

ESTUDO CROMATOGRÁFICO DAS SAPONINAS DA QUINUA (Chenopodium

quinoa Willd., Variedade Kancolla)

Por

Walter Augusto Ruiz

Químico

Tese apresentada para obtenção
do título de Mestre em
Ciências de Alimentos

Dr. Jaime Amaya-Farfan

Orientador

Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola
Universidade Estadual de Campinas

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À:

Elena, José, Alicia,

Marlene e Fredy.

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seu reconhecido e sinceros agradecimentos a:

Professor Dr. Jaime Amaya-Farfan pela orientação, ensinamentos e amizade.

À Organização dos Estados Americanos pelo apoio econômico.

Aos Eng^o Miguel Fort B., Adolfo Chang W. e Sra. Violeta Díaz de N. do Instituto de Investigaciones Agro-Industriales, Lima, Peru.

Ao Dr. Jack Kernan do Saskatchewan Research Council, Saskatchewan, Canada, pela cessão do ácido oleanólico.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola pelas facilidades concedidas para a execução do trabalho.

A Gilberto e Isabel Giassetti por sua valiosa colaboração.

À Eliana Badiale por sua ajuda e estímulo.

Ao pessoal dos laboratórios de Nutrição e Análise de Alimentos por sua valiosa ajuda e colaboração.

Ao Sr. Henrique Moura e família por sua imensa bondade e afeto.

À meus demais colegas e amigos.

INDICE

	Página
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. A quinua.....	3
2.1.1. Classificação botânica.....	3
2.1.2. Dados agronômicos.....	4
2.1.3. Propriedades nutricionais.....	5
2.1.4. Aspectos tecnológicos.....	9
2.1.4.1. Usos.....	9
2.1.4.2. Eliminação das saponinas.....	10
2.2. As saponinas.....	11
2.2.1. Conceitos gerais.....	11
2.2.2. Composição química e classificação.....	13
2.2.3. Propriedades.....	16
2.2.3.1. Físicas.....	16
2.2.3.2. Químicas.....	17
2.2.3.3. Biológicas.....	17
2.2.4. Métodos de dosagem.....	18
2.2.4.1. Físicos.....	18
2.2.4.2. Químicos.....	18
2.2.4.3. Biológicos.....	20

2.2.5. Métodos de extração e purificação.....	21
2.2.5.1. Físicos.....	21
2.2.5.2. Químicos.....	22
2.2.6. Determinação das estruturas.....	22
2.2.7. Utilidade prática de algumas saponinas.....	24
3. Material e Métodos.....	25
3.1. Fornecimento e armazenamento da quinua.....	25
3.2. Composição centesimal.....	25
3.3. Métodos tentativos para a determinação qualitativa das saponinas.....	26
3.3.1. Determinação por afrosimetria ou medida da espuma.....	26
3.3.2. Hemólise no tubo e determinação espectrofotométrica.....	26
3.3.3. Determinação colorimétrica.....	27
3.3.4. Determinação por cromatografia em camada delgada.....	28
3.4. Procedimento analítico para a determinação das saponinas.....	31
3.4.1. Preparo das amostras.....	31
3.4.2. Extração.....	31
3.4.2.1. Extração aquosa.....	31
3.4.2.2. Extração com gradiente de etanol-1-butanol-água.....	31
3.4.3. Concentração.....	32
3.4.4. Detecção das saponinas.....	32

3.4.5. Purificação preliminar.....	33
3.4.6. Fracionamento cromatográfico.....	34
3.4.7. Hidrólise.....	37
3.4.8. Extração das sapogeninas.....	38
3.4.9. Detecção das sapogeninas.....	38
3.4.10. Derivados das sapogeninas.....	40
3.4.10.1. Trimetilsilil derivados.....	40
3.4.10.2. Trifluoroacetil derivados.....	41
3.4.11. Cromatografia gás-líquida.....	42
3.4.12. Determinação quantitativa.....	46
3.5. Detecção dos carboidratos.....	46
3.5.1. Teste de antrona.....	46
3.5.2. Teste de Molish.....	47
3.6. Métodos gás-cromatográficos para determinação dos TMS-derivados das sapogeninas da quinua.....	47
3.6.1. Cromatográfico de Kernan et al.....	47
3.6.2. Cromatográficos desenvolvidos neste traba <u>l</u> <u>h</u> o.....	48
3.6.2.1. Com tratamento alcalino e extra- ção butanólica a pH 4.....	49
3.6.2.2. Com extração por gradiente de etanol-1-butanol-água.....	50
3.6.2.3. Com extração por gradiente de etanol-1-butanol-água e sem tratamento com bicarbonato de sódio.....	50

	Página
4. Resultados e Discussão.....	53
4.1. Composição centesimal.....	53
4.2. Procedimento analítico para a determinação das saponinas.....	53
4.2.1. Extração.....	53
4.2.2. Detecção das saponinas por vários métodos...	55
4.2.2.1. Afrosimetria ou medida da espuma...	55
4.2.2.2. Hemólise.....	56
4.2.2.3. Espectrofotometria ultravioleta-visível.....	58
4.2.2.4. Cromatografia em camada delgada,...	63
4.2.3. Fracionamento.....	76
4.2.4. Hidrólise das saponinas e extração das sapogeninas.....	85
4.2.5. Detecção das sapogeninas por cromatografia em camada delgada.....	88
4.2.6. Cromatografia gás-líquida dos derivados das sapogeninas.....	92
4.3. Teste qualitativo para carboidratos.....	107
4.4. Determinação da curva-padrão do trimetilsilil (TMS) derivado do ácido oleanólico (AO).....	109
4.5. Avaliação de métodos gás-cromatográficos para a dosagem do AO em grãos de quinua-kancolla.....	111
5. Conclusões.....	118
6. Bibliografia.....	120

ÍNDICE DE TABELAS

Página

TABELA 1.

Comparação do conteúdo de aminoácidos entre quatro variedades de cereais, cinco proteínas animais e quinua..... 8

TABELA 2.

Condições gás-cromatográficas com as quais se obtiveram os melhores resultados dos derivados trimetil sililados das sapogeninas em coluna de 3% SE-30..... 43

TABELA 3.

Condições gás-cromatográficas com as quais se obtiveram os melhores resultados dos derivados trimetil sililados das sapogeninas em coluna 3% OV-17..... 44

TABELA 4.

Composição centesimal da quinua-kancolla..... 53

TABELA 5.

Teste qualitativo da produção de espuma pelas frações ou extratos apresentados no Diagrama 1..... 55

TABELA 6.

Teste qualitativo da hemólise para as diversas frações extraídas da quinua..... 57

TABELA 7.

Solubilidade e coloração das frações definidas no Diagrama 1 para o teste espectrofotométrico de Liebermann-Burchard.. 60

TABELA 8.

Concentrações, máximas de absorção, absorbâncias e coeficientes de extinção das frações definidas no Diagrama 1 para o teste Liebermann-Burchard, à 4 horas de reação..... 61

TABELA 9.

Valores de R_f dos componentes desenvolvidos no sistema I (1-butanol-etanol-água, 7:2:4)..... 65

TABELA 10.

Valores de R_f dos componentes desenvolvidos no sistema II (1-butanol-etanol-água, 1:1:1)..... 66

TABELA 11.

Valores de R_f dos componentes desenvolvidos no sistema III (1-butanol-etanol-amônia 25%, 7:2:5)..... 67

TABELA 12.

Valores de R_f dos componentes desenvolvidos no sistema IV (1-butanol-piridina-água, 6:4:3)..... 68

TABELA 13.

Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema V
(clorofórmio-metanol-água, 65:35:8)..... 69

TABELA 14.

Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema VI
(clorofórmio-acetato de etila-metanol, 4:2:1)..... 70

TABELA 15.

Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema VII
(benzeno-acetona-metanol, 5:5:1)..... 71

TABELA 16.

Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema VIII
(hexana-clorofórmio-acetato de etila, 5:1:1)..... 72

TABELA 17.

Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema IX
(benzeno-clorofórmio-acetona, 4:2:1)..... 73

TABELA 18.

Comparação dos resultados obtidos com os métodos tentativos
para a detecção das saponinas da quinua..... 74

TABELA 19.

Distribuição e concentrações relativas dos componentes das frações da SBM, demonstradas por cromatografia em camada delgada; revelador: Liebermann-Burchard..... 77

TABELA 20.

Distribuição e concentrações relativas dos componentes das frações do extrato P₂₈, demonstradas por cromatografia em camada delgada; revelador: Liebermann-Burchard..... 78

TABELA 21.

Distribuição e concentrações relativas dos componentes das frações da SBM detectadas por cromatografia em camada delgada; revelador: sangue-gelatina..... 79

TABELA 22.

Distribuição e concentrações relativas dos componentes das frações do extrato P₂₈, demonstradas por cromatografia em camada delgada; revelador: sangue-gelatina..... 80

TABELA 23.

Distribuição e concentrações relativas dos componentes das sub-frações da fração E, demonstradas por cromatografia em camada delgada; revelador: Liebermann-Burchard..... 81

TABELA 24.

Distribuição e concentrações relativas dos componentes das sub-frações da fração E, demonstradas por cromatografia em camada delgada, revelador: sangue-gelatina..... 82

TABELA 25.

Pesos das frações e do padrão digitonina usados na hidrólise e peso e porcentagem de suas respectivas interfases II.. 87

TABELA 26.

Cromatografia em camada delgada dos componentes aglucônicos dos hidrolisados das frações da SBM..... 89

TABELA 27.

Cromatografia em camada delgada dos componentes aglucônicos das sub-frações E..... 90

TABELA 28.

Identificação dos cromatogramas dos trimetilsilil derivados (TMS), apresentados nas figuras 2 até 12..... 93

TABELA 29.

Concentrações relativas dos açúcares supostamente liberados durante a hidrólise das saponinas..... 108

TABELA 30.

Níveis de ácido oleanólico (AO) e porcentagem inferida de saponinas da quinua-Kancolla, segundo quatro procedimentos de extração	111
--	-----

ÍNDICE DE DIAGRAMAS E FIGURAS

	Página
DIAGRAMA 1.	
Extração das saponinas dos grãos da quinua e sua purificação preliminar.....	35
DIAGRAMA 2.	
Extração das sapogeninas da quinua.....	39
DIAGRAMA 3.	
Gás-cromatografia dos derivados das sapogeninas da quinua...	45
DIAGRAMA 4.	
Métodos para a determinação de ácido oleanólico na quinua, variedade Kancolla.....	52
FIGURA 1.	
Espectros ultravioleta-visível dos extratos P ₂₈ , E ₄₄ , E ₄₅ e SBM na reação colorimétrica de Liebermann-Burchard.....	62
FIGURA 2.	
Cromatograma 1: Derivados TMS do AO, 3% SE-30, 285°C.....	94
FIGURA 3.	
Cromatograma 2: Derivados TMS do P ₂₈ , 3% SE-30, 285°C.....	95
FIGURA 4.	
Cromatograma 3; Mistura de derivados TMS de AO e P ₂₈ , 3% SE-30, 285°C.....	96

FIGURA 5.

Cromatograma 4: Derivados TMS do AO, 3% OV-17, 220^o-
275^oC..... 97

FIGURA 6.

Cromatograma 5: Derivados TMS do P₂₈, 3% OV-17, 220^o-
275^oC..... 98

FIGURA 7.

Cromatograma 6: Derivados TMS da interfase II do P₂₈
3% OV-17, 200^o-275^oC..... 99

FIGURA 8.

Cromatograma 7: Derivados TMS da E₃, 3% OV-17, 220^o-
275^oC..... 100

FIGURA 9.

Cromatograma 8: Derivados TMS da E₉, 3% OV-17, 220^o-
275^oC..... 101

FIGURA 10.

Cromatograma 9: Derivados TMS da E₁₀, 3% OV-17, 220^o-
275^oC..... 102

FIGURA 11.

Cromatograma 10: Derivados TMS da SBM, 3% OV-17, 220^o-
275^oC..... 103

FIGURA 12.

Cromatograma 11: Derivados TMS da digitonina (extrato "sapogeninas"), 3% OV-17, 220^o-275^oC..... 104

FIGURA 13.

Linha de regressão gerada pelas concentrações de AO e as áreas dos picos cromatográficos (curva-padrão)..... 110

FIGURA 14.

Cromatograma 12: Derivados TMS do extrato sapogeninas da quinua, obtido com o método K₁, 3% SE-30, 285^oC..... 115

FIGURA 15.

Cromatograma 13: Derivados TMS do extrato sapogeninas da quinua, obtido com o método W₁, 3% SE-30, 285^oC..... 116

FIGURA 16.

Cromatograma 14: Derivados TMS do extrato sapogeninas da quinua, obtido com o método W₂, 3% SE-30, 285^oC..... 117

RESUMO

As saponinas da quinua (Chenopodium quinoa, Willd.; variedade de Kancolla) foram submetidas a um estudo que compreendeu extração, detecção, purificação parcial, hidrólise e determinação do ácido oleanólico nas suas sapogeninas.

Dos vários processos de extração testados, foi selecionado um que consiste de duas etapas: extração das sementes desengorduradas, primeiro com gradiente de etanol-butanol-água e depois com água a pH 4 sendo este extrato aquoso, posteriormente, submetido a partição com butanol. Tal processo forneceu 5,53% de extrato bruto de saponinas.

A presença de saponinas numa série de extratos foi verificada mediante os seguintes métodos: medição da espuma (afrosimetria), hemólise in vitro e camada delgada, usando os reagentes Liebermann-Burchard, sangue-gelatina e outros. Embora alguns destes métodos sejam de emprego comum na determinação industrial das saponinas da quinua, os nossos resultados indicaram que, como critério único, tais testes são inapropriados para determinações quantitativas ou ainda qualitativas, devido a sua inespecificidade.

O extrato de maior teor de saponosídeos (P₂₈) foi semi-purificado em coluna de sílica gel com o solvente clorofórmio-metanol-água (65:35:8), obtendo-se, pelos menos, uma fração representativa das saponinas na base dos resultados da cromatografia em camada delgada. Tanto o extrato P₂₈ como as suas frações semi-purificadas

foram submetidos à hidrólise com ácido sulfúrico em dioxano a 50% para posterior estudo das sapogeninas.

Separação gás-cromatográfica dos derivados trimetilsililados dos produtos menos polares da hidrólise indicou que as saponinas da quinua Kancolla podem conter até dez sapogeninas, sendo que o ácido oleanólico perfaz 79,5% (estimativa obtida por normalização interna) das geninas presentes no extrato P₂₈.

Conclui-se que, dentro das limitações do método cromatográfico, as saponinas desta variedade de quinua poderiam ser classificadas como triterpenóides, sendo que o conteúdo de ácido oleanólico dos extratos teria possível aplicação na dosagem de saponinas da quinua e seus produtos.

SUMMARY

For the present study, the saponins of quinoa (Chenopodium quinoa, Willd.; Kancolla variety) grains were extracted, subjected to various detection tests, partly purified, hydrolyzed and assessed with regard to the oleanolic acid content.

From the several methods of extraction tested, one was selected which included: first a step-wise reflux operation with mixtures of ethanol-n-butanol-water, and then water extraction at pH 4 followed by partition of the latter solution with n-butanol. Such process afforded a yield of crude extract of 5,53%.

The presence of saponins in all extracts was monitored by using methods such as foam measurement, (n-vitro hemolytic power, as well as by thin-layer chromatography in conjunction with the Liebermann-Burchard and blood-gelatin indicators. Although most of these procedures are often employed in the determination of quinoa saponis by industry, results suggest that on an individual bases, such tests are not adequate for quantitative or even qualitative determinations due to the lack of specificity.

The extract exhibiting the most saponin character (P₂₈) was partly purified on a silica-gel column using a mixture of chloroform-methanol-water (65:35:8) as eluent. The extract itself and several of the semi-purified fractions were hydrolyzed with sulfuric acid in 50% dioxane for further study of the constituting sapogenins.

Gas-chromatographic separations of the trimethylsilylated ,

less-polar products of the hydrolysis reaction on P₂₈ indicated that the Kancolla quinoa saponins may contain as many as ten different sapogenins. By internal normalization of the chromatograms, oleanolic acid was estimated to be 79.5% of the total genins in this extract.

Within the limitations inherent to the chromatographic method, it was concluded that the saponins of this quinoa variety could be classified as of the triterpene type.

Moreover, direct determination by gas-liquid chromatography of the oleanolic acid or, alternatively, of the total sapogenin content could be used as an indicator of the saponin level in quinoa and its products.

1. INTRODUÇÃO

Por séculos, a quinua (Chenopodium quinoa, Willd.) tem sido aproveitada pelo habitante dos Andes tanto por sua qualidade nutricional como pelo fato da planta crescer sob condições de temperatura e umidade excepcionalmente baixas. Hoje, sabe-se que a proteína desta semente possui propriedades nutritivas excelentes, sendo sua qualidade superior à da maioria das leguminosas e cereais consumidos pelo homem.

A utilização da quinua em grande escala porém, está limitada principalmente pela presença de substâncias naturais chamadas saponinas que são consideradas prejudiciais, em virtude do característico sabor amargo que conferem ao grão além de serem apontadas como compostos antinutricionais.

Desde a época pré-incaica, o processamento da quinua foi iniciado com uma lavagem de cerca de 48 horas para remoção do sabor amargo. Atualmente, existe um grande interesse no desenvolvimento de novas técnicas de processamento que exigem um método confiável e rápido, ainda inexistente, para o controle desses compostos.

As saponinas, compostos largamente distribuídos no reino vegetal, estão classificadas em triterpênicas e esteroidais, dependendo do fato de a parte hidrofóbica da molécula ser um ácido triterpênico ou um ácido esteroidal.

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar os métodos existentes para determinar saponinas

na quinua, variedade Kancolla;

2. Extrair e purificar parcialmente as saponias, e

3. Selecionar um procedimento gás-cromatográfico de possí
vel aplicação na dosagem de saponinas da quinua.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A QUINUA

2.1.1. Classificação Botânica

Sua classificação botânica apareceu pela primeira vez em 1798 em "Species Plantarum" como Chenopodium quinoa Willd. (141); classificação feita por Luis Christian Willdenow (98) sobre material procedente do Chile (141).

Pertence ao gênero Chenopodium que inclui aproximadamente sessenta espécies (65). É uma planta herbácea, anual, de mais de um metro de altura, cuja cor pode variar desde o verde até o púrpura, de folhas alternadas e pecioladas. A inflorescência é uma espiga de flores hermafroditas (98).

O fruto é um aquênio composto de grãos discóides, pequenos, esbranquiçados, de 2 a 2,5 mm de diâmetro com embrião anular de 1,2 a 1,6 mm de largura (98, 90). Fazendo-se um corte transversal do fruto pode-se observar, entre outros, um espórito jovem e parcialmente desenvolvido com a presença de dois cotilédones (34).

Esta planta pode ser encontrada em regiões que abrangem desde o Canadá até o sul do Chile, tomando nomes diferentes como quinoa ou quinoa no Peru, Argentina, Bolívia e Chile; na Colômbia é conhecido como suba (65) e, no Brasil, como arroz miúdo do Perú (92).

2.1.2. Dados Agronômicos

A quinua é uma cultura que faz parte do ecossistema andino e por isso é cultivado pelos camponeses das altas regiões dos Andes desde a época do Império Inca (19). Mas não deixa de se adaptar a outras altitudes e latitudes; assim amostras provenientes da Bolívia foram semeadas pelo Instituto Agronômico de Campinas, S.P, Brasil, com crescimento e produção satisfatórias (62, 113); amostras procedentes do Peru cresceram com muito sucesso no Quênia, África (39). Na Alemanha, a quinua é cultivada como planta alimentícia (86).

É uma espécie que resiste bem às secas, dando bons rendimentos com apenas 300 mm de precipitação anual; adapta-se muito bem a diversos solos, preferindo os ricos em limo, potássio e magnésio (36).

Entre as principais vantagens agronômicas pelas quais a quinua é de interesse econômico está o fato de ela crescer e apresentar excelente produção em solos considerados inaproveitáveis para o trigo (65), representando uma grande esperança em termos socio-econômicos para os povos que a produzem (8).

Sua cultura tem maior expressão no "altiplano" de Puno, Peru (65, 133, 114); apesar de ter apresentado uma diminuição de hectares cultivados de 16.370 para 15.000 em 1976, sua produção nessa região passou de 7.307 T.M. em 1970 para 8.065 T.M. em 1976 com tecnologia média tradicional, com um rendimento de 500-1000 kg/ha, tendo um investimento global de 12.159,22 soles/ha no período 76-77 (114).

Apesar de, na atualidade, se conhecerem mais de quarenta variedades de quinua (8), as mais difundidas por seu rendimento e cultura, segundo Mujica (94), são:

Sajama: de origem boliviana, de ciclo vegetativo precoce (cento e cinquenta dias), de alto rendimento, grão branco e grande, relativamente livre de saponina solúvel.

Kancolla: de origem peruana (Puno), de ciclo vegetativo longo, grão branco e médio, com alto teor de saponina solúvel, considerada a variedade de maior cultivo.

Blanca de Juli: de origem peruana (Puno), de período semi-longo e bom rendimento, com pouca saponina solúvel.

Chewca: de origem peruana (Puno), com rendimento regular e quase nenhum teor de saponina solúvel.

Witulla: de origem peruana (Puno), período vegetativo longo, com rendimento regular e alto teor de saponina solúvel.

2.1.3. Propriedades Nutricionais

Das análises de dezoito linhagens de quinua, estabeleceu-se que o conteúdo protéico pode variar de 10,85 a 19,25% e que o valor calórico médio para a farinha integral é de 350 cal/100 g, sendo que o amido se concentra no perisperma do grão, embora, na maioria dos cereais, esteja localizado no endosperma (18).

O conteúdo de vitaminas da semente é comparável ao dos ver

dadeiros cereais; por exemplo, possui 9,6 mg/100 g de niacina (36), alto conteúdo de vitamina E (16) e pequena quantidade de vitamina C, a qual provavelmente sofre oxidações durante o período de armazenamento (16).

Existem muitos trabalhos que fornecem a composição do grão da quinua. Entre esses podemos citar a proposta de Wu (150):

Umidade	11.0%		
Proteína (N x 6,25)	12,3 g/100g de porção comestível		
Gorduras	6,1	"	"
Hidratos de carbono	67,7	"	"
Fibra	4,6	"	"
Cinzas	2,9	"	"
Cálcio	112 mg/	"	"
Fósforo	286 mg/	"	"
Ferro	7,5 ug/	"	"
Tiamina	0,36mg/	"	"
Riboflavina	0,42	"	"
Ácido ascórbico	3,00	"	"

A quinua possui alto valor nutritivo que se deve ao fato de ela armazenar 70 a 80% de nitrogênio no embrião, órgão que possui as proteínas de maior valor biológico do grão, enquanto que o trigo contém de 2 a 4% do nitrogênio total da semente no embrião (18).

O valor nutritivo da proteína da quinua depende do tratamento ou preparo do grão. Assim o valor de PER da proteína de quinua

Sajama lavada, crua, foi 29% inferior ao da caseína enquanto que, após a cocção, o peso ganho dos animais que a consumiram aumentou 100% e o valor de PER foi igual ao da caseína (87).

Os aminoácidos essenciais compreendem 37% da proteína total (143). Em virtude de sua composição química geral, de seu perfil de aminoácidos essenciais (146, 29) e de seu valor biológico no crescimento de ratos, a proteína da quinua foi favoravelmente comparada à do leite desnatado (146, 90) levando vantagem sobre a proteína do trigo (143, 29).

Comparando-se a quantidade dos aminoácidos da proteína da quinua com a de quatro cereais e a de cinco proteínas animais, quanto à porcentagem de suas proteínas (19), conclui-se que a proteína da quinua fornece todos os aminoácidos essenciais para o crescimento, apresentando um bom balanço que se aproxima muito do ovo. Através das provas que se efetuaram em ratas, frangos, porcos, coelhos, perus e duas espécies de ruminantes (não citadas pelo autor), constatou-se que a quinua apresentou uma eficiência maior ou igual à do leite, porém inferior à da farinha de sangue (ver tabela 1).

Estes resultados estão de acordo com os de outros autores (3, 143, 146).

Para que a proteína da quinua alcance o máximo valor biológico, é necessário antes lavar o grão, retirando dessa forma algumas substâncias consideradas antinutricionais. Assim, no caso de quinua lavada, os valores de PER e NEG em ratos foram respectivamente 29 e 40% maiores, com um peso ganho 100% maior do que no da quinua não lavada (87). A quinua já foi utilizada para complementação de outras farinhas com bons resultados. Por exemplo, uma mis

TABELA 1. Comparação do conteúdo de aminoácidos das proteínas de quatro variedades de cereais, cinco proteínas animais e a proteína da quinua.

