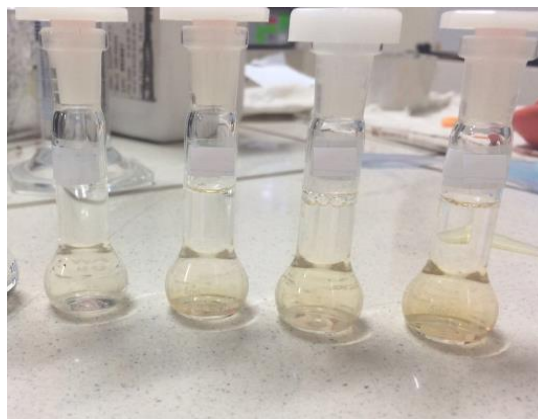


Figura 13: Preparación de los estándares para la curva de calibración.



Figura 14: Espectrofotómetro UV/VIS Shimadzu UV 1700 para la cuantificación de saponinas.



Figura 15: Obtención de caracoles del Fundo la Católica-Majes.



Figura 16: Elaboración de ecosistemas artificiales: 1 Control y 4 tratamientos.



Figura 17: Adición de tierra a los ecosistemas artificiales.



Figura 18: Colocación de ramas de limón en cada tratamiento.



Figura 19: Adición de 5 caracoles por cada tratamiento.



Figura 20: Aspersión del biomolusquicida formulado en cada ecosistema.



Figura 21: Adición de mayas en los ecosistemas para cada tratamiento.