	VEGETAIS					ANIMAIS				
	Quinua	Trigo	Milho	Cevada	Aveia	Ovo	Farinha de Carne	Farinha de Sangue	Solúveis Dessecados de peixe	Leite em pó Desidratado
Arginina	3,9	3,7	4,5	4,6	5,8	6,4	4,0	3,6	3,9	1,2
Fenilalanina	4,7	5,6	4,5	4,8	6,2	6,3	2,0	6,1	2,6	1,5
Histidina	3,9	1,3	2,5	1,4	1,9	2,1	1,2	5,3	1,5	0,9
Isoleucina	6,5	4,1	4,5	4,1	5,7	8,0	2,0	1,2	3,6	2,3
Leucina	5,8	5,8	10,6	6,6	8,2	9,2	3,7	11,6	5,1	3,3
Lisina	6,4	2,8	2,5	3,1	3,2	7,2	4,1	9,0	6,4	2,8
Metionina	2,5	0,9	1,3	1,3	1,5	4,1	0,9	1,1	1,8	0,8
Treonina	4,7	0,8	3,4	3,0	3,3	4,9	1,9	4,0	2,8	1,4
Triptofano	0,9	0,9	0,9	0,9	1,2	1,5	0,3	1,1	0,7	0,4
Valina	4,5	4,6	3,8	4,9	5,7	7,3	2,8	7,9	3,5	2,2

FONTE: referência bibliográfica 19.

tura de 40% de quinua e 60% de *Lupinus Mutabilis* forneceu um PER superior ao da caseína (65), assim como uma mistura de 20% de quinua e 80% de trigo melhora o valor de PER do trigo em 72% (87).

Nos países onde é cultivada, a quinua é utilizada como sucedâneo do trigo e seu uso mais comum é o de extensor na elaboração dos produtos tradicionais de trigo, sendo necessária uma lavagem prévia com água de cal para retirar o sabor amargo (90).

Cabe ressaltar que os trabalhos feitos em frangos (99), frangos e porcos (20), nos quais se verificou que a quinua sem lavagem ou mal lavada apresentava grandes desvantagens no crescimento, não provaram que o agente causador da redução de peso e até da morte de alguns dos animais fosse as saponinas, embora os autores tenham mencionado tal implicação.

2.1.4. Aspectos Tecnológicos

2.1.4.1. Usos

Embora algumas das dificuldades tecnológicas na industrialização da quinua não tenham sido ainda superadas, seu emprego a nível doméstico e semi-industrial é muito versátil, podendo ser empregada em combinação com carne, peixe, doces, pastas (65), ou simplesmente como cereal (21).

Entre os produtos já elaborados e testados a nível de indústria média, pode-se mencionar: "o creme de quinua", produto da quinua lavada, torrada e moída que, com o tempo de estocagem, reapresentou sabor amargo (8), o "instant postum", obtido da farinha de quinua lavada e mel de abelha usado como substituto do café (29) e

a "peruvita", outro produto em base de farinha de quinua lavada, que por seu sabor amargo não teve sucesso (8). Na Bolívia o governo já autorizou uma suplementação da farinha de trigo com 5% de farinha de quinua (31) para a fabricação de pão.

A farinha de quinua tem sido testada numa grande variedade de aplicações em laboratório e a nível de planta piloto, tais como na fabricação de massas alimentícias e bolachas em misturas de até 70% (88, 111). Um produto de boas propriedades funcionais obtido por extrusão e expansão de quinua lavada já foi reportado (115).

2.1.4.2. Eliminação das saponinas

Um dos grandes obstáculos à maior utilização da quinua é a presença de saponinas, que exige a aplicação de uma tecnologia relativamente custosa, o que por sua vez, promove o encarecimento do produto (8). Também entre os fatores que contribuem para esse lento desenvolvimento e o alto custo dos produtos está o tamanho pequeno do grão e a variabilidade na sua consistência. As saponinas podem ser encontradas no pericarpo do qual devem ser tiradas. Ao serem agitadas em água, surge grande quantidade de espuma, sendo que a eliminação da saponina deve ser um processo suficientemente rápido para evitar a sua difusão dentro do endosperma; os equipamentos são inexistentes e as tecnologias existentes não são funcionais e aplicáveis (65).

Não se demonstrou ainda que o gosto amargo das quinuas é causado pela presença das saponinas (86, 54); entretanto assinalou-se que as variedades amargas contêm teores mais elevados (3,4

até 3,9%), enquanto que as variedades denominadas "doces" possuem níveis bem baixos, não determinados, de saponinas (98).

Existe informação de que, em 1919, conseguiu-se o isolamento das saponinas ácidas e neutras da quinua (53), mas ainda não foi publicada nenhuma confirmação desse fato.

Segundo alguns autores (110, 132), os métodos mais usados na remoção das saponinas e do sabor amargo são a lavagem do grão com água, ou então com água e cal. Uma outra alternativa é lavar o grão com água a 70°C, com agitação concomitante, o que poderá eliminar as saponinas detectáveis por afrosimetria (134). Sabe-se também que as saponinas não são removidas pela simples extração dos grãos de quinua com éter etílico, etanol, ácido clorídrico diluído ou bicarbonato de sódio a 5% (86).

Para fins industriais, as saponinas e/ou sabor amargo são minimizados mediante vários processos, os quais basicamente incluem uma escarificação efetuada, seja antes ou depois de lavagem do grão (8, 12, 43).

Além disso, têm-se empregado algumas técnicas de moagem e até de melhoramento genético (100) para redução do teor das saponinas.

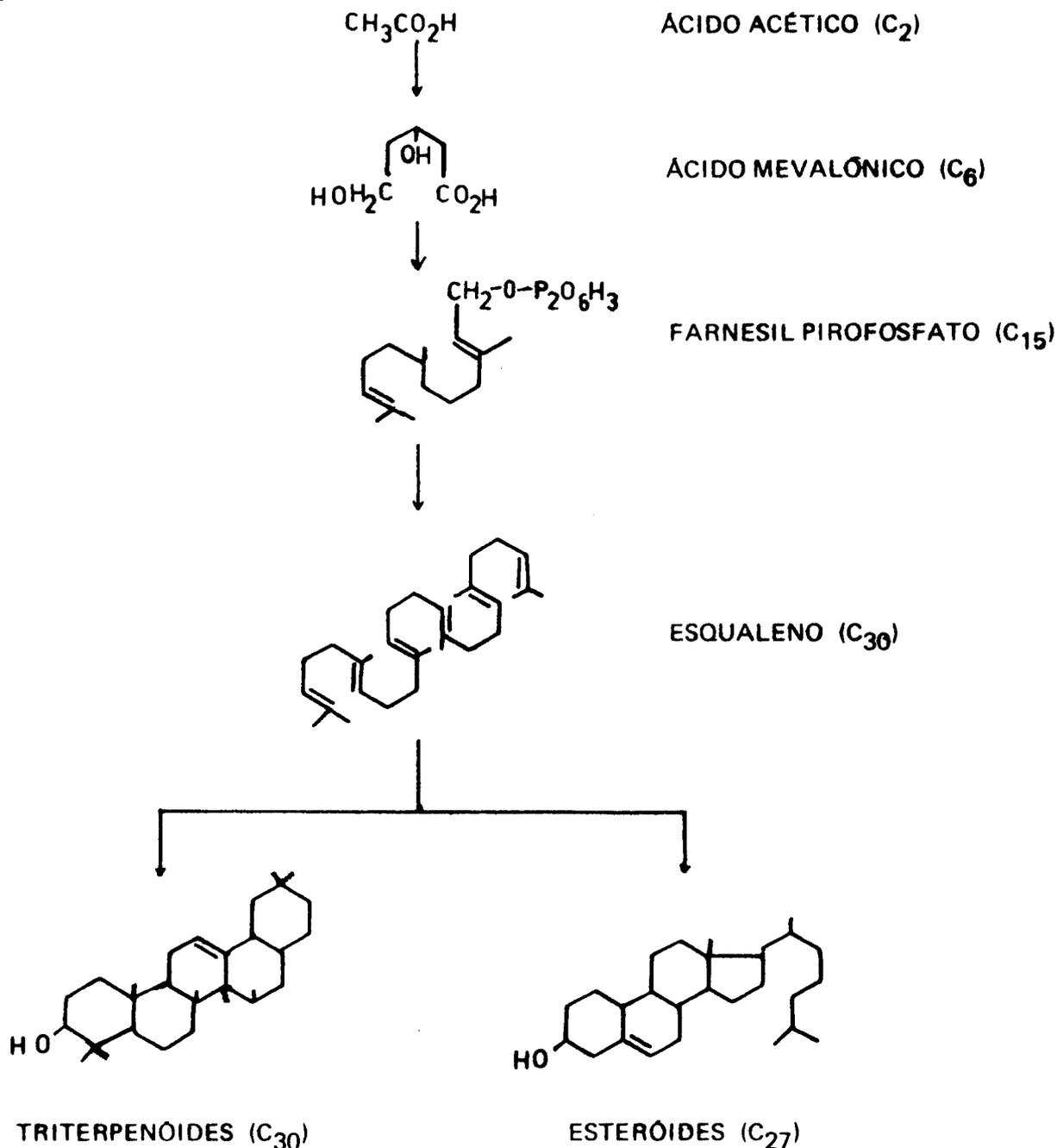
2.2. AS SAPONINAS

2.2.1. Conceitos Gerais

As saponinas ou saponósidos são glicósidos que pertencem ao grupo dos heterósidos. Seu nome provém do latim "sapon" (37) em virtude destes compostos formarem espuma abundante semelhante ao

sabão quando agitados em soluções aquosas (42). São produtos naturais amplamente distribuídos (11), principalmente no reino vegetal; assim têm-se reportado pelo menos quinhentos gêneros de plantas (142) e alguns gêneros do reino animal que também as possuem (104).

A biossíntese das saponinas recebeu considerável atenção, chegando-se a postular como via mais provável a seguinte (11):



Alguns dos vegetais que contribuem para a dieta alimentar contêm saponinas; entre os mais comuns temos: espinafre, beterraba, soja, alfafa, aspargos, tomates, batatas, chá, (68, 11). As saponinas aparecem também em plantas de uso medicinal, ornamental e outras (11).

2.2.2. Composição química e classificação

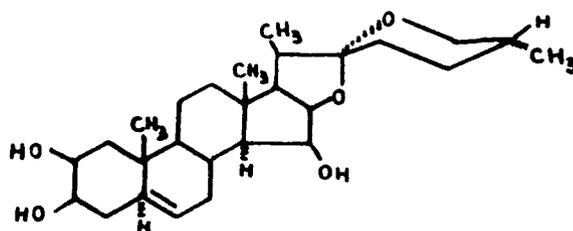
A hidrólise das saponinas conduz a seus respectivos componentes, demonstrando ser heterósidos de cadeias glicídicas formadas por pentoses e hexoses (arabinose, xilose, raminose, metilpentoses, glicose, galactose, frutose, mais frequentemente) e, possivelmente, certos ácidos urônicos (glucurônico e galacturônico em particular). Às vezes, algumas de suas funções hidroxilas podem ser encontradas esterificadas por ácidos alifáticos como fórmico, acético e tíglico (42); a outra parte do heterósido é conhecida como a aglicona ou sapogenina (11).

Na química das saponinas uma das partes de maior interesse é a análise das sapogeninas, embora sua liberação geralmente requiera condições drásticas como hidrólise ácida ou alcalina, com aquecimento por várias horas, podendo originar produtos de degradação das saponinas ou heterósidos intermediários como pró-sapogeninas (153, 42). Portanto, para obter produtos genuínos da hidrólise, às vezes é recomendável o uso de saponases (56, 22) ou glicosidase (73), ou de métodos microbiológicos (153).

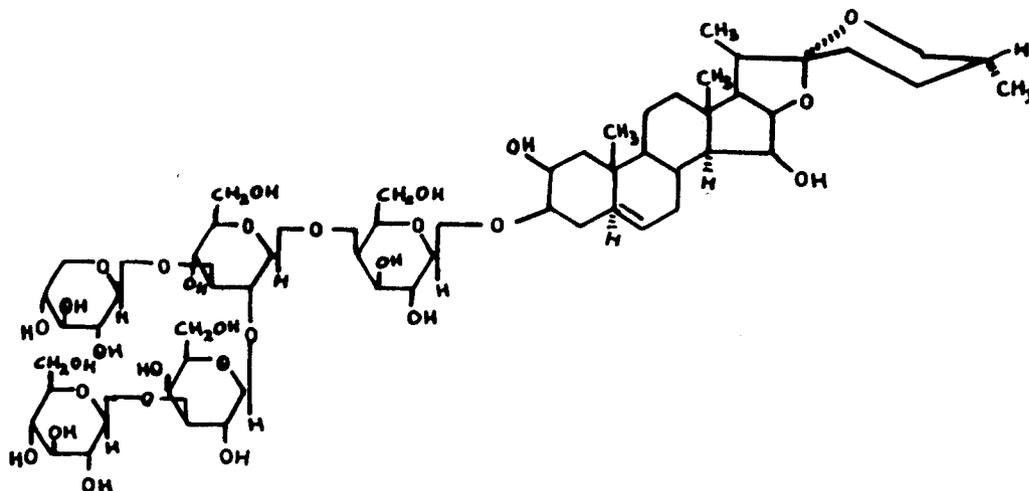
Para o esclarecimento da estrutura de uma sapogenina geralmente se usam os métodos de redução com selênio ou enxofre e aquecimento a 320°C (42). Os produtos resultantes destes tratamentos

foram identificados como 3'-metil-1,2-ciclopentenofenantreno ou o 1,2,7-trimetil naftaleno, (42). Baseando-se nestes compostos é que se classificam as sapogeninas em esteroidais (derivados do ciclo pentano fenântreno), e triterpênicas (derivado trimetil naftaleno ou sapotaleno) e, por sua vez, as saponinas que os contêm, em este roidais e triterpênicas (1, 10).

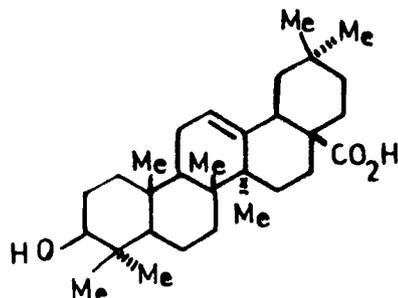
As sapogeninas esteroidais possuem um esqueleto espirocetal com 27 átomos de carbono e uma estrutura geral do espirostanos (42) como o da Digitogenina (147):



e se a hidroxila da posição 3 se esterifica com carboidratos, tem-se a saponina Digitonina (147):

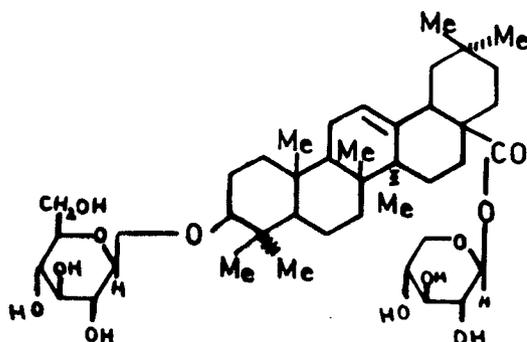


As saponinas triterpênicas possuem um esqueleto de anéis de trinta átomos de carbono, geralmente pentacíclicos, podendo-se encontrar até em quatro séries deles: a) série do oleanano (B-amirina), b) série do ursano (α -amirina), c) série do lupano ou hopano e d) outros tipos de esqueletos (135). Uma das sapogeninas mais encontradas e que faz parte da primeira série é o ácido oleanólico (42):

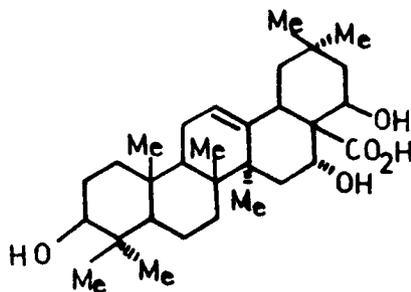


Existem duas revisões sobre saponinas triterpênicas que abrangem a bibliografia existente até 1974 (1, 10).

A estrutura de uma saponina triterpênica pode ser simples como no caso da saponina do E. bromelifolium D. (58):



ou complexa, como no caso de uma sapogenina do tipo ácido acácico, proveniente da samanina (145):



No reino vegetal as saponinas encontram-se distribuídas de tal forma que as esteroidais estão associadas com as plantas monocotiledôneas e as triterpênicas com as dicotiledôneas (37,68,142).

2.2.3. Propriedades

2.2.3.1. Físicas

Estes heterósidos se caracterizam por um conjunto de propriedades físicas. Assim, podem ser sólidos, brancos ou amarelados, geralmente amorfos; sua cristalização é muito difícil, podem ser dispersos na água e formam pseudo-soluções dificilmente dialisáveis (42).

As propriedades tais como poder emulsionante, capacidade de formação de espuma em soluções aquosas, permeabilidade das membranas, são devidas a alta tensão superficial de suas soluções aquosas. A solubilidade destes compostos aumenta em soluções diluídas de álcoois (etílico, metílico, butílico), particularmente quando são aquecidos (42).

2.2.3.2. Químicas

Em 1911 foi apresentada uma série de reagentes que poderiam reagir com estes compostos, mas não de uma forma específica (112). As saponinas podem ser parcialmente precipitadas em soluções de hidróxido de bário, hidróxido de magnésio, acetato básico e neutro de chumbo, ou serem saturadas com soluções aquosas de sais como cloreto de sódio, sulfato de amônia e sulfato de magnésio (42).

As características que têm sido estudadas do ponto de vista químico e físico-químico são as lipofílicas, as hidrofílicas tenso-ativas, a capacidade de migração em diferentes meios, a combinação com esteróides (colesterol), são atribuídas, de forma geral, à combinação da sapogenina, ao conteúdo de carboidratos presentes na molécula e às moléculas do substrato (11).

2.2.3.3. Biológicas

Em virtude de sua ação como detergentes e emulsificantes, estes compostos possuem atividade emolisante, são altamente tóxicos para peixes e animais anfíbios e produzem o temperanismo dos ruminantes (11). Outros autores já mencionaram que as saponinas tem propriedades antiinflamatórias (82), antibióticas (120, 149), anti-neoplásticas (108, 109) cardioestimulantes (125), anticoncepcionais (25, 28), estimulantes e inibidoras do crescimento (11, 24, 140, 138) e antinutricionais (26, 145, 148, 12). Mas a veracidade delas ainda deve ser testada.

A atividade hemolítica das saponinas da soja não é afetada pela autoclavagem a 15 lbs de pressão por 20 minutos (12). As sapo

pinas do P. ginseng inibem a oxidação dos ácidos graxos e estimulam a formação de lipídeos no fígado e no tecido adiposo, atuando na transferência dos ácidos graxos por todo o organismo do rato (64).

2.2.4. Métodos de Dosagem

2.2.4.1. Físicos

Birck (11) descreve amplamente os métodos empregados para a dosagem das saponinas quali ou quantitativamente, fazendo uso das propriedades tanto físicas como químicas ou biológicas.

Cabe mencionar que a produção de espuma (77) está entre as propriedades mais comumente empregadas para detectar as saponinas, mas o método está sujeito a consideráveis fontes de erro, tais como: a umidade relativa do meio, o tempo da passagem do ar para formar a espuma, tempo da solução (122), assim como a interferência de outros compostos que também produzem espuma.

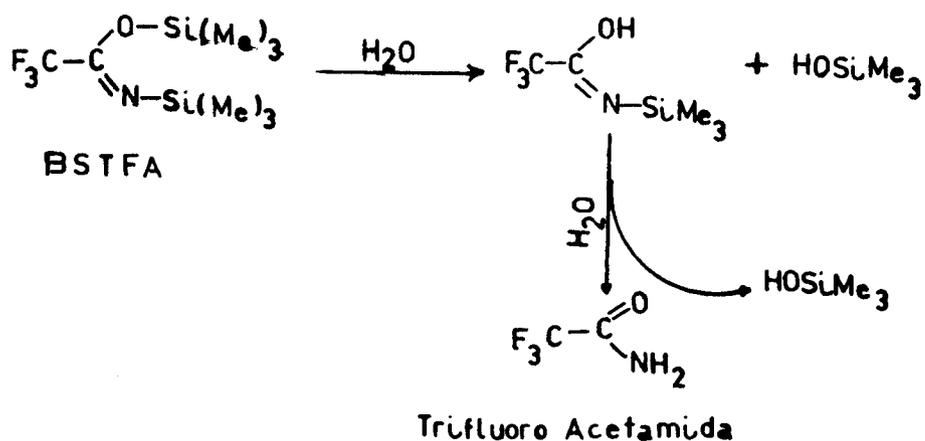
Os métodos espectrofotométricos são pouco usados, já que podem ser afetados pela presença de açúcares na solução (67); enquanto que os métodos de cromatografia em papel (119) e em camada delgada (2, 6, 123) são muito empregados, assim como a eletroforese (85).

2.2.4.2. Químicos

Em 1929 foi descrito um método de muito sucesso para a detecção das saponinas por meio da cromatografia em papel, com revelação mediante o reagente de sangue-gelatina (78), que até

hoje é usado amplamente (1). Mesmo assim os métodos de maior acei-
 tação são os de cromatografia em fase gasosa dos derivados trime-
 til sililados das saponinas (80, 118, 97, 44, 75, 48, 61, 23), ou
 dos derivados metilados das mesmas (106, 70). Neste sentido tem-se
 afirmado, inclusive, que o valor de água a 220°C pode servir como
 fase móvel, sem ter que derivar as sapogeninas (80).

Entre os reagentes de sililação que têm bom resultado está
 o N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA), pela volati-
 lidade de seu produto de reação e menor depósito de SiO₂ no detec-
 tor de ionização de chama, o que tende a minimizar o erro causado
 pela perda de sensibilidade do detector (129). Este reagente, co-
 mo todo reagente sililante, deve ser usado em condições anídras
 porque é sensível à água, podendo ser degradado da seguinte forma:



No entanto também são usados alguns métodos colorimétricos para detectar as saponinas, como o que utilizava o pentacloreto de antimônio sofre um filtro Millipore através do qual foi previamente filtrada uma solução com saponinas, sendo detectadas, em menos de dois minutos, em torno de 0,3 ppm de saponinas (55). O sudan III, dissolvido em álcool benzílico ou toluol, também foi usado para detectar saponinas, mas esse não parece ser um método de muito sucesso, já que seu próprio autor prefere o tradicional método hemolítico (145). Outro método colorimétrico que emprega o pentacloreto de antimônio é o de Siro, cuja reação ocorre em meio ácido, sendo que existem restrições quanto à naturezas das saponinas que reagem (72). A hemólise causada por saponinas foi testada espectrofotometricamente, dando-se curvas de absorção que obedecem à lei de Beer (63). Outro método colorimétrico ainda usado está baseado na reação de condensação das saponinas em ácido sulfúrico concentrado (96, 49, 57).

Existem vários métodos gravimétricos e mesmo infra-vermelhos aplicados nos derivados acetilados das saponinas ou sapogeninas que são de alguma utilidade, sendo necessária, porém, uma semipurificação prévia (144).

Os glicosídeos, a outra parte do heterósido, podem também ser determinados por diversos métodos, inclusive a cromatografia gasosa dos derivados trimetilsililados (5, 130) e servir para a dosagem das saponinas.

2.2.4.3. Biológicas

Entre as propriedades biológicas aproveitáveis, além da

toxicidade para peixes e anfíbios, está a propriedade de hemolizar as hemácias, a qual vem sendo usada desde a publicação do método em 1922 (77, 11), tanto para a determinação quali, como para a de terminação quantitativa das saponinas (1, 10, 11, 124).

Além disso tem-se empregado a propriedade que estes compos tos possuem de inibir o crescimento de bactérias ou fungos como a Trichoderma virides na sua determinação quantitativa (17, 84).

2.2.5. Métodos de extração e purificação

2.2.5.1. Físicos

O isolamento e purificação constituem um dos problemas mais difíceis a serem resolvidos no estudo das saponinas pela dificulda de de se separar os glicídeos, taninos, materiais corantes e ou tros que são extraídos simultaneamente com elas (42).

A maioria das técnicas reportadas para a extração baseiam-se nas propriedades de solubilidade e polaridade, razão pela qual se empregam solventes polares, como é o caso do sistema etanol + água em diferentes proporções (37, 6, 10). A solubilidade destes compostos aumenta com a temperatura; assim, a extração a quente sobre percolação contínua tipo soxhlet (37), o refluxo (42), a des tilação com vapor de água, a lavagem direta do grão com água a 70°C (134) e os gradientes de etanol-1-butanol-água (106, 131) sempre deram bons resultados.

Como técnicas de extração e purificação têm-se reportado a de cristalização (38), a da colheita da espuma (95); assim como as separações por cromatografia (1, 10, 11, 101, 102); por eletro

flotação (71) e por adsorção em carvão ativo (79, 142, 93). Finalmente são também conhecidas as partições com solventes aquosos e o abaixamento concomitante do pH até 4 ou 5, seguido da extração das saponinas triterpênicas com 1-butanol (11, 144).

2.2.5.2. Químicos

Depois da extração, uma técnica comum de purificação é a precipitação com éter etílico (9, 137), ou então a passagem através de colunas de carvão ativo ou de resinas de troca iônica (14, 126).

Existem outras técnicas que estão baseadas na transformação das saponinas. Entre as mais usadas está a da precipitação das saponinas na forma de derivados acetilados, ou da co-precipitação com tanino (37). Uma prática muito empregada para minimizar as inconveniências da purificação das saponinas, consiste primeiro na obtenção de um extrato bruto com solventes orgânicos, depois numa cromatografia de adsorção e, finalmente, na partição de seus derivados (37, 13, 9); optativamente pode-se fazer primeiro um tratamento alcalino e, posteriormente, uma derivação (69).

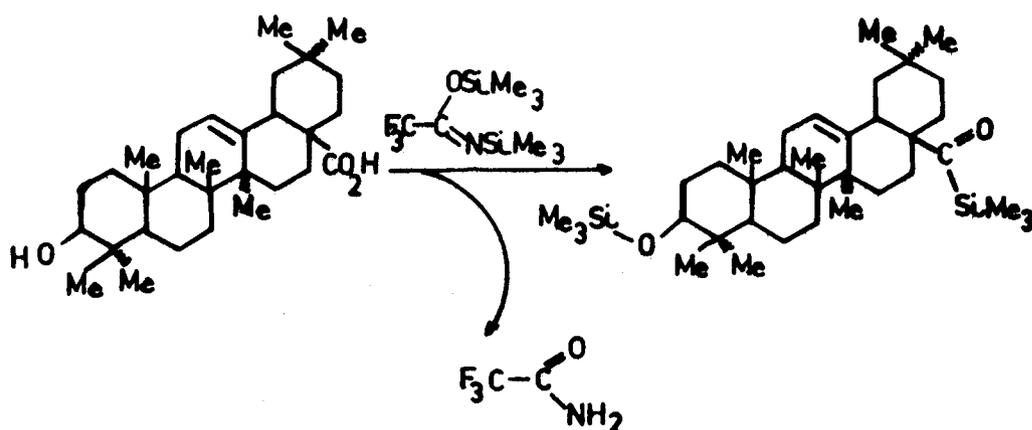
Outro método já usado para purificar saponinas, embora só tenha dado resultados satisfatórios para uma minoria delas, está baseado na precipitação do heterósido com o colesterol (51).

2.2.6. Determinação das estruturas

Existem duas formas gerais para o esclarecimento das estruturas das saponinas: as que tratam de identificá-las como tais me

diante o emprego de técnicas espectrofotométricas (73, 76, 103, 50), cromatográficas em papel e em camada delgada (60), ou as que liberam as sapogeninas de carboidratos para serem separadamente analisadas.

Para a identificação das sapogeninas ou dos carboidratos presentes nas porções glicosídicas, há técnicas que utilizam procedimentos químicos tradicionais ainda bastante em voga (105); técnicas de espectroscopia infravermelha (73, 30), de ressonância magnética nuclear do próton (151) e de ressonância magnética nuclear do carbono-13 (152, 151). Todavia as técnicas mais comuns são as de obter os derivados de trimetil-silila, as metil oximas ou metil ésteres das sapogeninas e depois submetê-los à análise pela cromatografia gasosa associada com a espectroscopia de massa (15, 23, 41, 52, 121); por exemplo, a trimetilsilil derivatização do ácido oleanólico, que é uma sapogenina triterpênica comum, pode ser (74):



Para a identificação dos carboidratos podem ser empregadas as técnicas químicas (5) ou as de gás cromatografia de seus trime
til silil derivados (130).

2.2.7. Utilidade prática de algumas saponinas

Parece que a maior utilidade destes compostos situa-se, até hoje, no campo farmacêutico (65, 89), sendo que em geral as saponinas possuem maior atividade que suas respectivas sapogeninas.

As sapogeninas esteroidais têm relevante importância na síntese de hormônios esteroidais como a progesterona, a desoxicorticosterona e a testosterona. Algumas sapogeninas como a aescina é usada diretamente no tratamento da arteroesclerose (11).

Tem-se reportado que as saponinas do gênero chenopodium podem ser usadas na fabricação de pinturas e detergentes (91).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. FORNECIMENTO E ARMAZENAMENTO DA QUINUA

A quinoa (Chenopodium quinoa, Willd.), variedade Kancolla foi fornecida pelo Instituto de Investigaciones Agro-Industriales, La Molina, Lima, Peru, no mês de Junho de 1977 e correspondeu à colheita de maio do mesmo ano.

O armazenamento foi feito em câmara de temperatura controlada a -20°C , sem nenhum tratamento prévio.

A variedade Kancolla foi escolhida para este estudo em razão de seu alto teor de saponinas, conforme alguns autores (94, 65).

3.2. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Para a determinação porcentual na caracterização da amostra foram usados métodos recomendados pela AOAC (4):

- | | |
|--|---------------|
| - Determinação de umidade | método 44-15A |
| - Determinação de cinzas | 08-01 |
| - Determinação de gorduras | 30-20 |
| - Determinação de fibras cruas | 32-17 |
| - Determinação de proteínas (N x 6,25) utilizando uma mistura de sulfato de potássio e sulfato de cobre (II) e selênio como catalizador. | |

- Determinação de carboidratos totais, estimados por diferença.

3.3. MÉTODOS TENTATIVOS PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DAS SAPONINAS

3.3.1. Determinação por Afrosimetria ou medida da espuma

Modificação do método da referência (77).

Procedimento: em uma série de tubos de ensaio (120 x 15mm), foram colocadas as seguintes amostras ou extratos de quinua para a determinação das saponinas: 0,05 g de amostras sólidas; 0,5 ml de extrato butanólico (subseqüentemente evaporado até a secura em banho-maria a 70°C), 0,5 ml das soluções aquosas e 0,5 ml das soluções-padrão (0,1% de saponina branca Merck-SBM e saponina parda Baker-SPB).

Acrescentou-se água destilada até um volume de 5,0 ml para todas as amostras. Os tubos foram agitados vigorosamente em agitador elétrico por 30 segundos. Esse passo foi seguido de um repouso de 5 minutos e, logo após, feita a medida da altura da espuma.

3.3.2. Hemólise no tubo e determinação espectrofotométrica, modificação dos métodos propostos nas referências (33 e 63).

Soluções:

- Solução tampão preparada misturando-se 90 ml de ácido bórico 2M com 10 ml de solução 0,05 M de bórax e 12,5 % de cloreto de sódio.

- Sangue humano e de boi. O sangue humano ou de boi foi pre

servado com solução de citrato de sódio a 3,8% numa proporção de 1,1 ml para cada 10 ml de sangue, sendo o mesmo refrigerado a 5°C até sua utilização.

- Soluções-padrão, 0,1% de SBM e SPB das quais foram feitas diluições de até 1:100.000 v/v.

Procedimento: A 5,0 ml do sangue com anticoagulante acrescentaram-se 95 ml do tampão e a suspensão foi centrifugada a 1.000 rpm por 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante. A lavagem das hemácias com tampão foi repetida mais duas vezes, sendo subsequentemente suspensas em 100 ml de solução salina (NaCl 0,85%).

As amostras e padrões foram tomados em água destilada.

Por outro lado, a cada 2,0 ml da solução tampão foram acrescentados 1,0 ml da solução salina e 1,0 ml da amostra ou padrão da suspensão das hemácias.

Procedeu-se a uma agitação vagarosa por 15 segundos a cada hora, até atingir 5 horas, quando se fez outra centrifugação a 1.000 rpm por 5 minutos. Levando o sobrenadante às cubetas de 1,0 cm de um espectrofotômetro Perkin-Elmer UV-Vis-402, foram registrados os espectros ultravioleta-visível dos padrões, encontrando-se um máximo de absorção característico em torno de 570 nm, sendo este o comprimento de onda utilizada com λ max. para as demais leituras.

Todo o material de vidro e plástico usado para este teste foi lavado com NaCl ao 0,85% antes de seu uso.

3.3.3. Determinação colorimétrica, modificação do método de Libermann-Burchard (32).

Preparação do reagente: anidrido acético (estocado em geladeira) e ácido sulfúrico foram misturados vagarosamente na proporção de 10:1 respectivamente e a mistura deixada resfriar no balcão, refrigerando-se até sua utilização.

Procedimento: usaram-se quantidades de 0,01 g de amostras sólidas e padrões (SBM e SPB), ou 0,5 ml de amostras líquidas as quais foram evaporadas em banho-maria (70°C) com ajuda de um jato de ar. Em seguida as amostras foram dissolvidas em 2,0 ml de ácido acético glacial, algumas vezes com ligeiro aquecimento. Foram acrescentados 4,0 ml do reagente, com posterior agitação vagarosa por 15 segundos. Depois de 4 e 24 horas de reação foram registrados seus espectros num espectrofotômetro Perkin-Elmer UV-Vis 402, contra brancos das respectivas amostras.

3.3.4. Determinação por cromatografia em camada delgada

Método: A preparação das placas cromatográficas foi feita segundo a referência (128), modificando-se apenas a quantidade de água usada na feitura da massa. Para cinco placas de 20 x 20 cm com uma espessura de camada de 0,250 mm, pesou-se 30 g de sílica gel G (tipo 60-Merck), acrescentou-se 72 ml de água destilada e agitou-se manualmente de 3 a 5 minutos, espalhando-se logo sobre as placas numa forma uniforme. Depois de secas, as placas foram ativadas por 1 hora a 110°C e deixadas esfriar na estufa.

Nove sistemas de desenvolvimento foram testados:

- I. 1-Butanol: etanol: água: na proporção (7:2:4)
- II. 1-Butanol: etanol: água: na proporção (1:1:1)

- III. 1-Butanol: etanol: hidróxido de amônio ao 25%; na proporção de (7:2:5).
- IV. 1-Butanol: piridina: água: na proporção (6:4:3)
- V. Clorofórmio: metanol: água: na proporção (65:35:8)
- VI. Clorofórmio: etanol: metanol: na proporção (4:2:1)
- VII. Benzeno: acetona: metanol: na proporção (5:5:1)
- VIII. Hexana: clorofórmio: acetato de etila: na proporção (5:1:1)
- IX. Benzeno: clorofórmio: acetona: na proporção (4:2:1);

Os seguintes reveladores foram testados:

a) Reagente de Liebermann-Burchard (128). Num becker contendo 50,0 ml de etanol foram acrescentados, com esfriamento em água, 5,0 ml de anidrido acético gelado e 5,0 ml de ácido sulfúrico. A mistura foi homogeneizada e refrigerada até a sua utilização.

b) Solução de pentacloreto de antimônio em clorofórmio, 10,0 % w/v; solução de preparo recente para sua utilização.

c) Solução a 20% de ácido fosfotúngstico em etanol, preparada, protegida da luz e armazenada em geladeira até sua utilização.

d) Solução a 33% de ácido clorosulfônico em ácido acético glacial (128), hermeticamente vedada, protegida da luz e armazenada em geladeira até sua utilização.

e) Sangue-gelatina (128). A 100 ml de NaCl a 0,9% se acrescentaram 4,50 g de gelatina em pó, misturando-se até a obtenção de uma suspensão homogênea; depois de 30 minutos de repouso a suspensão foi aquecida com agitação em banho-maria até atingir 80°C, a seguir foi resfriada à temperatura ambiente e armazenada em gela

deira.

10,0 ml de sangue (humano ou de boi) foram tratados como em 3.3.2; após a desfibrinação e lavagem, as hemácias foram suspensas em 100 ml de NaCl a 0,85% e a suspensão armazenada em refrigeração. A suspensão de hemácias e a gelatina foram aquecidas em banho-maria até atingirem 40°C quando foram misturados 50 ml de gelatina e 10 ml da suspensão das hemácias. A mistura foi homogeneizada e utilizada a essa temperatura e teve uma duração de quinze dias, armazenada a 4°C.

As amostras e padrões foram dissolvidos nos seus respectivos sistemas de eluição, aplicados por intermédio de capilares e desenvolvidos até uma frente de 10 cm. Após o desenvolvimento, as placas foram secadas com um secador de cabelo e pulverizadas com os respectivos reveladores.

A revelação foi completa com o revelador "a", aquecendo-se a placa na estufa a 130°C durante 15 minutos; para os reveladores "b" e "c" a 120°C durante 10 minutos; para o revelador "d", as placas foram aquecidas a 130°C durante 5 minutos, mas devido à toxicidade dos gases e à falta de uma capela, o uso deste revelador foi descontinuo. O revelador "e" foi pulverizado e as placas permaneceram à temperatura ambiente até o aparecimento das manchas, o que levou um tempo máximo de 25 minutos.

Depois de localizadas as manchas, procedeu-se à medida das distâncias com o critério do Rf ou hRf.

3.4. PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DAS SAPONINAS

3.4.1. Preparo das amostras

As amostras foram desengorduradas com éter etílico num extrator soxhlet durante 6 horas, e depois permaneceram à temperatura ambiente para a secagem.

3.4.2. Extração

Os seguintes processos de extração das saponinas foram testados.

3.4.2.1. Extração aquosa

A quantidade de 100 g de grãos desengordurados foram acrescentados 500 ml de água destilada, a temperatura foi elevada a 70°C (134) e mantida constante durante 2,5 horas. Ocasionalmente efetuou-se agitação manual. Findo esse tempo, o extrato foi separado por filtração, usando-se papel Whatman nº 1, e os grãos foram submetidos a mais uma extração nas mesmas condições. Após a segunda filtragem, uma lavagem com água destilada foi feita, coletando-se os filtrados para sua posterior concentração.

3.4.2.2. Extração com gradiente de etanol, 1-butanol e água.

Para cada 250 g de grãos desengordurados foram usados 450 ml de uma mistura de 300 ml de etanol a 80% e 150 ml de 1-butanol saturado com água (aproximadamente 80% a 24°C) na proporção de 2 de etanol para 1 de butanol.

A mistura foi agitada vigorosamente por um minuto e levada a refluxo com manta de aquecimento e condensador vertical tipo Liebig por 2,5 horas, com agitação ocasional.

Após este tempo, a mistura foi decantada a quente sobre lâ de vidro e foi feita uma segunda extração sobre os mesmos grãos com 400 ml da mesma mistura de etanol a 80% e butanol a 80% na proporção 1:1, nas mesmas condições anteriores e seguida também de decantação sobre a mesma lâ de vidro.

Finalmente uma terceira extração foi feita com 450 ml da mesma mistura na proporção de 1:2 de etanol/butanol.

Após a última decantação, os grãos foram lavados três vezes com proporções de 50 ml da mistura etanol a 80% e 1-butanol a 80% na proporção de 1:1.

Todas as soluções decantadas foram coletadas e filtradas através de papel whatman nº 1 e concentradas.

3.4.3. Concentração

Os extratos aquosos de 3.4.2.1. foram concentrados a 70°C até atingir um volume de 100 num aquecedor elétrico (Fisatam-Modelo 503).

Os extratos alcóolicos foram concentrados em rota-vapor à temperatura de 60°C, reduzindo-se seu volume até estar próximo da secura.

3.4.4. Detecção das saponinas

Foi feita a determinação qualitativa das saponinas nos ex

tratos concentrados conforme os métodos descritos no item 3.3.

3.4.5. Purificação preliminar

Os extratos aquosos foram levados a pH 4,0 com ácido clorídrico 0,1 N e transferidos para funis de separação onde foram feitas extrações com 1-butanol (450 ml para cada 100 ml de extrato) . A fase butanólica foi concentrada num rotavapor a 70°C até próximo da secura.

Cada extrato butanólico proveniente da extração originalmente feita com solventes foi levado até um volume de 100 ml com etanol 80% e 1-butanol 80% na proporção 1:1 e transferido para um funil de separação onde se efetuou uma purificação com éter etílico (450 ml para 100 ml de extrato).

A fração insolúvel em éter (ver diagrama 1) foi seca a 27 polegadas de vácuo e à temperatura de 40°C durante 16 horas, depois das quais o sólido resultante foi pesado.

O extrato etéreo foi concentrado no rotavapor até perto da secura e depois redissolvido na mistura de etanol-80%-butanol 80% (1:1) para posterior utilização.

Os grãos provenientes da extração com solventes foram secos à temperatura ambiente e submetidos à extração aquosa citada em 3.4.2.1., descartando-se depois os grãos. A solução aquosa foi submetida à extração da saponina e purificação, como foi descrito no item anterior (ver diagrama 1).

Das purificações preliminares acima descritas e apresentadas no diagrama 1, foram obtidos os seguintes extratos ou "precipitados":

- "precipitados" ou fração insolúvel em éter etílico P₂₈, P₄₂, P₃₉.
- Extrato etéreo, fração "gorduras": P₃
- Extrato butanólico: S₃₀, S₄₁, S₄₂.
- Concentrado da fase aquosa do extrato butanólico: E₄₄, E₄₅.

Todos estes extratos e precipitados foram submetidos aos testes de detecção para saponinas descritos no item 3.3, com a finalidade de selecionar os extratos a serem posteriormente fracionados.

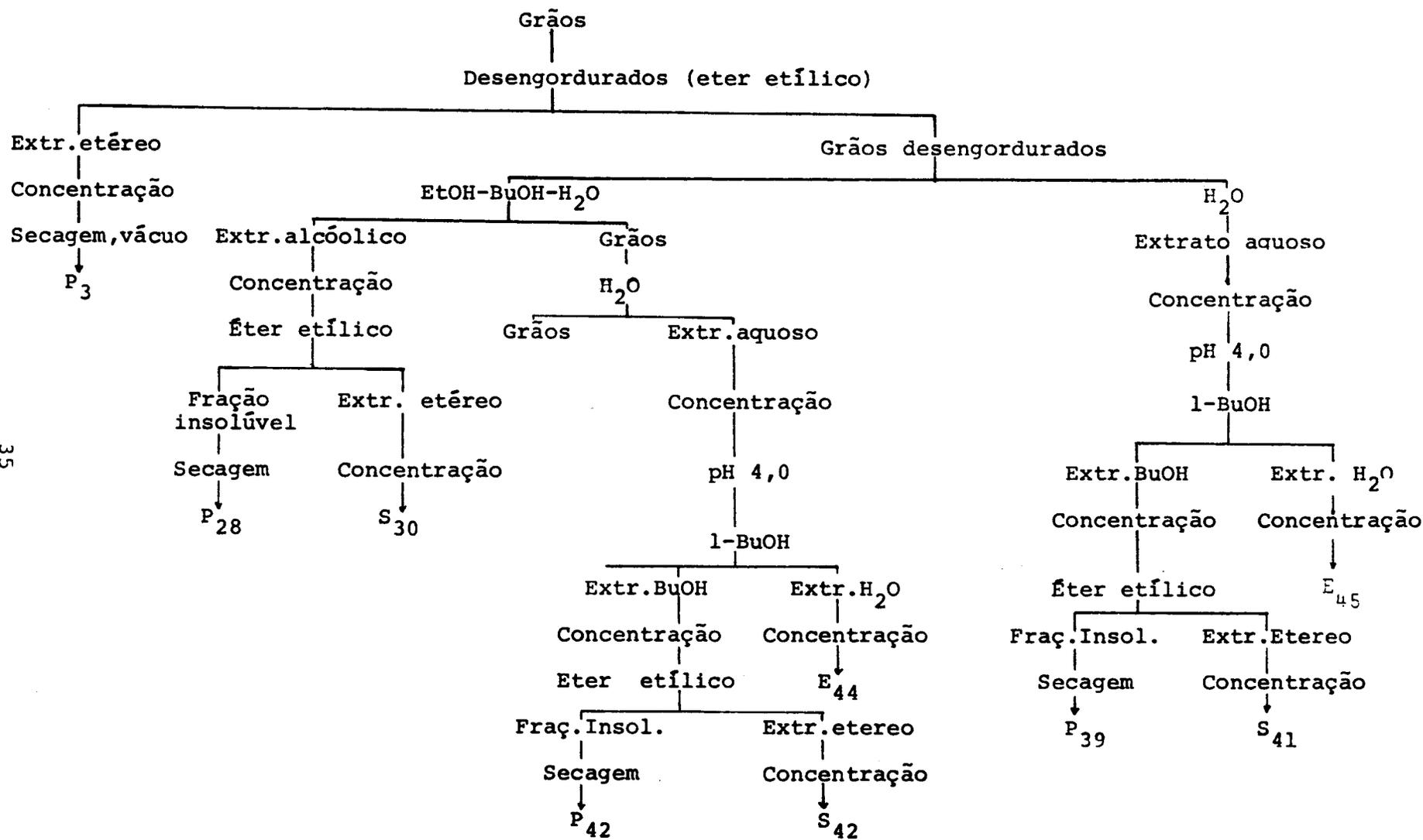
3.4.6. Fracionamento cromatográfico

Após os resultados obtidos com os métodos em 3.3. sobre os extratos e "precipitados" descritos na seção anterior, foi acolhida, como padrão para o fracionamento, a saponina branca Merck (SBM) e, como amostra, o precipitado P₂₈ (ver diagrama 1).

O fracionamento foi efetuado mediante cromatografia em coluna (30 x 2,0 cm e 55 x 4,0 cm), empregando-se o adsorvente sílica gel (sílica gel Merck para cromatografia em coluna, 0,063 a 0,20mm de tamanho de partícula).

O sistema de eluição foi clorofórmio, metanol e água na proporção de 65:35:8. O eluato da coluna foi monitorado em cromatografia de camada de sílica gel G (0,250 mm de espessura) num sistema de eluição idêntico ao da coluna; como reveladores foram usados os reagentes de Liebermann-Burchard e o sangue-gelatina, ambos descritos no item 3.3.4.

DIAGRAMA 1. Extração das saponinas dos grãos da quinua e sua purificação preliminar.



As colunas foram preenchidas colocando-se primeiro um suporte de lã de vidro no fundo; posteriormente, sobre uma camada de solvente, foi colocado o material adsorvente até obtenção de empacotamento. A proporção de adsorvente para amostra foi de 50:1 na coluna de 30 x 2,0 cm onde se fez o fracionamento da SBM e de 10:1 para a coluna com a amostra. O fracionamento foi feito com um coletor de frações Gilson, Modelo TFC-80, fixando-se o tempo para 10 minutos durante os quais se depositaram 5ml de eluato. Os primeiros 50 ml coletados da coluna de 30 x 2,0 cm e os 150 ml da coluna de 55 x 4,0 cm foram desprezados.

As amostras e o padrão foram dissolvidos no mesmo sistema de eluição, sendo as frações testadas mediante cromatografia de camada delgada como foi descrito no item 3.3.4. Desta forma concluiu-se que apenas a fração E da primeira coluna 55 x 4 cm apresentou características de saponinas. Esta fração foi então concentrada no rotavapor, secada a 27 polegadas de vácuo, a 40°C durante 20 horas, pesada e submetida a um segundo fracionamento em uma segunda coluna de 55 x 4,0 cm com uma proporção de adsorvente para amostra que foi de 50:1 aproximadamente. A amostra foi dissolvida no mesmo sistema de eluição, e depois eluída nas mesmas condições de coleta dos eluatos, testando-se as frações com o auxílio da cromatografia em camada delgada descrita no item 3.3.4.

Estabeleceu-se um gradiente de eluição que teve a seguinte distribuição:

Sistema de eluição	Coleta (Nº tubos)
Clorofórmio, Metanol, água (65:35:8)	1 até 449
Clorofórmio, Metanol, água (32,5:67,5:8)	450-495
Clorofórmio, Metanol, água (15:70:15)	496-535
Clorofórmio, Metanol, água (5:75:20)	536-610
Metanol, água (50:50)	611-667
Metanol, água (25:75)	668-750
Água	751-800

3.4.7. Hidrólise

As frações do item 3.4.6. que apresentaram características de saponinas na camada delgada, tanto da amostra fracionada como do padrão, foram hidrolisadas para o estudo das sapogeninas. Além do padrão SBM, também foi incluída a digitonina D (Digitonina p,a.Merck), por ser uma saponina tipicamente esteroidal. A hidrólise destes compostos foi feita no meio 1,4-dioxano-água de 1:1 (35, 84) com ácido sulfúrico 12 N a 110°C, por 6 horas (66, 81).

Assim, as amostras e padrões previamente concentrados no rotavapor e secados a vácuo, do mesmo modo que no item 3.4.3, foram pesados com precisão em quantidades entre 100 e 500 mg e dissolvidos em 20 ml da mistura 1,4-dioxano-água 1:1.

Após a dissolução das amostras foram acrescentados 20 ml de ácido sulfúrico 12 N. Cada uma foi agitada vigorosamente por 30 segundos e aquecida num banho de areia, no qual se colocou um sistema de refluxo com condensador tipo Liebig.

3.4.8. Extração das sapogeninas

Após esfriamento à temperatura ambiente, os hidrolisados obtidos na etapa anterior foram transferidos quantitativamente para funis de separação de 250 ml que continham 50 ml de clorofórmio cada. Foi feita em seguida por partição nos solventes clorofórmio-água, utilizando-se três vezes o volume de 50 ml de clorofórmio. Nesta primeira separação houve o aparecimento de uma interfase (I, diagrama 2). A fase clorofórmica foi passada através de 100 ml de bicarbonato de sódio a 2% contidos num funil de separação ocorrendo também o aparecimento de outra interfase (II, diagrama 2). O filtrado clorofórmico foi eluído em uma coluna (30 x 2,0 cm) de sulfato de sódio anidro (10 g, 7 cm de altura) e depois concentrado no rotavapor a 30°C.

A fase aquosa resultante da extração do hidrolisado com clorofórmio foi concentrada no banho de areia a 70°C até atingir um volume de 10-15 ml.

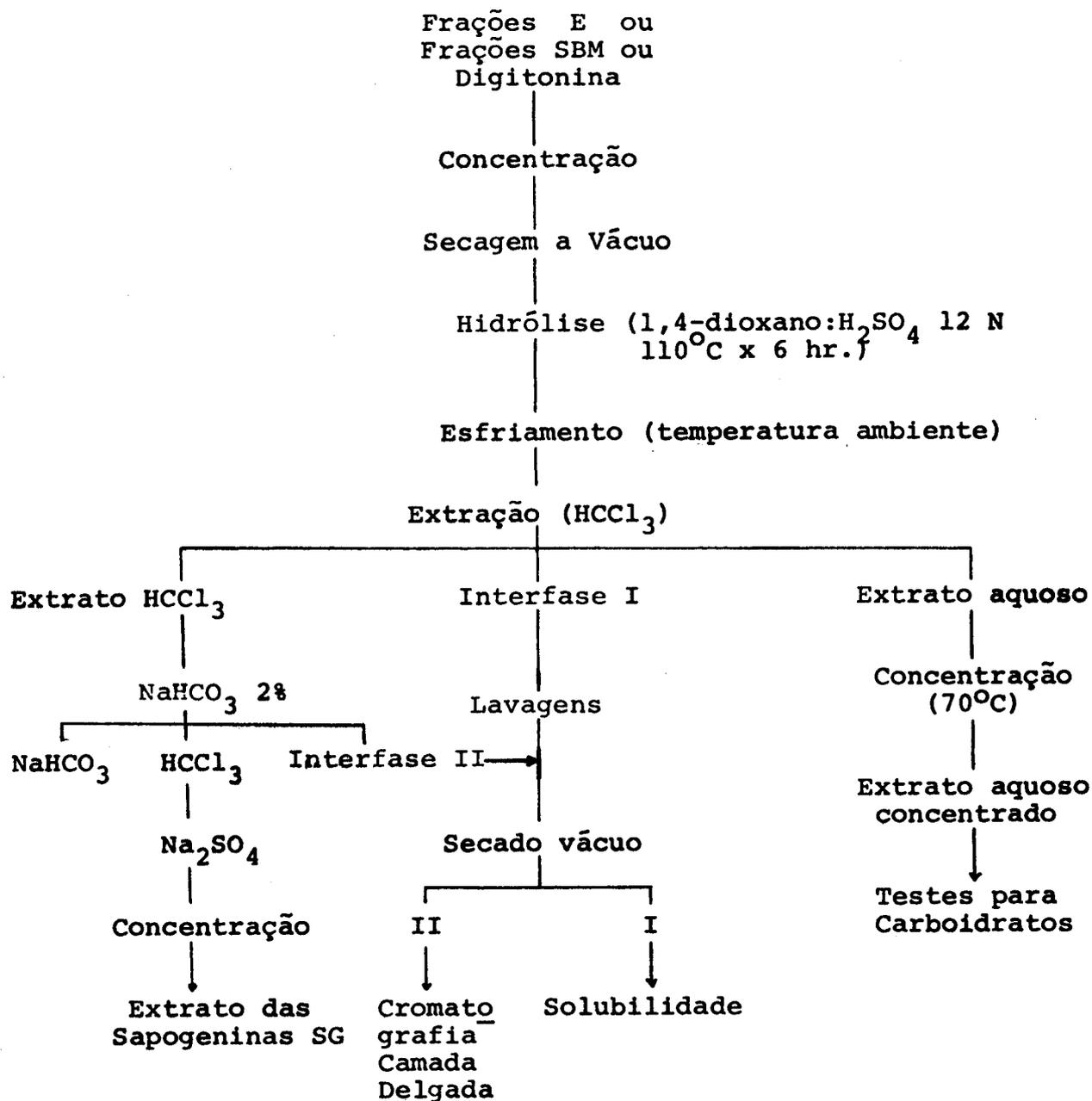
As interfases acima citadas foram lavadas com água para eliminar tanto o NaHCO_3 como o H_2SO_4 , e secadas a 27 polegadas de vácuo a 40°C durante 30 horas.

3.4.9. Detecção das sapogeninas

Os produtos da hidrólise, solúveis em clorofórmio, foram testados em cromatografia de camada delgada (0,25 mm de sílica gel G) com os seguintes sistemas de eluição.

I. Clorofórmio, metanol (9:1)

DIAGRAMA 2. Extração de sapogeninas da quinua.



II. Clorofórmio, Benzeno, Acetato de Etila (3:2:1)

III. Clorofórmio

IV. Benzeno

V. Clorofórmio, metanol (9,3:0,7),

sendo utilizado como revelador o reagente de Liebermann-Burchard (item 3.3.4), com aquecimento de 115-120°C durante 10-15 minutos.

As amostras, frações da SBM e a sapogenina-padrão, o ácido oleanólico (ponto de fusão 298-301°C, não corrigido, fornecido por J. Kernan (69)), foram dissolvidos nos respectivos sistemas de eluição.

3.4.10. Derivados das sapogeninas

3.4.10.1. Trimetilsilil derivados

Alíquotas dos extratos das sapogeninas e do ácido oleanólico (AO) tomado como padrão foram levadas até perto da secura com nitrogênio grau U e depois secas a 27 polegadas de vácuo e a 30°C por 20 horas. Finda a secagem, as mesmas foram congeladas a -15°C por 12 horas e finalmente liofilizadas (liofilizador marca Virtis, 1655) por 48 horas. Uma vez retiradas do liofilizador, foram hermeticamente fechadas, pesadas e armazenadas em dessecador de sílica gel com indicador azul.

A derivação (75) foi feita sobre as amostras e o padrão liofilizados, testando-se o efeito da temperatura e o tempo de reação e do solvente (piridina destilada).

- O solvente: Foi testado o efeito da piridina como solven

te na reação numa proporção de 1:1 com respeito ao reagente sililante.

- A temperatura de reação: as amostras e o padrão foram testados à temperatura ambiente, a 60°C e a 100°C durante 15 minutos respectivamente.

- O tempo da reação: testaram-se a 15, a 30 e a 60 minutos, a 6 e a mais de 24 horas, após agitação.

Todos esses parâmetros foram testados mediante o seguinte procedimento: com uma seringa de 1,00 ml foram retirados 0,20 ml do reagente sililante (N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida, BSTFA, da Pierce Chemical Co. - USA) e adicionados ao padrão liofi^lizado. Foram logo acrescentados 0,20 ml do solvente piridina e o sistema foi agitado vigorosamente por 30 segundos, deixando-se pelo tempo e temperatura desejados; o produto foi depois injetado na coluna de um cromatógrafo gás líquido (Perkin Elmer 990).

As ampolas do reagente BSTFA, que não foram gastas totalmen^{te} uma vez abertas, foram armazenadas sobre sulfato de cálcio anidro e em refrigeração.

3.4.10.2. Trifluoroacetil derivados

Alíquotas dos extratos de sapogeninas e do padrão AO, obti^{das} como foi descrito no item 3.4.8., foram levadas até próximo da secura, utilizando-se corrente de nitrogênio grau U, secadas a vácuo de 27 polegadas a 30°C por 20 horas e, finalmente, foram esti^{mados} seus respectivos pesos.

O preparo dos derivados para cromatografia gasosa foi como

segue: para 0,02 g do padrão, acrescentaram-se 0,5 ml de clorofórmio e 0,5 ml do reagente anidrido trifluoroacético (para gás cromatografia, Merck). Após agitação vigorosa por um minuto, o sistema ficou em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente, em seguida foi secado em corrente de nitrogênio grau U e o resíduo dissolvido em 0,25 ml de clorofórmio com agitação (75).

3.4.11. Cromatografia gás-líquida

O trimetilsilil derivados foram cromatografados nas condições apresentadas nas tabelas 2 e 3.

Mantiveram-se padronizadas as vazões dos gases para o detector de chama, sendo 30 "psig" para o ar sintético e 35 ml/min. para o hidrogênio. A temperatura, tanto do bloco de injeção como do detector, foi padronizada quando se obtiveram as melhores condições.

Padronizou-se também a operação do registrador a 1 millivolto para a amplitude inteira e a 0,5 cm/min para o avanço do papel.

Enquanto que os derivados sililados foram testados nas duas colunas, os trifluoroacetil derivados foram testados somente na coluna 3% OV-17.

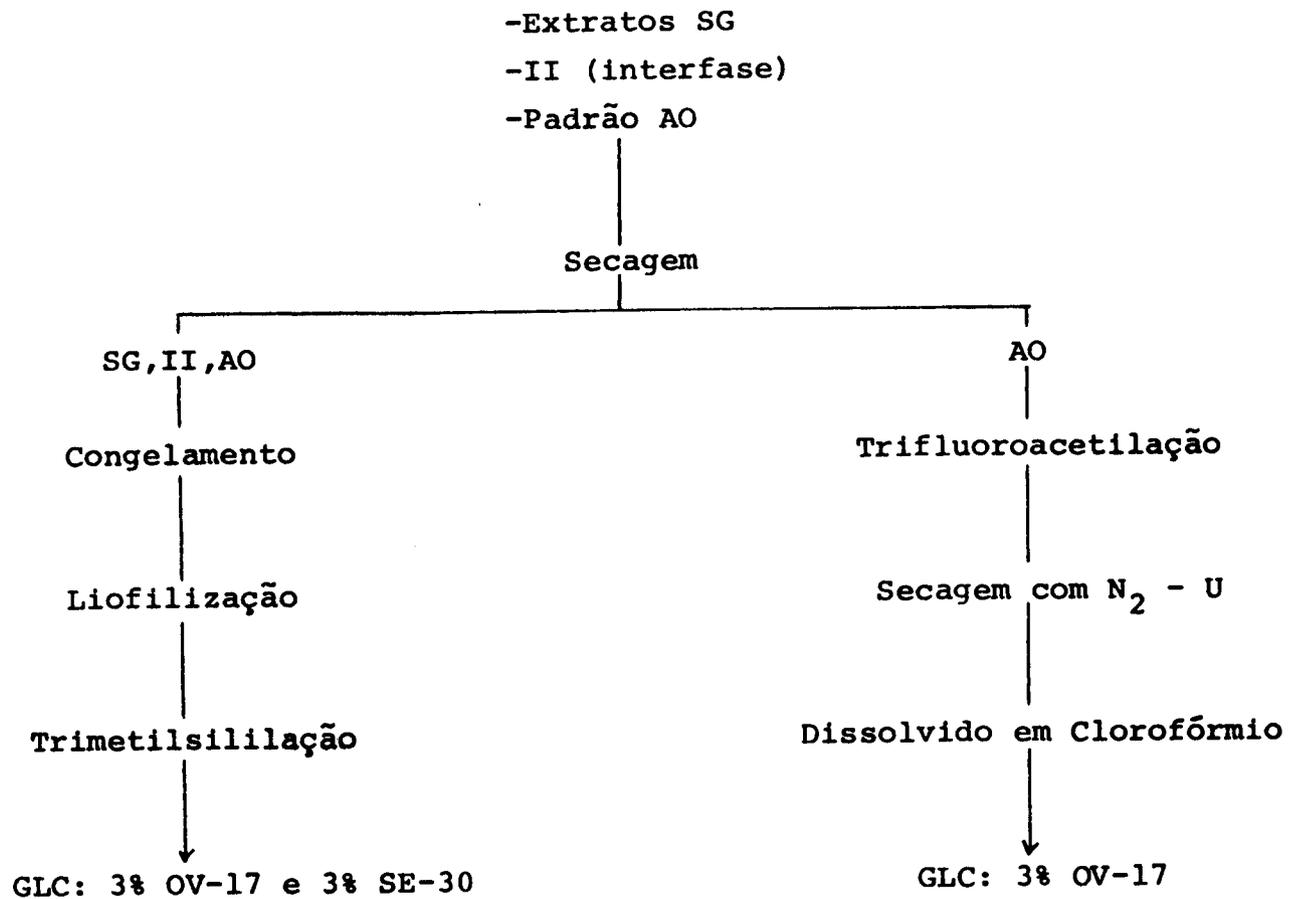
TABELA 2. Condições gás-cromatográficas com as que se obtiveram os melhores resultados dos derivados trimetil sililados das sapogeninas usando uma coluna de vidro 3% SE-30 em chromosorb W AW DMCS 80/100 6' x 1/4".

Parâmetros	Condições
Temperatura da coluna	285°C
Temperatura do injetor	315°C
Temperatura do detetor	320°C
Gás de arrastre (N ₂ -U)	65 ml/minuto
Amplitude	X8 X10
Acondicionamento	295°C por 24 horas
Volume de injeção	0,2 microlitros
Efeito do solvente na reação	0,2 ml de piridina anidra não teve marcado efeito
Temperatura e tempo da reação	60°C por 15 minutos após agi tação ou, temperatura ambien- te a partir de 30 minutos até mais de 72 horas após da agi tação.

TABELA 3. Condições cromatográficas com as que se obtiveram os melhores resultados para os derivados trimetil sililados das sapogeninas usando uma coluna de vidro 3% OV-17 em Chromosrob W AW DMCS 80/100 6' x 1/4".

Parâmetros	Condições
Temperatura da coluna	Programação de 220 a 275°C com 3°/minuto; tempo inicial 0 minuto e tempo final 12 minutos.
Temperatura do injetor	300°C
Temperatura do detector	310°C
Gás de arrastre (N ₂ -U)	65 ml/minuto.
Amplitude	X8 X10
Acondicionamento	285°C por 24 horas
Volume da injeção	0,2 microlitros
Efeito do solvente na reação	0,2 ml de piridina anidra não teve marcado efeito.
Temperatura e tempo da reação	60°C/15 minutos ou, temperatura ambiente a partir de 30 minutos até mais de 72 horas após agitação.

DIAGRAMA 3. Gás-cromatografia dos derivados das sapogeninas da quinua.



3.4.12. Determinação quantitativa

Foi feita uma curva-padrão para o AO utilizando como critérios a área (produto da altura vezes a largura na metade da altura) do pico e a normalização interna do cromatograma. Como padrões internos foram usados os derivados do padrão AO e da amostra SG-P₂₈, para se obter a confirmação da presença do pico-padrão nas amostras. Uma vez feita a mistura, esta foi agitada por 30 segundos, sendo depois injetada no cromatógrafo 0,20 ul.

3.5. Detecção dos carboidratos

As soluções aquosas provenientes da hidrólise, foram neutralizadas com uma solução de NaOH 6 N e concentradas em banho de areia a 70°C até um volume de 10-15 ml, esfriadas e depois clarificadas como segue: a cada 10 ml da solução aquosa foram acrescentados 3,0 ml de solução saturada de acetato de chumbo (10%) e 0,2 g de oxalato de sódio, obtendo-se boas clarificações após filtragem em papel de filtro whatman Nº 1.

3.5.1. Teste da antrona

Em tubos de ensaio foram colocados 0,3 ml da amostra e adicionados 2,0 ml do reagente (0,002 g de antrona p.a Riedel Haenag, para cada 2,0 ml de H₂SO₄ concentrado) pelas paredes do tubo, sendo feita a detecção visual após 3 minutos de reação (37).

3.5.2. Teste de Molish

À quantidade de 2,0 ml da amostra foram acrescentados 0,2 ml do reagente (20% de 1-naftol em etanol) e, escorrendo pelas paredes do tubo, foram adicionados 2,0 ml de H_2SO_4 . Logo após foi feita a detecção visual e sua confirmação mediante a adição de 5,0 ml de NaOH 12 N (107).

3.6. Métodos gás-cromatográficos para determinação dos TMS derivados das sapogeninas da quinua.

3.6.1. Cromatográfico de Kernan, et. al (70). (Aparece no diagrama 4 como K_1).

Este método sofreu modificações quanto às quantidades para a extração, na hidrólise e na síntese dos derivados.

À quantia de 10 g de quinua moída e peneirada (peneiras de plástico de 400 furos por polegada quadrada), acrescentaram-se 35 ml de NaOH 0,25 N, volume necessário para recobrir todo o material e formar uma solução que permitiu sua agitação com bastão por 15 minutos. Foram acrescentados 50 ml de água destilada e novamente agitou-se por 15 minutos. A suspensão foi então centrifugada por 35 minutos a 10.000 rpm, lavada com água e centrifugada por mais duas vezes por 15 minutos a cada vez.

Os sobrenadantes foram filtrados sobre papel whatman nº 1 e levados até um volume de 200 ml com água destilada, do qual foram retiradas alíquotas de 80 ml para depois serem concentradas no banho de areia a 70°C até um volume de 5 ml cada uma.

Para a hidrólise cada alíquota foi diluída para 10 ml com água destilada e foram acrescentados 10 ml de 1,4-dioxano. O sistema foi agitado durante 15 segundos. Depois foram adicionados 20 ml de H_2SO_4 12 N e a mistura foi, a seguir, agitada por 15 segundos, procedendo-se à hidrólise a $110^{\circ}C$ como descrito no item 3.4.7. por um tempo de 3 horas. Após o esfriamento à temperatura ambiente, foi feita a extração, utilizando-se três vezes 50 ml de clorofórmio, descartando-se a interfase I (ver diagrama 4).

As soluções clorofórmicas foram passadas através de 100 ml de $NaHCO_3$ a 2%, sendo separada, a interfase II e dissolvida em três porções de 25 ml de clorofórmio-metanol (9:1), depois combinada com a solução clorofórmica. Esta solução foi passada por uma coluna (30 x 2 cm) contendo 10 g de sulfato de sódio anidro e, a seguir, concentrada no rotavapor até perto da secura, levada a 10 ml com clorofórmio, retirando-se alíquotas, de 2,5 ml cada, que foram secas com N_2 grau U e em seguida trimetilsililadas com o reagente BSTFA (0,25 ml), sem adição de piridina. Depois de agitar vigorosamente por 30 segundos, permaneceram, os tubos, em repouso por 30 minutos e foi finalmente feita a injeção de 0,25 microlitros no cromatografo de gás equipado com uma coluna de vidro 3% SE-30 cujos parâmetros e condições foram explicados no item 3.4.11.

A estimativa foi feita frente ao padrão, ácido oleanólico trimetilsilil derivatizado.

3.6.2. Cromatográficos desenvolvidos neste trabalho.

3.6.2.1. Com tratamento alcalino e extração butanólica a pH 4.

(Aparece no diagrama 4 como K₂).

Preparou-se um extrato alcalino como aparece no item 3.6.1 o qual foi, em seguida, acidificado com HCl 0,1 N até pH 4,0. Esta mudança ocasionou o aparecimento de um precipitado branco abundante e o desaparecimento da cor amarela da solução.

O precipitado foi separado e centrifugado a 1000 rpm por 20 minutos, lavado com água a pH 4,0 e depois secado a 40°C durante 12 horas em vácuo de 27 polegadas.

Os sobrenadantes obtidos foram submetidos a seis extrações sucessivas com 50 ml de 1-butanol de cada vez; a emulsão formada foi facilmente desfeita durante um repouso final de 10 minutos. A solução butanólica foi concentrada no rotavapor a 60°C até bem próximo da secura, enquanto que a solução aquosa foi evaporada até 15 ml no banho de areia a 70°C.

No entanto, a solubilidade do precipitado foi verificada no sistema solvente clorofórmio, metanol, água 65:35:8, e o precipitado foi posteriormente cromatografado em camada delgada de sílica gel G (item 3.3.4), utilizando-se como sistema de eluição clorofórmio, metanol, água 65:35:8 e, como revelador, o sangue-gelatina.

O extrato butanólico foi diluído com 1-butanol até 25 ml e, daí, alíquotas de 10 ml foram secas a 70°C no banho-maria com ajuda de um jato de ar, O produto foi hidrolisado e as sapogeninas extraídas, derivatizadas, e gas-cromatografadas como aparece descrito no item 3.6.1 (ver diagrama 4).

3.6.2.2. Com extração por gradiente de etanol, 1-butanol, água.

(Aparece no Diagrama 4 como W_1)

10 g de amostra, moída e peneirada como já foi descrito no item 3.6.1, foi extraída inicialmente com 60 ml da mistura de solventes etanol 80%, 1-butanol 80% (2:1) mediante agitação vigorosa por 30 segundos e refluxada sobre banho de areia a 115°C por 30 minutos, com agitação periódica. Depois de decantar o primeiro extrato a quente, através de lã de vidro, procedeu-se a uma segunda e a uma terceira extração da massa com 60 ml de mistura dos solventes nas proporções de 1:1 e 1:2, respectivamente. A extração foi terminada com lavagem dos mesmos solventes na proporção 1:1.

Os extratos, juntos, foram filtrados sobre papel de filtro whatman Nº 1 e concentrados no rotavapor a 60°C até perto da seca, sendo depois transferidos e diluídos com a mistura de etanol 80% -1-butanol 80% (1:1) até 25 ml. Alíquotas de 10 ml foram secas diretamente em tubos de reação, em banho-maria a 70°C e jato de ar.

Sobre a alíquota do extrato seco foi realizado o mesmo procedimento de hidrólise, extração das sapogeninas, trimetilsilil derivatização e determinação por cromatografia gás líquida como já foi explicado no item 3.6.1 (ver diagrama 4).

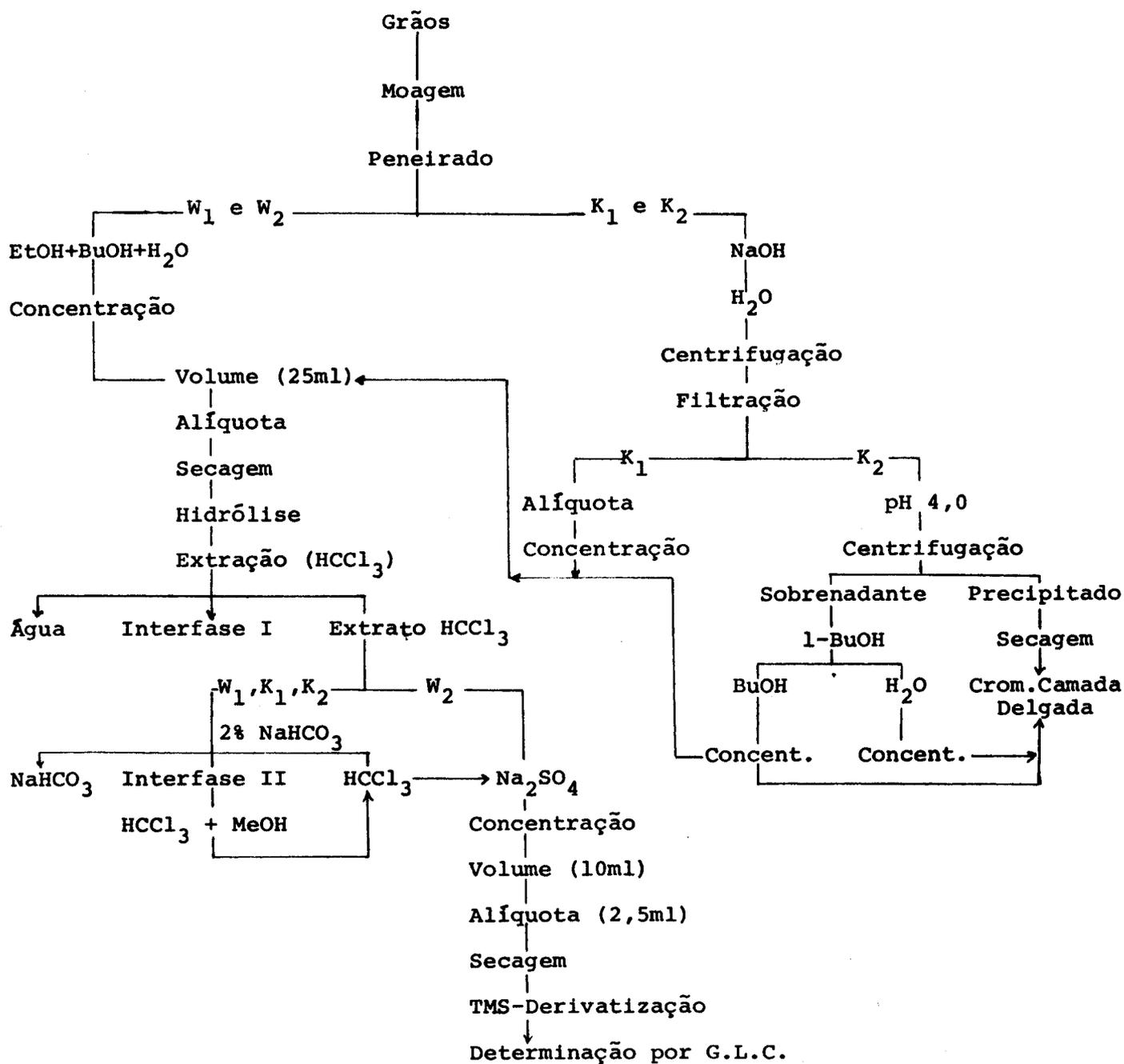
3.6.2.3. Com extração por gradiente de etanol, 1-butanol, água e sem tratamento com NaHCO_3 a 2%. (Aparece no Diagrama 4 como W_2).

Seguiu-se o procedimento 3.6.2.2 até a extração das sapogeninas com clorofórmio.

A solução clorofórmica não foi passada por 100 ml de NaHCO_3 a 2%, eliminando-se, desta forma, a separação de algumas sapogeninas as quais poderiam aparecer na interfase II. A solução então foi diretamente passada pela coluna de NaSO_4 anidro, a qual foi posteriormente lavada por duas vezes com 20 ml de clorofórmio como nos demais casos.

A solução clorofórmica desidratada passou pelos mesmos procedimentos para a concentração, trimetilsilil derivatização e cromatografia gás-líquida citados no item 3.6.1 (ver diagrama 4).

DIAGRAMA 4. Métodos para a determinação do Ácido Oleanólico na Quinoa, Variedade de Kancolla.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Os resultados da caracterização bromatológica da quinua (Chenopodium quinoa, Willd.), variedade Kancolla, aparecem na tabela 4.

TABELA 4. Composição centesimal da quinua var. Kancolla

Umidade	12,10
Cinzas	2,89
Extrato etéreo	6,033
Fibra bruta	3,883
Proteínas (N x 6,25)	12,45
Carboidratos (diferença)	66,527

Estes dados estão em concordância com os publicados por autores (150).

4.2. PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DAS SAPONINAS

4.2.1. Extração

Segundo os procedimentos descritos nos ítems que vão do número 3.4.2 até o número 3.4.5, obtiveram-se os extratos aquosos

E_{44} e E_{45} ; os extratos butanólicos S_{30} , S_{41} e S_{42} ; as frações in solúveis em éter e secadas a vácuo P_{28} , P_{42} e P_{39} ; e a fração gor duras P_3 , todas elas apresentadas esquematicamente no Diagrama 1. Destas, as frações P_3 , P_{28} , P_{39} e P_{42} eram sólidas e, depois de secas e pesadas, obtiveram-se as seguintes porcentagens: $P_3 = 6,05\%$, $P_{28} = 4,73\%$, $P_{39} = 1,46\%$ e $P_{42} = 0,80\%$.

A porcentagem de P_3 está em concordância com a porcentagem de gorduras apresentada na Tabela 4, o que sugere que os grãos que serviram para as extrações das demais frações foram livres de gor duras. O processo de extração da gordura foi feito para evitar qualquer interferência que pudesse alterar a extração e determina ção das saponinas (37, 42).

O procedimento de obtenção das frações insolúveis em éter a partir das extrações com etanol-butanol-água e da extração aquosa que, a pH 4,0, se tratou com butanol é seletivo para saponinas, principalmente para as triterpênicas (144, 59, 11, 12, 7), pelo que P_{28} e P_{42} representariam o total das saponinas da quinua; po rém, estimando as porcentagens de P_{28} mais a de P_{42} como a total das saponinas, observa-se que somente 85,53% do total são extraídas com etanol-butanol-água e os restantes 14,47% com água que, a pH 4,0, foi tratada com butanol.

A porcentagem de P_{39} que está muito abaixo da porcentagem de P_{28} supõe que a extração aquosa nas condições testadas, que são as recomendadas para as saponinas da quinua (134), não fornece uma boa extração e separação das mesmas.

As quantidades de P_{39} e P_{42} , ambas baixas e não muito difere ntes uma da outra, poderiam sugerir uma ou mais destas alternatiu

vas: a) que a extração butanólica do extrato aquoso a pH 4,0 não é adequada para as saponinas da quinua, b) que a extração aquosa usada é ineficiente, ou c) que a quinua possui pouca quantidade de saponinas do tipo terpênicas ácidas (7, 11, 12).

4.2.2. Detecção das saponinas por vários métodos nas frações apresentadas no Diagrama 1.

4.2.2.1. Afrosimetria ou medida da espuma

Como foi explicado na seção material e métodos, obtiveram-se os extratos e precipitados da quinua (Diagrama 1) que poderiam apresentar alguma atividade espumante para serem submetidos ao teste afrosimétrico, chegando-se aos resultados da Tabela 5.

TABELA 5. Teste qualitativo da produção de espuma pelas frações ou extratos apresentados no Diagrama 1.

Amostra	Altura da espuma (mm)
P ₂₈	12,0
P ₄₂	10,0
P ₃₉	13,0
P ₃	0,0
S ₃₀	0,0
S ₄₂	0,1
S ₄₁	0,0
E ₄₄	25,0
E ₄₅	2,0
SBM (10 ppm) §	15,0
SPB (100 ppm) §§	9,0
Grãos de quinua (0,05 g)	10,0

§ - Saponina branca Merck

§§ - Saponina parda Baker

Pode-se dizer que, se o teste da espuma nestas condições é característico para as saponinas, os resultados na tabela 5 o confirmam, mas sabe-se que esta característica não é exclusiva das saponinas (42, 45, 127). Conclui-se daí que a E_{44} possa apresentar outros componentes que fornecem essa quantidade de espuma já que, seguindo-se o mesmo procedimento de obtenção que a E_{45} , esta não apresenta uma quantidade semelhante. Com estes resultados isolados, não se pode concluir se as saponinas estão ou não presentes num determinado extrato, mas se pode tomá-los como orientação para constatação.

4.2.2.2. Hemólise

As mesmas amostras testadas pelo método afrosimétrico foram submetidas ao teste hemolítico descrito no item 3.2.2., o qual é uma combinação de dois procedimentos previamente melhorados (33). Jara et al (63) sugeriram que fosse registrado um espectro de absorção para ter certeza de se estar usando o comprimento de onda apropriado na medição da hemólise. Desta forma determinou-se com sangue hemolizado com a SBM que o comprimento de onda para esta medição seria 570 nm, como aparece na tabela 6.

TABELA 6. Teste qualitativo de hemólise para as diversas frações extraídas da quinua e definidas no diagrama 1.

Amostra	Absorbância (570nm) tempo = 5 horas	Porcentagem da hemólise	Observações
Branco	0,000	0,00	Branco de amostra
P ₂₈	0,045	30,20	solução transparente após <u>centrifugação</u> .
P ₃₉	0,041	27,52	idem
P ₄₂	0,150	100,67	idem
P ₃	0,093	62,42	idem
S ₃₀	0,264	177,18	idem ao padrão SBM
S ₄₂	0,157	105,36	idem
S ₄₁	0,107	71,82	idem
E ₄₄	0,118	79,19	idem
E ₄₅	0,120	80,54	idem
SBM(10000:1)	0,149	100,00	solução hemolisada aos 5 minutos
SPB(10000:1)	0,104	69,80	solução transparente após <u>centrifugação</u>

A comparação foi feita com a saponina branca merck (SBM). Observou-se que o branco não acusou ruptura das hemácias, o que garantiu um sistema adequado.

As frações insolúveis em éter P₂₈ e P₃₉ apresentaram porcentagens de hemólise semelhantes, sugerindo concentrações similares de saponinas, porém, na seção 4.2.1, a P₃₉ apresentou uma baixa porcentagem, o que sugere que a hemólise causada pelos componentes de P₂₈ e P₃₉ não se deve exclusivamente às saponinas presentes. O mesmo critério serviria para justificar a alta porcentagem de hemólise apresentada por P₄₂.

Os extratos aquosos E₄₄ e E₄₅ apresentaram porcentagens de hemólise semelhantes, com valores altos, o que faz supor que as saponinas não são extraídas com o tratamento com butanol a pH 4,0; no entanto a E₄₄ provém de grãos já extraídos com álcoois, o que sugere que a extração não foi completa, ou que esses álcoois não são os adequados, o que é uma possibilidade remota, conforme foi discutido no item 4.2.1.

O fato das amostras P₃, S₃₀, S₄₂ e S₄₁ terem apresentado atividade hemolítica constitui uma das falhas deste teste, já que, pela forma de obtenção destas amostras, não era de se esperar que tivessem saponinas. Já foi mencionado por vários autores (116, 117, 63, 142 e 47) que outras substâncias, além das saponinas, podem produzir a hemólise sob as condições do experimento.

4.2.2.3. Espectrofotometria ultra violeta-visível

Tomaram-se os espectros U.V.-Vis. para cada uma das amostras após 4 horas de reação com o reagente Liebermann-Burchard(áci

do sulfúrico em anidrido acético, 32). Foi necessário registrar o espectro antes das 24 horas, em virtude de mudanças marcantes que apareceram na coloração e no espectro do cromóforo como se pode observar nas tabelas 7 e 8.

Os resultados apresentados na tabela 7 mostram que as frações insolúveis em éter (P_{28} , P_{42} , e P_{39}), os extratos aquosos (E_{44} e E_{45}) e os padrões (SBM e SPB) apresentaram escassa solubilidade em ácido acético e não ofereceram marcada diferença na coloração das suas soluções, o que sugere que todas elas apresentam componentes comuns, provavelmente saponinas. No entanto a fração gorduras (P_3) e os extratos butanólicos (S_{30} , S_{42} e S_{41}) apresentaram alta solubilidade em ácido acético, e a coloração de suas soluções ao começo da reação foi praticamente a mesma para todas elas, sugerindo que este grupo de extratos apresentam componentes comuns, provavelmente diferentes das saponinas, face aos resultados mostrados.

Como se pode verificar na tabela 8 e na figura 1, existe um máximo de absorção a 470 nm que é comum para P_{28} , P_{42} , P_{39} , E_{44} , E_{45} , SBM e SPB, o que supõe que apresentem cromóforos que absorvem a esse comprimento de onda e que, provavelmente, sejam de natureza das saponinas. Isto reforça o que sua solubilidade e coloração indicaram. Por sua vez, os extratos P_3 , S_{30} , S_{42} e S_{41} não apresentaram esse segundo máximo de absorção, o que confirmaria sua natureza diferente com respeito às demais amostras testadas.

O primeiro máximo de absorção localizado entre 360 e 390 nm com marcada absorção não fornece uma boa orientação para elucidar a presença ou ausência das saponinas, pelo fato de todas as amostras o apresentarem; a mudança deste máximo entre 360 a 390 nm de

TABELA 7. Solubilidade e coloração das frações definidas no diagrama 1 para o teste espectrofotométrico de Liebermann-Burchard.

Amostra	Solubilidade em ácido acético	Coloração		
		0 horas	4 horas	24 horas
Branco	---	incolor	amarelada	amarela
P ₂₈	escassa	amarelada	amarela	âmbar
P ₄₂	"	"	"	"
P ₃₉	"	"	"	"
P ₃	alta	azul esverdeada	marrom	preta
S ₃₀	"	idem	"	"
S ₄₂	"	verde	amarela	âmbar escuro
S ₄₁	"	"	âmbar	" "
E ₄₄	escassa	amarela forte	âmbar	" "
E ₄₅	"	" "	"	marrom
SBM §	"	incolor	amarela	marrom
SPM §§	"	âmbar	marrom	preta

§ - Saponina branca Merck

§§ - Saponina parda Baker

TABELA 8. Concentrações, máximos de absorção, absorbâncias e coeficientes de extinção das frações definidas no Diagrama 1 para o teste de Liebermann-Burchard, às 4 horas de reação.

Amostra	Concentração (g/l)	λ_1 (nm)	A_1	$E_{1cm}^{1\%$	λ_2 (nm)	A_2	$E_{1cm}^{1\%$
P ₂₈	0,125	366	0,97	77,6	470	0,56	44,8
P ₄₂	0,500	362	0,62	12,4	470	0,18	3,6
P ₃₉	0,500	360	0,88	17,6	470	0,04	0,8
P ₃	0,500	390	1,15	23,0	----	----	----
S ₃₀	0,0625	366	0,65	1040,0	----	----	----
S ₄₂	0,500	386	1,25	25,0	----	----	----
S ₄₁	0,25	360	0,54	21,6	----	----	----
E ₄₄	0,0625	366	0,47	75,2	470	0,28	44,8
E ₄₅	0,0625	366	0,55	88,0	470	0,43	68,8
SBM §	0,500	360	0,15	3,0	470	0,05	1,0
SPB §§	0,500	366	0,82	16,4	470	0,55	11,0

§ - Saponina branca Merck

§§ - Saponina parda Baker

λ_1 e λ_2 = máximos de absorção

A_1 e A_2 = absorbância

$E_{1cm}^{1\%} = \frac{10A}{bc}$, onde: A = absorbância, b = lcm e c = concentração(g/l)

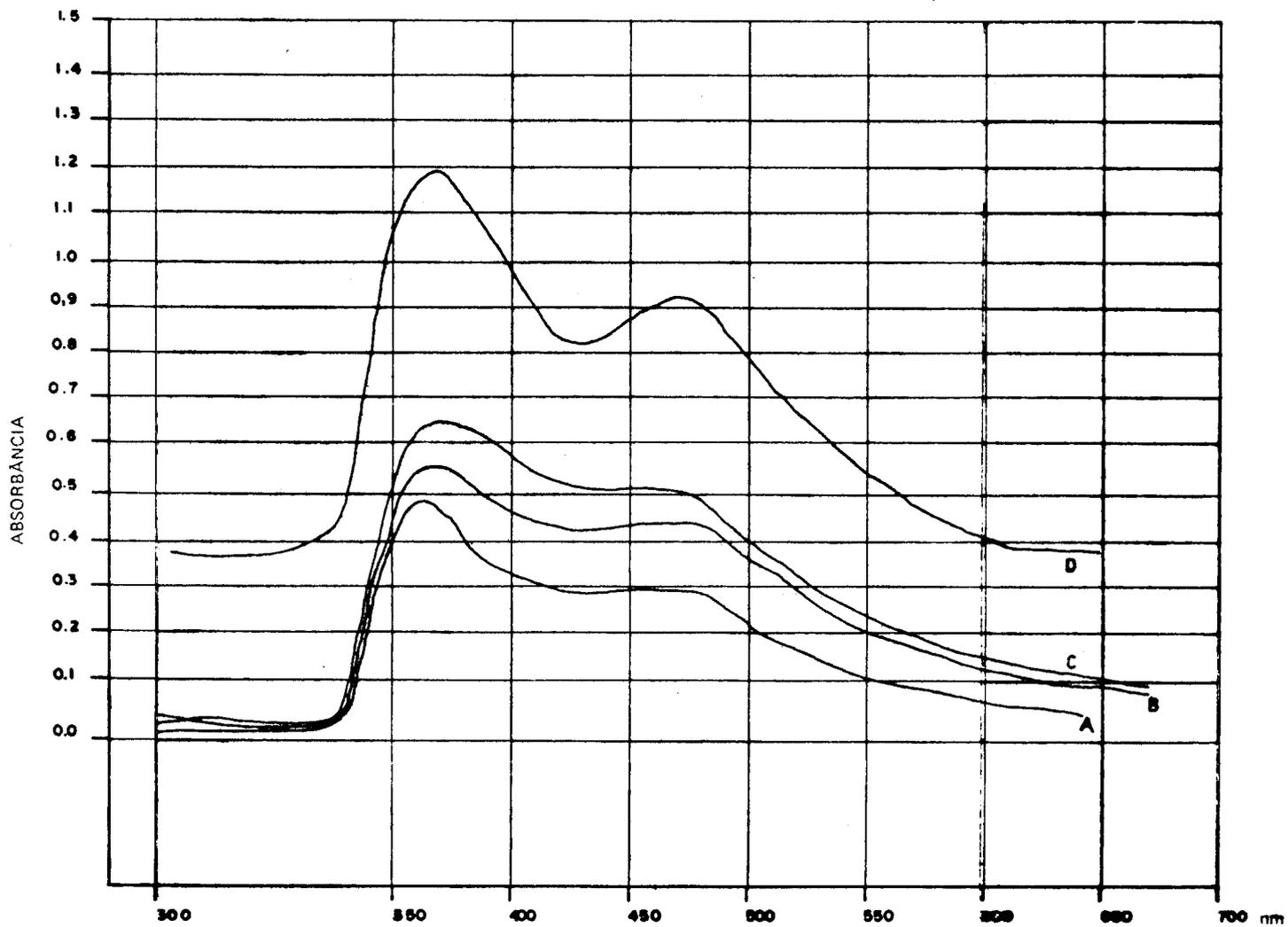


FIGURA 1. ESPECTROS DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL DOS EXTRATOS: A - P₂₈, B - E₄₄, C - E₄₅ e D - SPB NA REAÇÃO COLORIMÉTRICA DE LIEBERMANN-BURCHARD.

veu-se ao efeito hipsocrômico do solvente ácido acético.

As amostras P₂₈, E₄₄ e E₄₅ apresentaram valores do coeficiente de extinção ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) a 470 nm, similares entre si, o que sugere que possuam concentrações semelhantes do mesmo cromóforo, o que estaria em discordância, já que eles provêm de processos diferentes. Isto faz supor, como outros autores (128, 32) fizeram constar, que o reagente Liebermann-Burchard não tem especificidade para as saponinas.

4.2.2.4. Cromatografia em camada delgada

As nove amostras e as duas saponinas comerciais foram testadas nos nove sistemas de desenvolvimento descritos no item 3.3.4. e, segundo as propriedades de polaridade, poderiam se agrupar na seguinte ordem:

	I. 1-Butanol:etanol:água	(7+2+4)
	II. 1-Butanol:etanol:água	(1+1+1)
Polares	III. 1-Butanol:etanol:amônia a 25%	(7+2+5)
	IV. 1-Butanol:piridina:água	(6+4+3)
	V. Clorofórmio:metanol:água	(65+35+8)
Polar- semipolar	VI. Clorofórmio:acetato de etila:metanol	(4+2+1)
	VII. Benzeno:acetona:metanol	(5+5+1)
Semipolar-	VIII. Hexana:clorofórmio:acetato de etila	(5+1+1)
não polar	IX. Benzeno:clorofórmio:acetona	(4+2+1)

Dos reagentes definidos em 3.3.4, dois foram avaliados no início por terem sido apontados por um autor (128) como específico para saponinas triterpênicas; estes foram: a) o pentacloreto de antimônio a 10% em clorofórmio e b) o ácido clorosulfônico a 33% em ácido acético glacial. Não foi encontrada, porém, muita vantagem, não só por oferecerem resultados similares aos reveladores de Liebermann-Burchard e o ácido fosfotúngstico, como pelos vapores tóxicos que eles produzem no laboratório. Desta forma, os reveladores selecionados para os testes em camada delgada foram o ácido fosfotúngstico, o reagente de Liebermann-Burchard e o sangue-gelatina. O ácido fosfotúngstico deu cores com tonalidades desde o avermelhado até o roxo e com o reagente de Liebermann-Burchard as manchas foram amarelas. Após o esfriamento das placas, as cores mudaram para marrom e cinza, respectivamente; no entanto, com o sangue-gelatina, as manchas se apresentaram incolores sobre um fundo avermelhado.

Os valores de hRf das amostras e padrões nos nove sistemas de desenvolvimento aparecem nas tabelas 9 até 17.

A tabela 18 é um resumo dos resultados de detecção até agora obtidos. Através desta tabela pode-se concluir, embora tentativamente, que os extratos P₂₈, P₄₂, P₃₉, E₄₄ e E₄₅ contêm saponinas, já que são eles os que reúnem o maior número de características típicas das saponinas por produzirem espuma e hemólise, apresentam absorvidade considerável a 470 nm depois de se tratar com o reagente Liebermann-Burchard e, finalmente, possuem propriedades de polaridade consistentes com as das saponinas.

TABELA 9. Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema

I. (1-Butanol:etanol:água, 7 + 2 + 4)

Revela dores	Amostras										
	P ₂₈	P ₄₂	P ₃₉	P ₃	S ₃₀	S ₄₂	S ₄₁	E ₄₄	E ₄₅	SBM	SPB
a. §	00	00	00	00	--	--	--	00	00	--	00
	07	06	06	66	16	32	32	06	10	07	07
	14	09	09	86	24	42	42		29	32	32
	24	29	32	92	26	50	50		32		
	32	32	40		29	57	57		42		
	38		50		33	86	86				
	44				38						
	50				45						
	56				50						
					57						
					67						
					78						
	b. §					85					
00		00	00	00	00	--	--	00	00	00	00
08		07	07	67	27	28	28	08	08	08	11
14		14	14	91	32	32	32	11	11	32	31
23		24	24		34	34	34	42	42		37
32		33	33		38	38	38				46
36		37	38		42	42	42				
40			42		48	46	46				
45			46		52	52	52				
50			51		60	62	62				
57					89	68	68				
c. §						76	76				
						90	90				
	00	--	00	00	00	--	--	00	00	--	--
	34		34	67	59	68				34	34
				68							52

§ a. Liebermann-Burchard

b. Ácido Fosfotúngstico

c. Sangue-Gelatina

TABELA 10. Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema
 II. (1-Butanol:etanol:água, 1 + 1 + 1) §

Revela- dor	Amostras										
	P ₂₈	P ₄₂	P ₃₉	P ₃	S ₃₀	S ₄₂	S ₄₁	E ₄₄	E ₄₅	SBM	SPB
Liebermann-	00	00	00	00	00	--	--	00	00	--	00
-Burchard	58	58	58	71	61	64	64	34	34	40	40
	66	66	66	92	71	68	68	52	52	48	58
	69	69	69		91	71	71	64	64	65	69
						74	74	72	72		
						91	91				

§ - Este sistema não foi satisfatoriamente equilibrado, provavelmente devido à proporção de seus componentes e à pureza dos solventes usados, embora outros autores (1, 12) tenham reportado seu sucesso para fins similares, portanto foi usado apenas o revelador Liebermann-Burchard para detectar os componentes eluídos.

TABELA 11. Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema III. (Butanol:etanol:amônia 25%, 7 + 2 + 5).

Revela dores	Amostras										
	P ₂₈	P ₄₂	P ₃₉	P ₃	S ₃₀	S ₄₂	S ₄₁	E ₄₄	E ₄₅	SBM	SPB
a. §	00	00	00	00	--	--	--	00	00	00	00
	5	5	5	61	24	24	24	25	8	10	10
	10	10	10	91	38	38	38	35	32	21	21
	19	19	19		43	43	43	98	48	34	50
	28	28	28		48	48	48		57		
	32	32	32		51	51	51		95		
	35	35	35		55	55	55				
	40	40	40		58	58	58				
	43	43	43		70	70	70				
					95	95	95				
b. §	--	--	--	00	--	--	--	--	00	--	--
	11	6	6	45	5	5	5	7	11	19	10
	22	11	11	55	12	12	12	19	15	34	38
	27	16	16	88	21	21	21	27	19		43
	35	20	20		33	33	33	34	27		
		28	28		41	41	41		34		
		31	31		45	45	45				
		40	40		47	47	47				
					50	50	50				
					53	53	53				
					59	59	59				
					71	71	71				
					85	85	85				
					91	91	91				
c. §	32	32	32	63	41	41	41	00	00	32	34
					60	60	60				
					85	85	85				

§ a. Liebermann-Burchard

b. Ácido Fosfotúngstico

c. Sangue-Gelatina

TABELA 12. Valores de hrf dos componentes desenvolvidos no sistema IV (Butanol:piridina:água, 6 + 4 + 3).

Revelado res	Amostras										
	P ₂₈	P ₄₂	P ₃₉	P ₃	S ₃₀	S ₄₂	S ₄₁	E ₄₄	E ₄₅	SBM	SPB
a. §	--	--	--	00	--	--	--	00	00	--	00
	47	47	47	74	63	66	66	55	55	36	66
	66	66	66	89	66	73	73	66	66	50	74
	74				73	77	77			61	
					77					66	
b. §	--	--	--	00	--	--	--	00	00	--	--
	40	40	40	74	39	39	39	20	20	35	68
	63	63	63	89	56	56	56	31	31	47	
	69	69	69		63	68	68	55	55	54	
	74				68	73	73	63	63	60	
c. §					73			67	67		
	--	--	--	--	--	--	--	00	00	--	--
	66	66	66	74	39	84	84			36	81
					68					66	
				84							

- § a. Liebermann-Burchard
 b. Ácido Fosfotúngstico
 c. Sangue-Gelatina

TABELA 13. Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema V (Clorofórmio:metanol:água, 65 + 35 + 8)

Revela dores	Amostras										
	P ₂₈	P ₄₂	P ₃₉	P ₃	S ₃₀	S ₄₂	S ₄₁	E ₄₄	E ₄₅	SBM	SPB
a. §	00	00	00	00	--	--	--	00	00	00	00
	7	7	7	98	18	18	18	49	35	4	3
	14	14	14		29	29	29			11	17
	18	18	18		39	39	39			15	25
	20	20	20		50	50	50			22	36
	36	36	36		59	59	59			28	88
	48	48	48		65	65	65			41	
	51	51	51		71	71	71			53	
	55	55	55		77	77	77				
	70	70	70		82	82	82				
b. §	77	77	77		89	89	89				
	91				95	95	95				
	00	00	00	00	00	--	--	00	00	00	00
	6	25	25	97	13	33	33	14	14	5	26
	12	33	33		18	49	49	19	30	14	36
	18	51	51		24	59	59	30	49	22	71
	25	65	65		33	63	63	49		32	85
	33				49	77	77			42	
	45				59	92	92			51	
	51				63	98	98				
c. §	65				67						
	70				77						
	78				81						
					86						
					92						
					98						
	00	00	00	00	--	--	--	00	00	00	00
	14	14	14	98	59	59	59			15	25
	20	20	20		72	72	72			20	36
	36	36	36		92	92	92			29	86
				98					41		
									55		

§ a. Liebermann-Burchard

b. Ácido Fosfotúngstico

c. Sangue-Gelatina

TABELA 14. Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema VI (Clorofórmio:acetato de etila:metanol, 4 + 2 + 1).

Revela dores	Amostras										
	P ₂₈	P ₄₂	P ₃₉	P ₃	S ₃₀	S ₄₂	S ₄₁	E ₄₄	E ₄₅	SBM	SPB
a, b [§]	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
	6	6	6	12	6	6	6	5	5		6
	13	13	13	19	10	10	10	12	12		
				27	14	14	14				
				33	20	20	20				
				59	27	27	27				
				79	34	34	34				
				84	40	40	40				
					49	49	49				
					56	56	56				
					66	66	66				
					80	80	80				
	c, §	00	00	00	00	--	--	--	00	00	00
6		6	6	12	7	7	7	6	6		5
				18	13	13	13				
				28	19	19	19				
				48	27	27	27				
				85	34	41	41				
					41	80	80				
					50						
					56						
					80						

- § a. Liebermann-Burchard
 b. Ácido fosfotúngstico
 c. Sangue-Gelatina

TABELA 15. Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema VII (Benzeno:acetona:metanol, 5 + 5 + 1).

Revela dores	Amostras										
	P ₂₈	P ₄₂	P ₃₉	P ₃	S ₃₀	S ₄₂	S ₄₁	E ₄₄	E ₄₅	SBM	SPB
a,b [§]	00	00	00	--	00	00	00	00	00	00	00
	3	3	3	5	4	4	4	3	3	3	3
	10	10	10	22	9	9	9	10	10	8	8
	24			49	13	13	13	15	15		
				85	26	26	26	25	25		
					35	57	57				
					44	72	72				
					57	82	82				
					72						
					75						
c, [§]	00	00	00	--	--	--	--	00	00	00	00
				5	5	12	12				
				50	12	36	36				
					25	55	55				
					36	70	70				
					55						
					70						
					82						

- § a. Liebermann-Burchard
 b. Ácido fosfotúngstico
 c. Sangue-Gelatina

TABELA 16. Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema VIII (Hexana:clorofórmio:acetato de etila, 5 + 1 + 1).

Revela dores	Amostras										
	P ₂₈	P ₄₂	P ₃₉	P ₃	S ₃₀	S ₄₂	S ₄₂	E ₄₄	E ₄₅	SBM	SPB
a, b [§]	00	00	00	00	00	00	00	00	00	--	--
	23	23	23	29	4	4	4			27	27
	45			42	13	40	40			55	55
	52			57	24	58	58			92	
	95			83	40	70	70				
				96	58	95	95				
c, §					70						
					95						
	--	--	--	--	--	--	--	00	00	--	--
	25	25	25	5	5	5	5			28	28
54	54	54	31	25	25	25			56	56	
				43	43	43					

- § a. Liebermann-Burchard
 b. Ácido fosfotúngstico
 c. Sangue-Gelatina.

TABELA 17. Valores de hRf dos componentes desenvolvidos no sistema IX (Benzeno:clorofórmio:acetona, 4 + 2 + 1).

Revela dores	Amostras										
	P ₂₈	P ₄₂	P ₃₉	P ₃	S ₃₀	S ₄₂	S ₄₂	E ₄₄	E ₄₅	SBM	SPB
a, b [§]	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
	21			12	4	4	4				
				18	8	8	8				
				32	14	14	14				
				65	19	19	19				
				75	39	91	91				
				87	47						
					60						
					69						
					77						
					91						
c, §	00	00	00	00	--	--	--	00	00	00	00
	22			7	8	8	8				
				13	14	14	14				
				30	26	26	26				
				89	38	38	38				
					69	90	90				
					90						

- § a. Liebermann-Burchard
 b. Ácido fosfotúngstico
 c. Sangue-Gelatina

TABELA 18. Comparação dos resultados obtidos com os métodos tentativos para a detecção das saponinas da quinua.

Amostra	Altura da espuma (mm)	Hemólise (%)	E _{1%} 1cm (470mm)	Cromatografia em camada delgada (§)	
				(a)	(b)
P ₂₈	12,0	30,20	44,8	12	4
P ₄₂	10,0	100,67	3,6	11	4
P ₃₉	13,0	27,52	0,8	11	4
P ₃	0,0	62,42	-	2	2
S ₃₀	0,0	177,18	-	11	4
S ₄₂	0,1	105,36	-	11	3
S ₄₁	0,0	71,82	-	11	3
E ₄₄	25,0	79,19	44,8	2	1
E ₄₅	2,0	80,54	68,8	2	1
SBM	15,0	100,00	1,0	8	6
SPB	9,0	69,80	11,0	6	4

§ - Número de compostos desenvolvidos no sistema V (Clorofórmio; metanol; água, 65 + 35 + 8), usando os reveladores: a) Liebermann-Burchard, b) Sangue-Gelatina.

Da simples contagem das manchas cromatográficas formadas pelas amostras e padrões nos nove sistemas de desenvolvimento, pode-se observar que, nos sistemas I, III e V, as amostras P₂₈, P₂₄, P₃₉, E₄₄ e E₄₅, SBM e SPB mostraram o maior número de manchas, sendo que o número máximo correspondeu à amostra P₂₈ no sistema V.

Esses fatos sugerem que, dada a polaridade dos solventes, as amostras contêm componentes de natureza relativamente polar. No entanto, as amostras P₃, S₃₀, S₄₂, e S₄₁ que apresentaram maior número de manchas com os sistemas menos polares VI, VII, IX, contêm componentes de natureza não polar.

Sendo bem conhecido o fato das saponinas serem compostos polares, é de se esperar que os extratos P₂₈, P₄₂, P₃₉, E₄₄ e E₃₅ possuam saponinas, o que foi verificado pelas propriedades hemolizantes que suas manchas apresentaram.

Se bem que os extratos considerados como não saponídeos (P₃, S₃₀, S₄₂ e S₄₁) também apresentaram alguma atividade hemolisante, os mesmos não mostraram manchas, de forma geral concordantes com os padrões SBM ou SPB nos seus valores de R_F, como pode ser observado na parte "C" das tabelas 6 a 14. O oposto por outro lado, ficou evidenciado que existe concordância entre os valores de R_F de algumas das manchas dos extratos polares e das saponinas-padrão.

As saponinas-padrão SBM e SPB apresentaram duas ou mais manchas em quase todos os sistemas de desenvolvimento, o que indica que tais "padrões" são misturas de saponinas, confirmando assim o já estabelecido a respeito de SBM (40). A falta de coincidência entre as manchas produzidas por cada padrão é também indicação de diferentes inerentes às duas saponinas.

Entre os sistemas testados, o sistema V (clorofórmio: metanol; água, 65+35+8) foi o que melhores resultados forneceu, e foi neste sistema que as diferenças foram bem marcantes entre as amostras e padrões, dando sempre valores mais precisos. Entre os fatores aos quais pode-se atribuir a precisão dos resultados estão: o bom equilíbrio do sistema, devido à proporção de seus componentes e a polaridade do solvente em relação à dos componentes da amostra. O mesmo sistema é frequentemente empregado na cromatografia das saponinas, só que as proporções clorofórmio:metanol:água variam às vezes, dependendo da pureza dos solventes ou da temperatura do meio-ambiente (1, 10, 128, 66, 27).

Mesmo não sendo conhecido como específico para todo tipo de saponinas (1, 128, 32), o reagente de Liebermann-Burchard produz os melhores resultados devido à sua maior sensibilidade e à nitidez e estabilidade das manchas.

Cabe ressaltar que o revelador sangue-gelatina, pela sua sensibilidade e a sua facilidade de uso constitui, ainda, o melhor revelador ou detector, não sendo perfeito apenas pela interferência que apresentam algumas impurezas.

4.2.3. Fracionamento

A quantidade de 0,50 g do padrão SBM e uma alíquota de 20.00g do extrato de quinua insolúvel em éter, denominada P₂₈, foram fracionados por cromatografia em coluna (item 3.4.6), dando os resultados apresentados nas tabelas 19 a 24.

TABELA 19. Distribuição e concentração relativas dos componentes das frações do SBM, demonstradas por cromatografia em Camada delgada.

Tubos Nºs	Fração	Rf dos Componentes Detectados *							
		0,00	0,04	0,09	0,15	0,20	0,28	0,39	0,53
1-7	I	+	-	-	-	-	-	-	+++
8-17	II	+	-	-	-	-	+++	+++	+++
18-20	III	+	-	-	-	+++	++++	++	-
21-37	IV	+	-	-	-	++++	++	-	-
38-54	V	+	-	-	++++	++++	-	-	-
55-61	VI	+	-	++++	++++	-	-	-	-
62-110	VII	+	++++	++++	-	-	-	-	-
111-151	VIII	+	++	+					

* Sistema de desenvolvimento: clorofórmio:metanol:água (65 + 35 + 8), Revelador: Libermann-Burchard.

TABELA 20. Distribuição e concentrações relativas, dos componentes das frações do extrato P₂₈, demonstradas por cromatografia em camada delgada.

Tubos Nºs	Fração	Rf dos Componentes Detectados*											
		0.00	0.07	0.14	0.18	0.22	0.32	0.45	0.52	0.59	0.70	0.79	0.92
1-7	A	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	+++	+++
31-50	B	-	-	-	-	-	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++
51-85	C	+	-	-	++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+++	++
86-105	D	++	-	+++	+++++	+++++	++++	+++	+++	+++	++	+	+
106-290	E	+++	++++	+++++	+++++	+++++	++++	+++	+++	++	+	-	-
291-320	F	+++	++++	+++++	++++	+++	+++	++	++	+	-	-	-

* Sistema de desenvolvimento; clorofórmio:metanol:água (65 + 35 + 8), Revelador: Sangue-Gelatina.

TABELA 21. Distribuição e concentrações relativas, dos componentes das frações da SBM, demonstradas por cromatografia em camada delgada.

Tubos Nºs	Frações	Rf dos Componentes Detectados *					
		0.00	0.15	0.20	0.29	0.41	0.55
1-7	I	-	-	-	-	-	+
8-17	II	-	-	-	-	+++++	+
18-20	III	-	-	-	++++	++++	-
21-37	IV	-	-	+++++	+++++	-	-
38-54	V	-	+++++	++++	-	-	-
55-61	VI	-	-	-	-	-	-
62-110	VII	-	-	-	-	-	-
111-151	VIII	-	-	-	-	-	-

* Sistema de desenvolvimento; clorofórmio:metanol:água (65 + 35 + 8),
Revelador: Sangue-Gelatina.

TABELA 22: Distribuição e concentrações relativas, dos componentes das frações do extrato P₂₈, demonstradas por cromatografia em camada delgada.

Tubos Nºs	Fração	Rf dos Componentes Detectados *				
		0.00	0.14	0.20	0.32	0.58
1-30	A	-	-	-	-	+
31-50	B	-	-	-	+++	++
51-85	C	-	-	+++	++	+
86-105	D	+	++	+++	++	+
106-290	E	+++	++++	+++++	+++	+
291-320	F	++++	+++	++	+	-

* Sistema do desenvolvimento; clorofórmio; metanol; água (65 + 35 + 8), Revelador: Sangue-Gelatina.

TABELA 23. Concentrações relativas, dos componentes das sub-frações da fração E, demonstradas por cromatografia em camada delgada.

Tubos Nºs	Fração	Rf dos Componentes Detectados *											
		0.00	0.04	0.09	0.15	0.18	0.25	0.32	0.44	0.52	0.59	0.67	
46-55	E ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
56-65	E ₂	-	--	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++
66-85	E ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++++	+
86-95	E ₄	-	-	-	-	-	-	-	++	++++	+++	+++	-
96-125	E ₅	-	-	-	-	-	+++	+++++	++++	+++	+	+	-
126-179	E ₆	-	-	-	-	+	++++	+++++	+++	+	-	-	-
180-269	E ₇	-	-	-	-	++++	++++	+++	+	-	-	-	-
270-310	E ₈	-	-	-	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
311-360	E ₉	-	+	++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
361-500	E ₁₀	+	+++	++++	++++	+	-	-	-	-	-	-	-
501-509	E ₁₁	++	++++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
510-545	E ₁₂	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
546-800	E ₁₃	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Sistema do desenvolvimento; clorofórmio; metanol; água (65 + 35 + 8) Revelador: Libermann-Burchard.

TABELA 24. Concentrações relativas demonstrados por cromatografia em camada delgada das sub-frações da fração E.

Tubos Nºs	Fração	Rf dos Componentes Detectados						
		0.00	0.09	0.18	0.26	0.32	0.44	0.60
26-55	E ₁	-	-	-	-	-	-	-
56-65	E ₂	-	-	-	-	-	-	+
66-85	E ₃	-	-	-	-	-	-	+++
86-95	E ₄	-	-	-	-	-	+	+++
96-125	E ₅	-	-	-	++	++++	+++	+
126-179	E ₆	-	-	+	++++	+++	+	-
180-269	E ₇	-	-	+++	++	+	-	-
270-310	E ₈	+	+++	++	+	-	-	-
311-360	E ₉	++++	++++	+	-	-	-	-
361-500	E ₁₀	+	+++++	+	-	-	-	-
501-509	E ₁₁	+	-	-	-	-	-	-
510-545	E ₁₂	++	-	-	-	-	-	-
546-800	E ₁₃	+	-	-	-	-	-	-

* Sistema de desenvolvimento; clorofórmio; metanol; água (65 + 35 + 8), Revelador: Sangue-Gelatina.

O perfil de fracionamento do padrão SBM apresentado nas tabelas 19 e 21 sugeriu que a relação de 50:1 de adsorvente para amostra, numa coluna de 30 x 2 cm, foi adequada para os nossos propósitos; a detecção de oito componentes com o reagente Liebermann-Burchard e de cinco componentes com o reagente sangue-gelatina indica que, pelo menos, três componentes com Rfs de 0,00, 0,04 e 0,09 respectivamente são de natureza diferente das saponinas e que as acompanham como contaminantes.

A detecção de cinco componentes que causaram hemólise na placa vêm a confirmar que este padrão (SBM) é uma mistura de saponinas (40).

O padrão SBM, antes de ser submetido ao fracionamento, apresentou um componente de Rf 0,00 que hemolisou as hemácias na placa, mas não foi detectado depois do fracionamento na coluna. Isto sugeriu que o fracionamento favoreceu o desenvolvimento e separação dos componentes na camada delgada; assim, o componente com Rf 0,00 que antes apresentava hemólise depois do fracionamento, não apresentou tal característica, indicando contaminação com componentes de poder hemolítico.

A amostra P₂₈, cuja procedência é explicada no diagrama 1, foi submetida a fracionamento devido ao fato de ela possuir características similares às das saponinas, ainda com maior expressão dentro de outros extratos, que também apresentaram componentes com as características das saponinas.

A relação 10:1 de adsorvente para amostra P₂₈ numa coluna de 55 x 4 cm, cujo perfil de fracionamento se dá nas tabelas 20 e 22, foi feita para eliminar algumas frações com componentes que

não apresentaram positividade para a hemólise e para obter, desta forma, um menor número de componentes numa fração que preenchesse as características das saponinas da amostra P₂₈; isso se obteve na fração E, a qual foi fracionada numa relação de 50:1 de adsorvente para amostra numa coluna de 55 x 4 cm.

A distribuição e concentrações relativas dos componentes das sub-frações da fração E apresentadas nas tabelas 23 e 24 mostraram um perfil de fracionamento que sugeriu que a relação de 50:1 de adsorvente para amostra e o volume de coleta foram adequados, embora se tenha frações que apresentaram mais de um componente, provavelmente devido às condições de fracionamento que não foram ótimas, porém pode-se assumir que cada sub-fração possui um dos componentes em maior concentração.

Dos onze componentes detectados com o reagente Liebermann-Burchard (tabela 23), somente sete (tabela 24) apresentaram reação positiva com o reagente sangue-gelatina, o que permitiu supor que, tanto a fração E como o extrato P₂₈ e, por sua vez, a quinua variedade Kancolla, apresentam sete componentes que hemolisam as hemácias na camada delgada, sendo provavelmente os mesmos de natureza saponosídea.

O fracionamento do extrato P₂₈ também aumentou a facilidade com que se separaram seus componentes. Antes do fracionamento, por exemplo, o extrato acusava quatro manchas com poder hemolítico (tabela 13), as quais passaram para cinco depois da primeira coluna (fração representativa E, tabela 22) e para um total de sete depois da segunda coluna (tabela 24).

O emprego do gradiente de solventes foi para eluir os compo

mentos com menor Rf que, apesar de apresentarem forte positividade ao reagente de Liebermann-Burchard, deram apenas traços de hemólise, provavelmente devido à contaminação com os componentes de maior Rf e alto poder hemolisante.

O fato de os sistemas de eluição $\text{HCCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Me}:\text{H}_2\text{O}$, assim como da sílica gel G terem sido usados para purificar saponinas triterpênicas por outros autores (136, 66, 139, 27, 13, 46), sugere que os componentes com características de saponinas aqui detectadas sejam de natureza triterpênica.

4.2.4. Hidrólise das saponinas e extração das sapogeninas

Com base nos resultados apresentados nas tabelas 19, 21, 23 e 24, selecionaram-se as frações I, II, III, IV e V da SBM, as sub-frações E_3 , E_5 , E_7 , E_9 , E_{10} e E_{12} da fração E, extrato P_{28} e a saponina esteróide Digitonina para a hidrólise.

As amostras e padrões foram previamente secados a vácuo, como aparece descrito no item 3.4.7, registrando-se os pesos que aparecem na tabela 25.

Em seguida as mesmas foram dissolvidas no meio da hidrólise composta por Dioxano:água (1:1) que, segundo alguns autores (35, 83), proporciona as melhores condições para a hidrólise das saponinas. Outros autores, porém, têm usado o Dioxano:Benzeno (66), Metanol (27), Etanol:água (93), ou simplesmente água (81).

A temperatura e o tempo da hidrólise (110°C por 6 horas) foram estabelecidos como parâmetros sujeitos à modificação, sem se pretender otimizá-los nesta pesquisa. Geralmente o tempo da hidró

lise varia em função da temperatura e do meio da reação, assim, pode-se empregar por 1 hora a ebulição vigorosa (35, 83), 110°C por 12 horas (66), 80°C por 3 horas (27) refluxo por 60 horas (93), etc.

O agente hidrolisante empregado aqui foi o ácido sulfúrico 12 N, também usado por outros autores (35, 83), embora outros autores preferiram o HCl a 12% (93), ácido sulfúrico a 5% ou 12% (66,81) e, até ácido oxálico a 10% (27).

Após a hidrólise, extraíram-se as saponinas com clorofórmio, como foi descrito no item 3.4.8.

Durante a extração, invariavelmente apareceu uma interfase nas frações e no padrão (interfase I, Diagrama 2) de aspecto resinoso e insolúvel em água, metanol, benzeno e etanol; tratando-se possivelmente de huminas ou produtos de degradação dos carboidratos, como já fora sugerido por outro autor (5). Ficou claro, portanto, que nessas condições de hidrólise não seriam as mais apropriadas, caso estivéssemos interessados na determinação quantitativa dos açúcares constituintes das saponinas. O meio Dioxano:água é vantajoso para a recuperação das saponinas em virtude da pouca solubilidade que oferece às mesmas, uma vez que são liberadas na hidrólise.

No passo seguinte de lavagem feita à base de solução clorofórmica com NaHCO₃ a 2% para eliminar interferentes de natureza fenólica ou alguns pigmentos (37, 144), houve a formação de outra interfase (interfase II, Diagrama 2). Devido à possibilidade desta interfase conter saponinas triterpênicas (37), a mesma foi separada, lavada com água para eliminação dos restos de bicarbonato de sódio, e depois secada para verificação posterior por camada delgada

TABELA 25. Pesos das frações e do padrão Digitonina usados na hi
drólise e, peso e porcentagem de suas respectivas inter
fase II.

Frações e Padrão	Peso das Fra- ções e Padrão (g)	Peso da <u>Inter</u> fase II [§] (g)	Porcentagem da <u>Interfase</u> II (%)
E ₃	0.0345	0.0015	4.35
E ₅	0.0725	0.0010	1.38
E ₇	0.2638	0.0019	0.72
E ₉	0.0718	0.0018	2.51
E ₁₀	0.1280	0.0020	1.56
E ₁₂	0.1697	0.0033	1.94
I	0.2356	0.0016	0.68
II	0.1031	0.0011	1.07
III	0.0498	0.0013	2.61
IV	0.1445	0.0010	0.69
V	1.1466	0.0030	2.05
P ₂₈	1.0000	0.0131	1.31
Digitonina	0.1000	0.000	0.0

§ Dadas as baixas quantidades recuperadas, o erro é relativamente
alto.

da.

A interfase II apresentou-se em todas as sub-frações do extrato P₂₈ e da SBM, sendo que o extrato próprio P₂₈ a produz em maior quantidade (tabela 25). Esta constituiu a primeira indicação da natureza triterpênica (37) das saponinas da quinua, assim como da SBM (sobre a qual não foi possível obter informação alguma do fabricante). Como era de se esperar, a digitonina não apresentou a interfase II.

4.2.5. Detecção das sapogeninas por cromatografia em camada delgada.

Para seleccionar o sistema de desenvolvimento a ser empregado, testaram-se os sistemas descritos no item 3.4.9, utilizando como padrão o ácido oleanólico e, como revelador, o reagente de Liebermann-Burchard. O melhor desenvolvimento foi obtido com o sistema clorofórmio:metanol (9,3:0.7), cujos resultados são apresentados nas tabelas 26 e 27 frente ao padrão ácido oleanólico.

A tabela 26 apresenta os diferentes produtos aglicônicos (ou sapogeninas) formados durante a hidrólise das cinco frações da saponina branca merck (SBM), de cada fração e sua respectiva interfase II e dos produtos da digitonina (Digitonina-Sg). De forma análoga, a tabela 27 contém os produtos das sub-frações E₃, E₅, E₇, E₉, E₁₀, e E₁₂, do extrato P₂₈, da digitonina-Sg e de suas correspondentes interfases II.

O ácido oleanólico foi escolhido como padrão por ser uma das sapogeninas das mais conhecidas e por estar amplamente distri

TABELA 26. Cromatografia em camada delgada: componentes agluçônicos presentes nos hidrolisados das frações da SBM. Como comparação, apresentam-se a digitonina hidrolisada e o ácido oleanólico. Solvente: CHCl_3 :MeOH (9,3 + 0,7). Revelador: Liebermann-Burchard. Os signos representam a concentração relativa.

Amostras e Padrões	Rf dos Componentes Detectados															
	0.00	0.06	0.09	0.12	0.14	0.17	0.18	0.21	0.27	0.29	0.33	0.42	0.45	0.57	0.62	0.77
I	+	-	-	-	-	-	-	+++	-	++	+++	-	-	++++	-	+++++
Interf.II-I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
⁸ II	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++++	-	+++	++	+++++
⁵ Interf.II-II	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
III	++	-	+	+++	++	-	-	-	-	+	++	-	++	++	++	+
Interf.II-III	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IV	+++	-	+	+++	+	-	-	-	-	++	+	-	++	+	+	++
Interf.II-IV	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	+++	-	+	++	-	-	++	++	-	+	++	-	+++	-	-	+
Interf.II-V	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
Digitonina SG	+++++	++	++	-	-	++	-	-	+++++	-	-	-	++	-	-	-
Ácido Oleanólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++++	-	+	-

TABELA 27. Cromatografia em camada delgada: Componentes aglucônicos das sub-frações "E" e das saponinas-padrão hidrolisadas usando um sistema de desenvolvimento $\text{HCCl}_3:\text{MeOH}$ (9,3 + 0,7) e revelando com o reagente Liebermann-Burchard: Os signos representam a concentração relativa.

Amostras e Padrões	Rf dos Componentes Detectados													
	0.00	0.04	0.06	0.08	0.09	0.14	0.17	0.18	0.27	0.29	0.34	0.45	0.62	0.79
E ₃	++	-	-	+++	-	++	-	-	-	+	-	++	-	++++
Interfase II-E ₃	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
E ₅	+	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++	+	+++++
Interfase II-E ₅	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
E ₇	+++++	-	-	-	-	+++	-	-	-	+	-	++	++	+++++
06 Interfase II-E ₇	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E ₉	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+++	+++	++
Interfase II-E ₉	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
E ₁₀	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	+++	++	+++
Interfase II-E ₁₀	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
E ₁₂	+++	-	-	-	-	+	-	-	-	+++	-	++	++	+++
Interfase II-E ₁₂	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P ₂₈	+++++	+	-	+	-	++++	-	+++++	-	+++	+	+++++	+	+++
Interfase II-28	+++++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	++	-	-
Digitonina-SG	+++++	-	++	-	++	-	++	-	++++	-	-	++	-	-
Ácido Oleanólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++++	+	-

buída dentro das saponinas triterpênicas. Seu desenvolvimento cro
matográfico, que apresentou manchas a Rf 0,45 (principal) e Rf
0,62, demonstrou não ser de alta pureza, como já tinha sugerido o
fornecedor (69).

Da tabela 26 podemos concluir que as cinco frações da SBM
que produziram hemólise geraram entre cinco e dez sapogeninas ca
da uma, indicando que a composição desta saponina é complexa. É
interessante, por exemplo, notar o fato da fração I apresentar
apenas uma mancha com poder hemolítico (tabela 21), ao passo que a
hidrólise dessa "saponina" aparentemente revela que nela existem
até cinco sapogeninas (tabela 26). Frente à digitonina, as diferen
ças mais marcantes foram a ausência de uma intensa mancha no Rf
0,27 e a baixa quantidade de componentes de alta polaridade em re
lação ao solvente, evidenciada pela baixa intensidade da mancha
na origem (Rf 0,00).

Foi evidente que, tanto as frações III, IV e V, assim como
a digitonina, apresentaram manchas detectáveis na posição do ácido
oleanólico, sugerindo que, embora a digitonina seja considerada co
mo uma saponina eminentemente esteróide, possa esta conter peque
nas quantidades de geninas triterpênicas. Foi necessário observar
que a cor da mancha foi diferente à do ácido oleanólico (amarela
em vez de roxa), podendo ainda se tratar de outro componente dife
rente do AO, como se verá depois. Observou-se também que na mesma
tabela, as interfases II das frações III e V, por sua vez, acusa
vam a presença do suposto ácido oleanólico, fato que também se re
gistrou com as interfases II dos extratos da quinua.

As diferenças anotadas entre as geninas da SBM e da digito

nina foram novamente observadas entre esta última e os extratos da quinua (sub-frações E e extrato P₂₈). Além da mancha predominante na origem (Rf 0,00) e a que aparece na posição do AO (Rf 0,45), estes dois tipos de saponinas não tiveram mais componentes em comum.

No entanto a mancha correspondente a AO esteve presente em todas as sub-frações E, no extrato P₂₈ e na maioria das interfases II.

Não foi possível, com o sistema de solventes usado, resolver quaisquer misturas de componentes que pudessem estar presentes nas manchas de polaridades extremas, ou seja de Rf 0,00 e 0,79.

4.2.6. Cromatografia gás-líquida dos derivados das sapogeninas.

Com base nos resultados apresentados nas tabelas 26 e 27, seleccionaram-se os extratos clorofórmicos dos hidrolisados das seguintes amostras: O extrato P₂₈ e sua interfase II, as sub-frações E₃, E₉ e E₁₀, a SBM e sua fração I e o ácido oleanólico (AO) para uma posterior análise por cromatografia gasosa. Os correspondentes trimetilsilil e trifluoroacetil derivados foram sintetizados e cromatografados como foi descrito nos itens 3.4.10 e 3.4.11 respectivamente.

A tabela 28 identifica e resume as condições experimentais de cada um dos onze cromatogramas subsequentes.

TABELA 28. Identificação dos cromatogramas dos trimetilsilil (TMS) derivados, apresentados nas figuras 2 até a 12.

Cromatograma	Códigos dos TMS-derivados	Coluna	Especificações
1	AO	3% SE-30	0,2 ul da mistura (AO + BSTFA), isoterma de 285°C, a = X8, r = X10
2	P ₂₈	3% SE-30	0,2 ul da mistura (P ₂₈ + BSTFA), isoterma de 285°C, a = X8, r = X10
3	AO-P ₂₈	3% SE-30	0,2 ul da mistura (AO + BSTFA) + (P ₂₈ + BSTFA) na proporção de 0,5 + 1; isoterma de 285°C, a = X8, r = X10
4	AO	3% OV-17	0,2 ul da mistura (AO + BSTFA), programação de 220 - 275°C, 3φ/min. a = X8, r = X10
5	P ₂₈	3% OV-17	0,2 ul da mistura (P ₂₈ + BSTFA), programação 220 - 275, 3φ/min. a = X8, r = X10
6	II-P ₂₈	3% OV-17	0,2 ul da mistura (II-P ₂₈ +BSTFA) programação de 200 - 275°C, 3φ/min. a = X8, r = X10
7	E ₃	3% OV-17	0,2 ul da mistura (E ₃ + BSTFA), programação de 220 - 275°C, 3φ/min. a = X8, r = X10
8	E ₉	3% OV-17	0,2 ul da mistura (E ₉ + BSTFA), programação de 220 - 275°C, 3φ/min. a = X8, r = X10.
9	E ₁₀	3% OV-17	0,2 ul da mistura (E ₁₀ + Piridina + BSTFA), programação 220-275°C, 3φ/min. a = X8, r = X10
10	SBM	3% OV-17	0,2 ul da mistura (SBM+BSTFA+Piridina), programação 220-275°C, 3φ/min. a = X8, r = X10
11	Digitonina	3% OV-17	0,2 ul da mistura (Digitonina+ BSTFA), programação 220-275°C, 3φ/min. a = X8, r = X10.

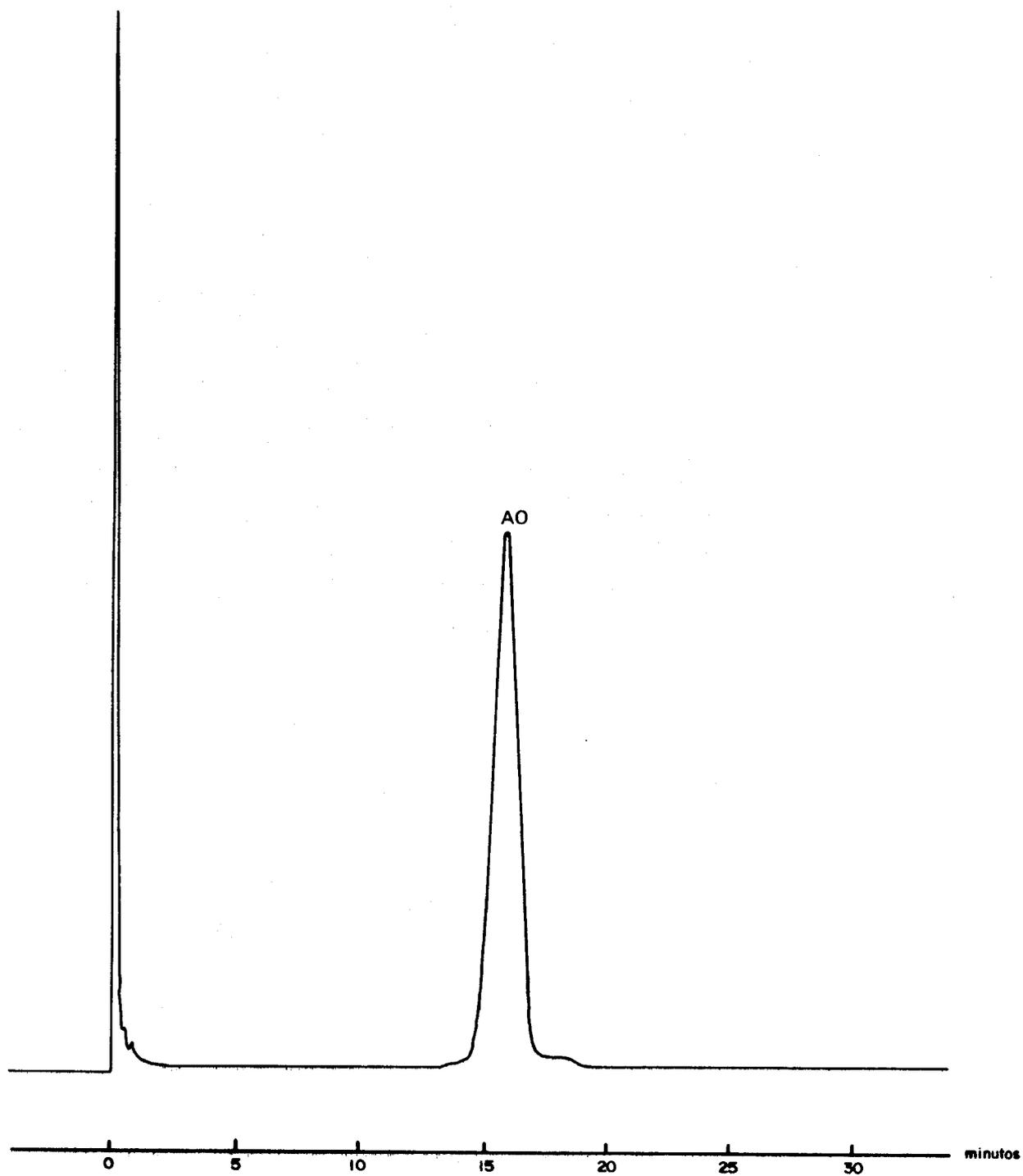


FIGURA 2. CROMATOGRAMA 1: DERIVADOS TMS DO AO, 3% SE-30, 285°C

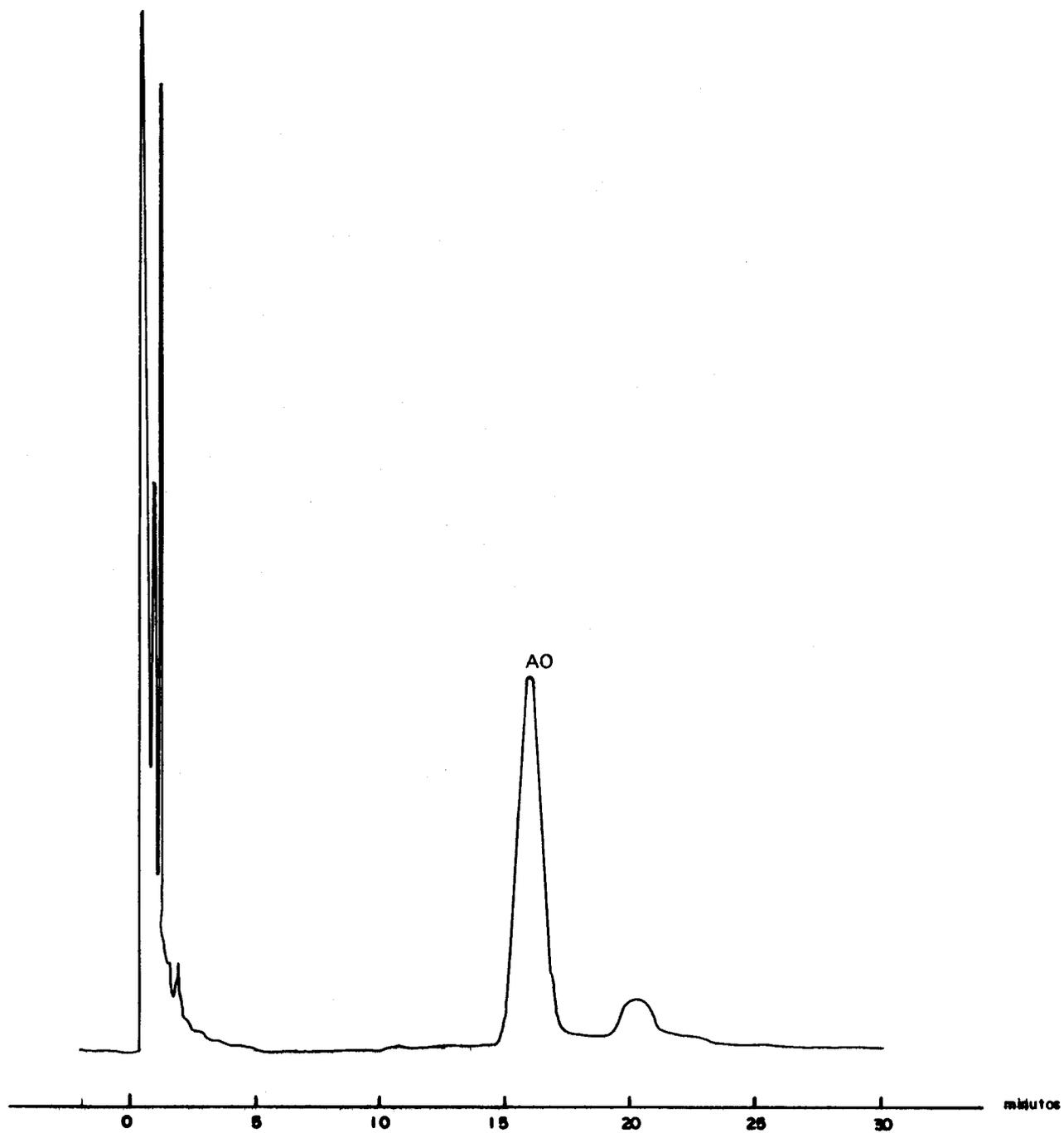


FIGURA 3. CROMATOGRAMA 2: DERIVADOS TMS DO P₂₈, 3% SE 30, 285°C.

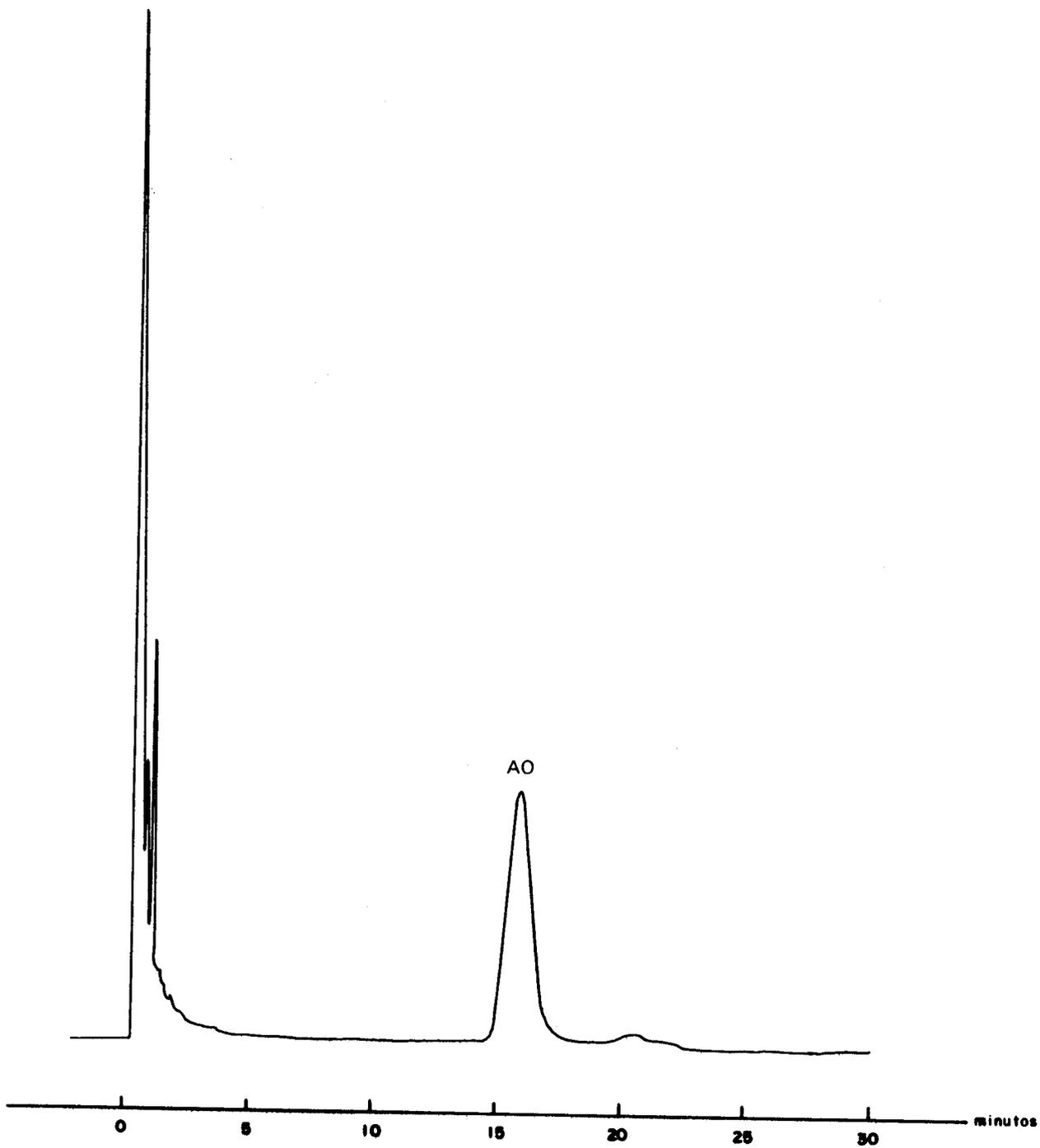


FIGURA 4. CROMATOGRAMA 3: MISTURA DE DERIVADOS TMS DE AO E P₂₈. 3% SE-30, 285°C.

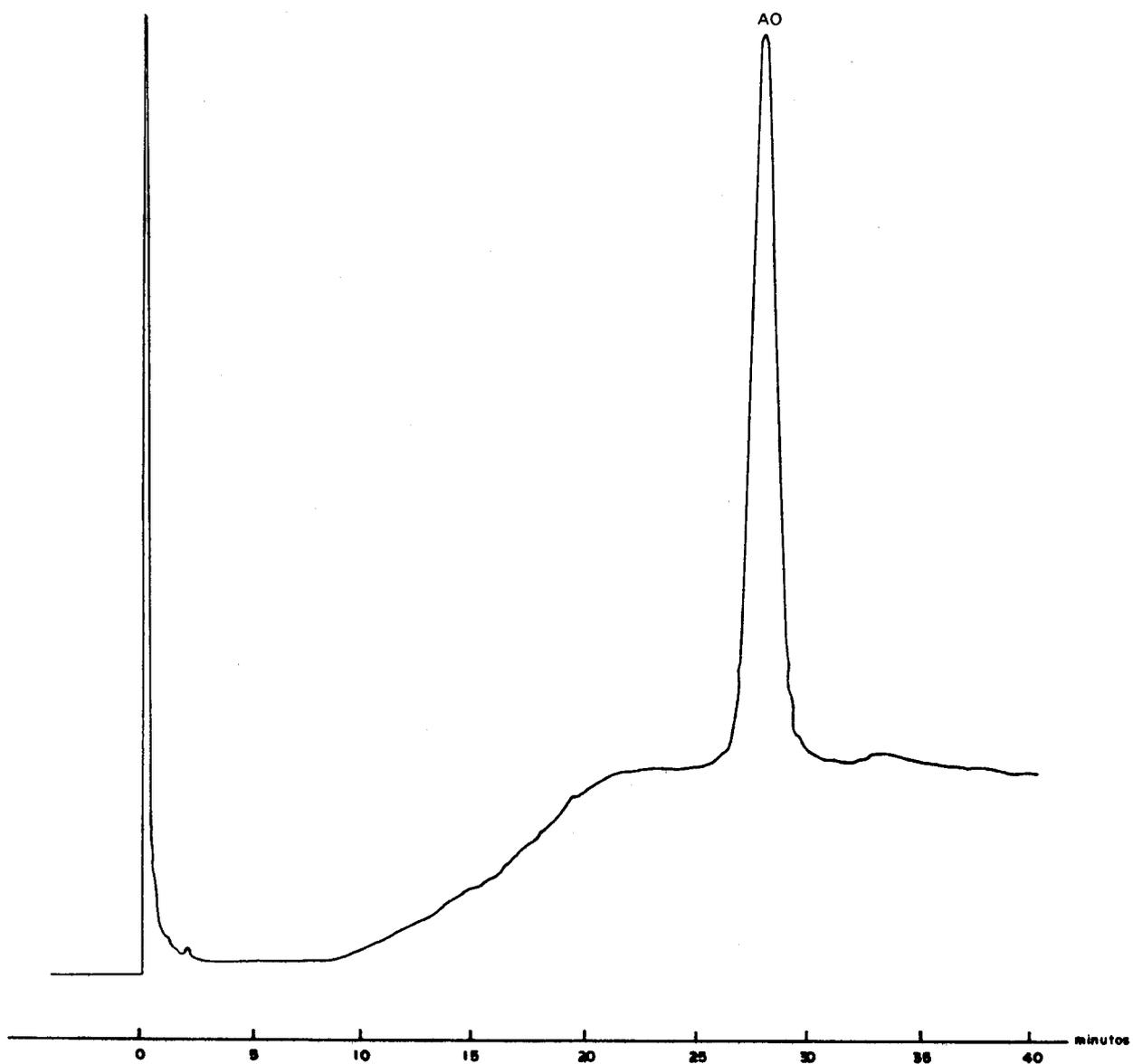


FIGURA 5. CROMATOGRAMA 4: DERIVADOS TMS DO AO, 3% OV-17, 220°C-275°C, 3°/MINUTO.

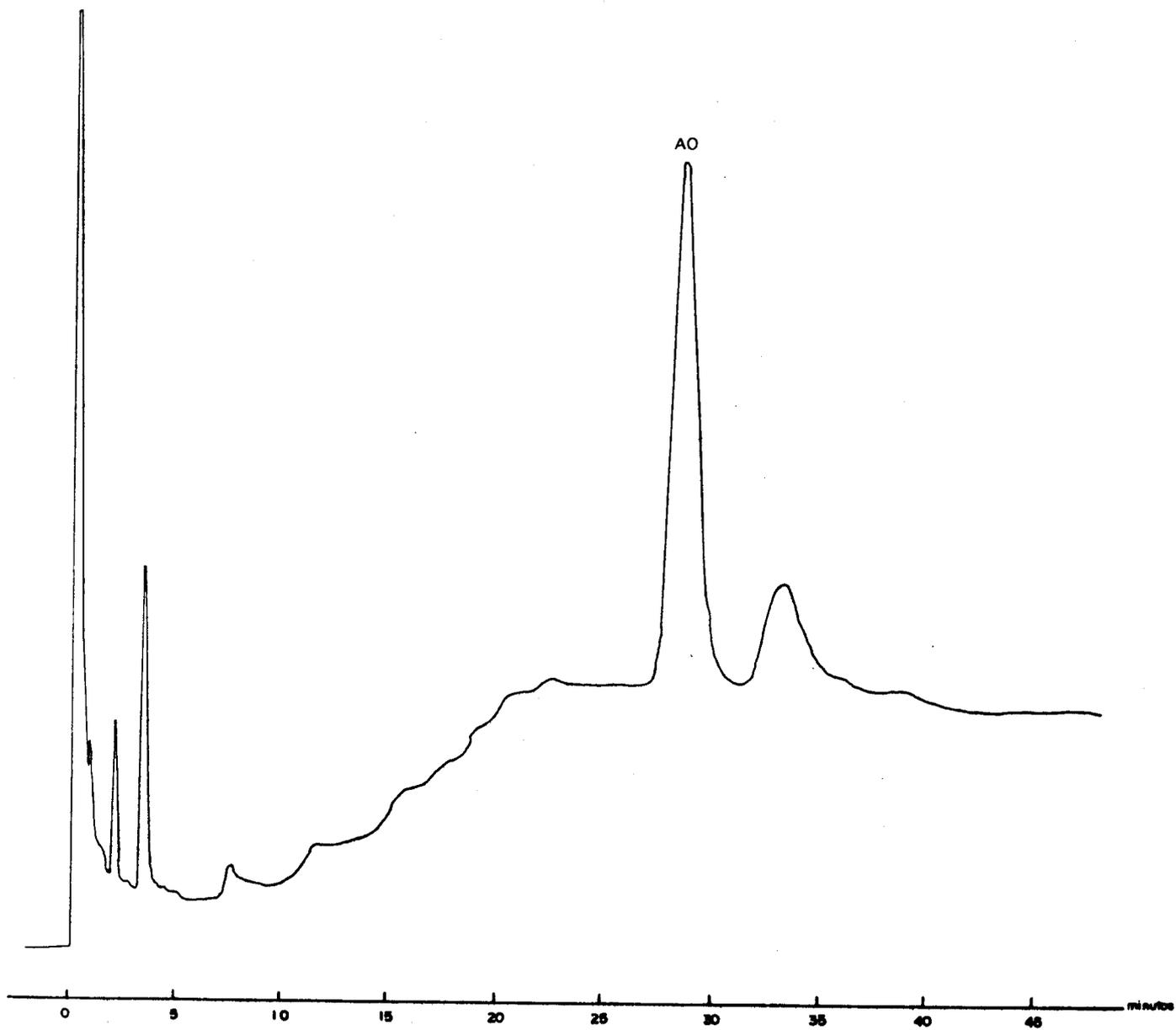


FIGURA 6. CROMATOGRAMA 5: DERIVADOS TMS DO P₂₈, 3% OV-17, 220^o-275^oC, 3^o/MINUTO.

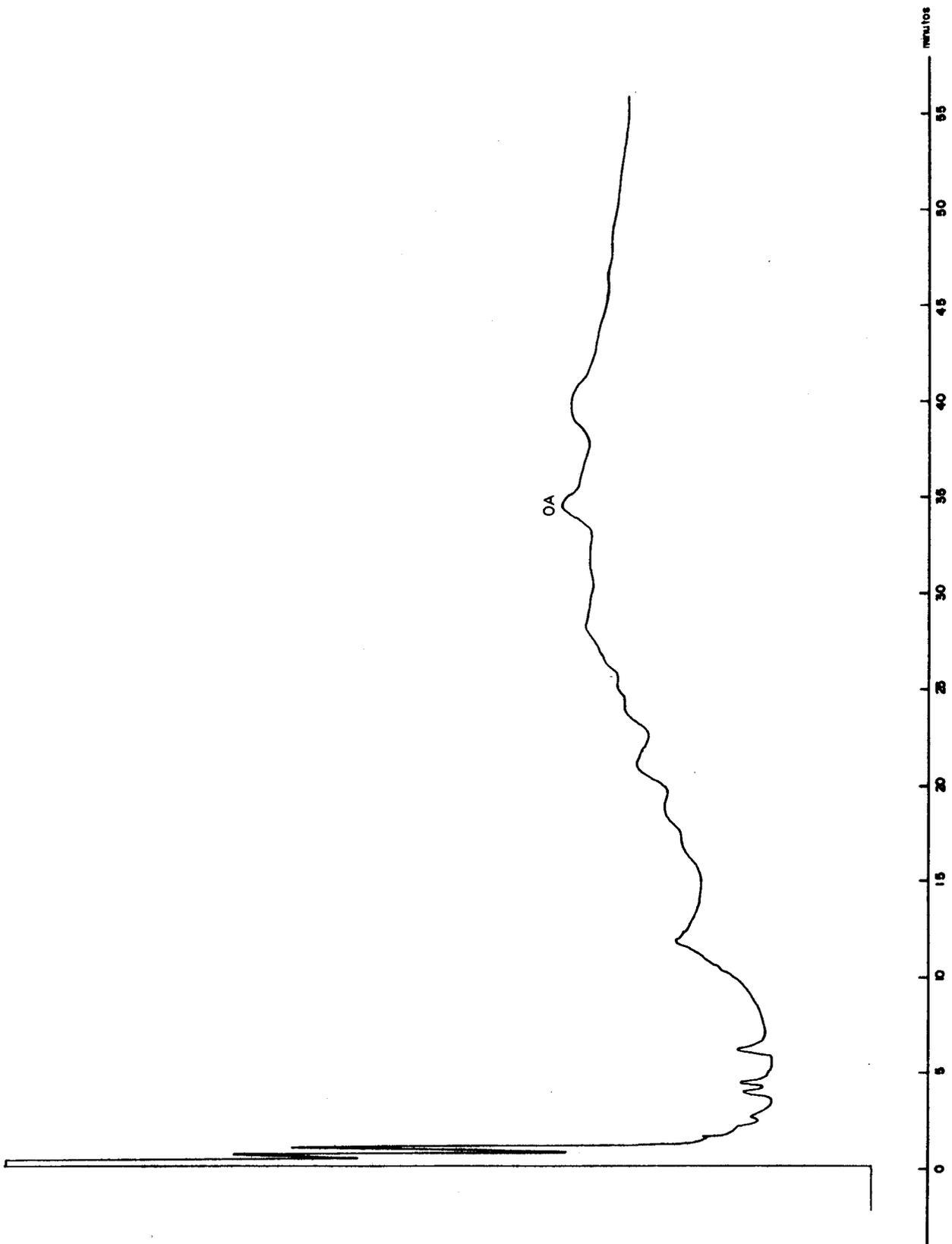


FIGURA 7. CRONOGRAMA 6: DERIVADOS TMS DA INTERFASE II DO P₂₈, 3% OV-17, 200-275°C, 3°/MINUTO.

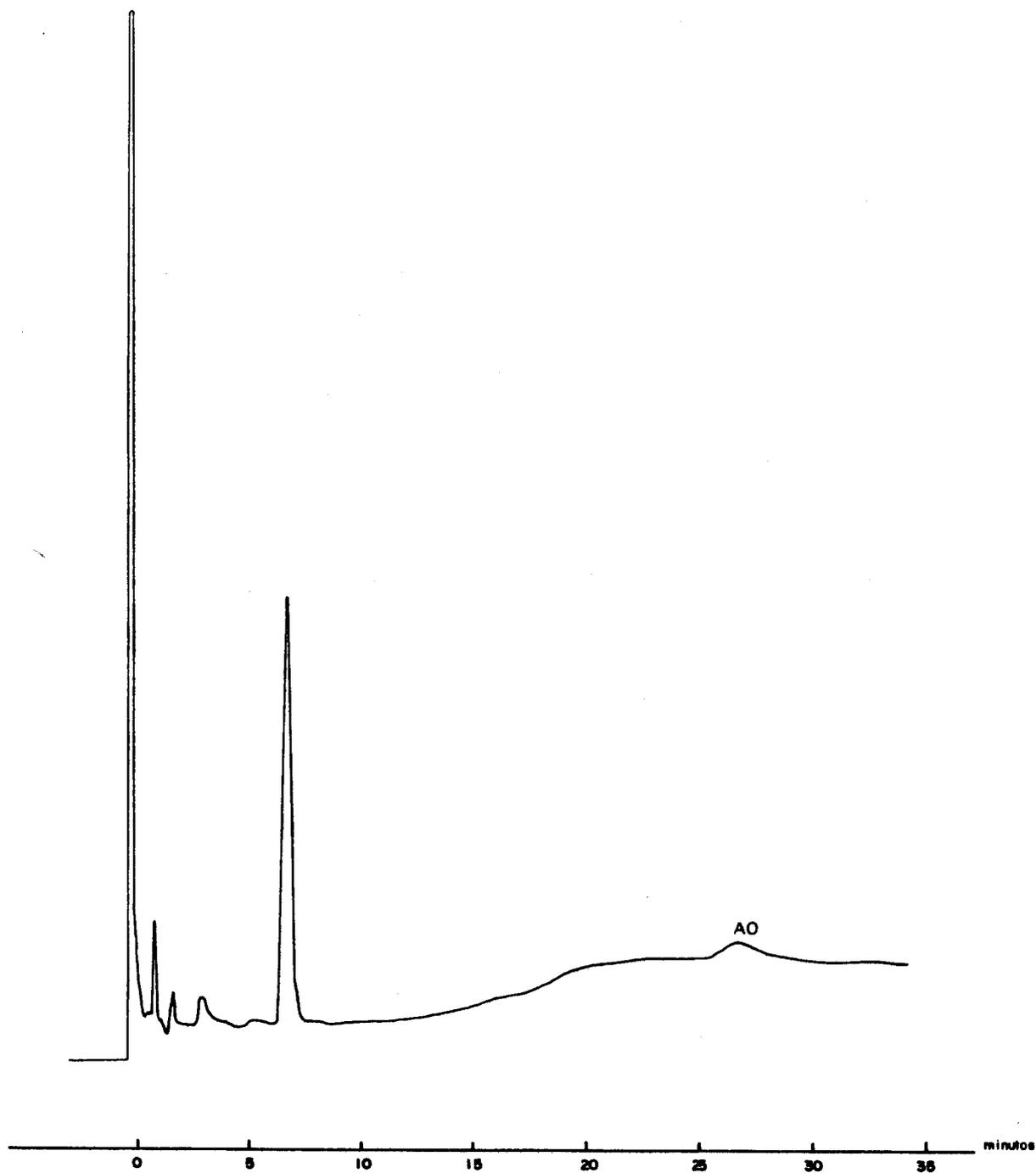


FIGURA 8. CRONOGRAMA 7: DERIVADOS TMS DA E₃. 3% OV-17, 220^o-275^oC, 3^o/MINUTO.

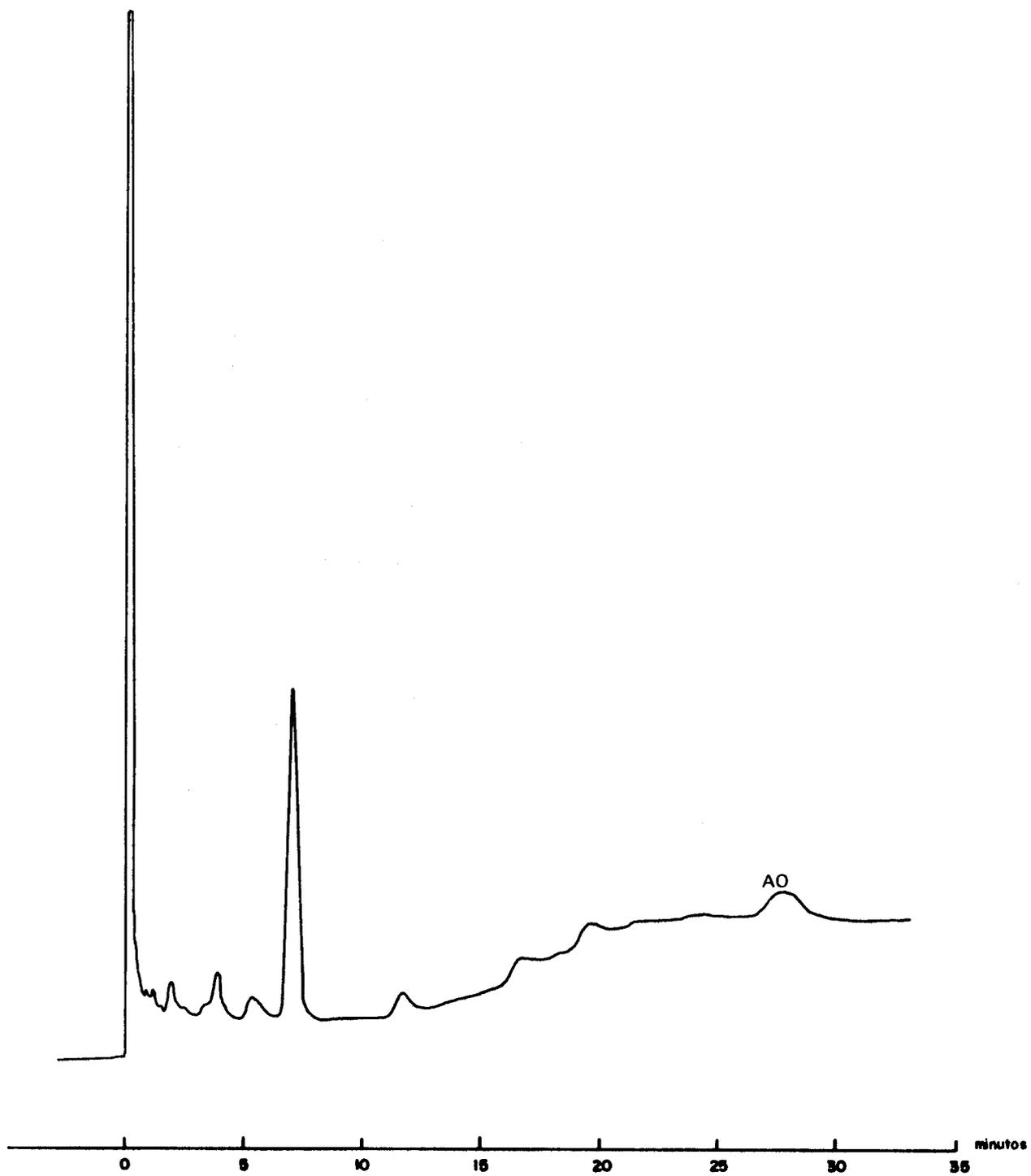


FIGURA 9. CROMATOGRAMA 8: DERIVADOS TMS DA E_g, 3% OV-17, 220° 275°C, 3°/MINUTO.

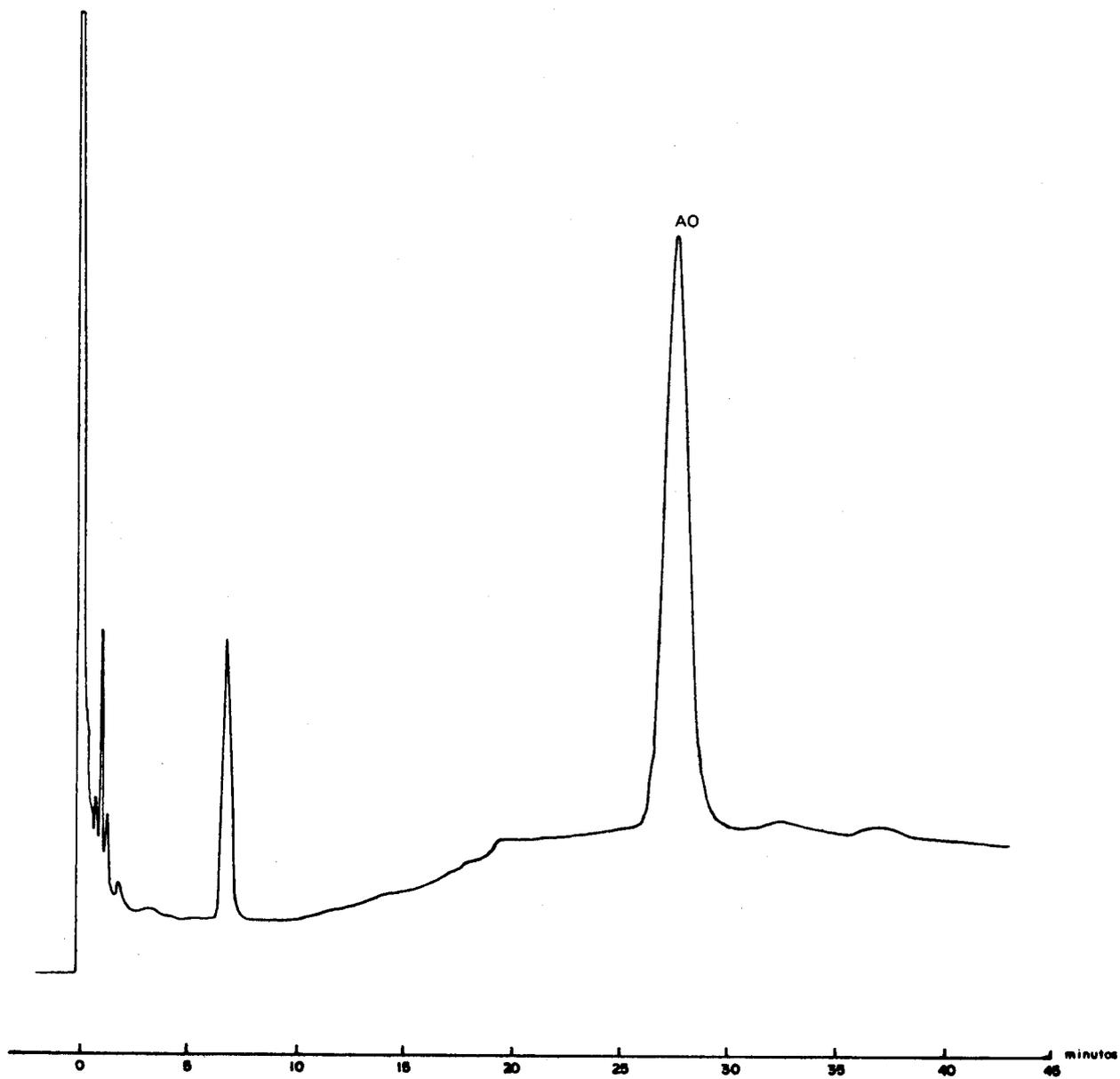


FIGURA 10. CROMATOGRAMA 9: DERIVADOS TMSDA E₁₀. 3% OV-17, 220°-275°C, 3°/MINUTO.

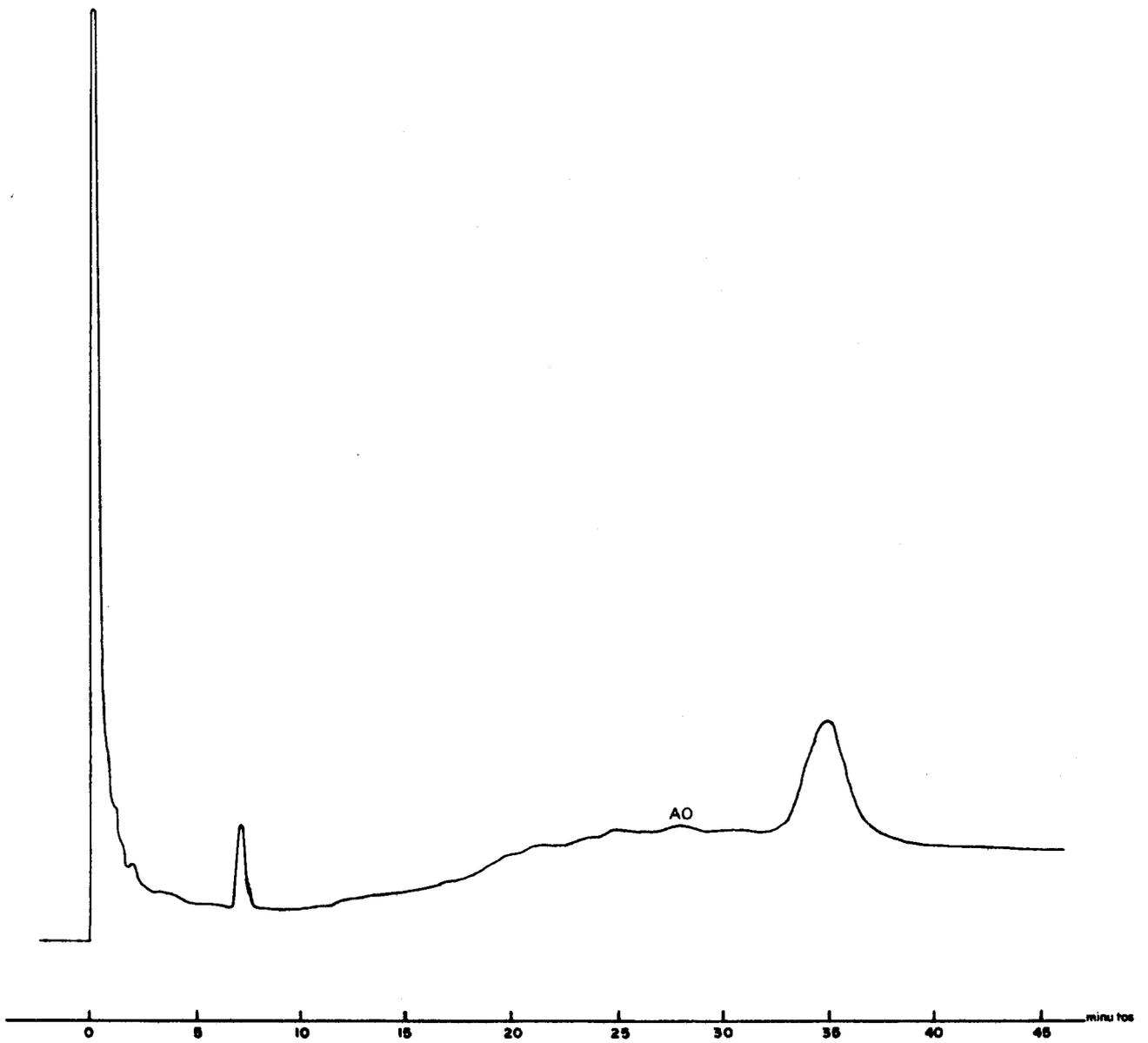


FIGURA 11. CROMATOGRAMA 10: DERIVADOS TMS DA SBM, 3% OV-17, 220^o-275^oC, 3^o/MINUTO.

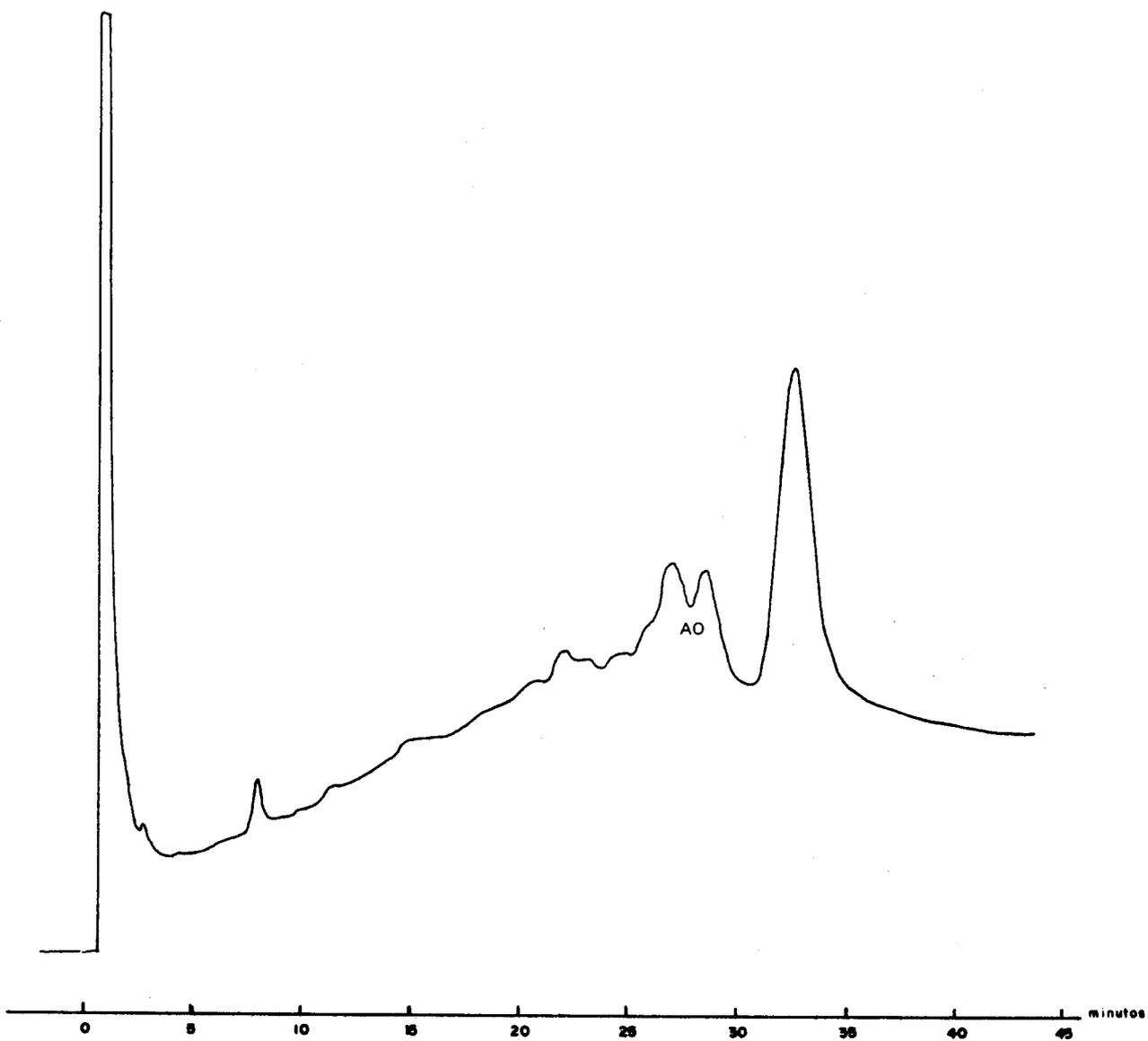


FIGURA 12. CROMATOGRAMA 11: DERIVADOS TMS DA DIGITONINA (EXTRATO SAPOGENINAS), 3% OV-17, 220°-275°C, 3°/MINUTO.

Os cromatogramas Nº 1 e 2 são corridas isotermas do AO e do hidrolisado do extrato P₂₈. Pode-se observar que os tempos de retenção (15,5 min) para o AO e o pico principal (64%, normalização interna) do extrato da quinua foram iguais nos dois casos.

No cromatograma Nº 3 constatou-se a presença de um único pico cromatográfico ($t'_R = 15,5$ min.) quando a amostra injetada consistiu de uma mistura do extrato TMS-P₂₈ e o TMS-AO. Este resultado, confirmado mediante programação térmica na coluna OV-17 (cromatogramas Nº 4 e 5), estabeleceu que o comportamento cromatográfico da sapogenina principal da quinua Kancolla é idêntico ao do ácido oleanólico.

A interfase II do extrato P₂₈, a qual se esperava estivesse composta principalmente por sapogeninas triterpênicas (37), apresentou dezoito picos fracos, discerníveis no cromatograma Nº 6 contra três manchas reveladas na camada delgada (tabela 27). Em virtude do número de picos e do fato de AO aparecer em quantidades relativamente pequenas (15,5%, normalização interna) no cromatograma, confirmou-se a superioridade do teste gás-cromatográfico e concluiu-se que a interfase II não tem potencial como via de purificação do AO.

Já nos perfis cromatográficos com temperatura programada descobriu-se que o hidrolisado do extrato P₂₈ está composto de 12 geninas sililáveis, das quais o AO constitui 64%, depois da normalização interna.

Nos cromatogramas Nº 7, 8 e 9, correspondentes às sub-frações E₃, E₉ e E₁₀, pode-se ver o efeito do fracionamento, em coluna, da fração "E" das saponinas da quinua. O aumento progressivo

da proporção do AO com respeito a uma genina não identificada ($t'_R = 7,5$ min.) foi registrado claramente pela gás-cromatografia dos derivados TMS, não ocorrendo o mesmo através da camada delgada das geninas livres (tabela 27). Nesta comparação dos dois testes cromatográficos, deve também ser levado em conta o erro relativamente grande, relacionado ao manuseio de quantidades da ordem de 0,1 mg.

O cromatograma Nº 10 apresenta o perfil dos derivados TMS que constituem as geninas sililáveis da SBM. Um pico discernível aos 28 min. comprovou a presença do AO, embora em quantidades muito baixas, como já tinha sido observado na tabela 26. Quanto aos cinco picos de tempo de retenção mais escasso e de menor expressão, pareceu existir certa coincidência. O maior dos componentes da SBM ($t'_R = 35$ min.), porém, foi típico desta saponina.

Como era de se esperar, houve pouca similaridade entre o perfil de sapogeninas encontrado na quinua e na digitonina (cromatograma 11). Por um lado, o pico predominante nesta última foi o de maior tempo de retenção, não revelando a presença do AO e parecendo coincidir com apenas três picos de menor tempo de retenção, dos quais só existem traços na digitonina.

A qualidade e confiabilidade da cromatografia gasosa na detecção e estimação das sapogeninas da quinua mediante a síntese de seus trimetilsilil derivados foi evidente. O ácido oleanólico é aparentemente a saponina mais abundante, correspondendo a um total de 79,5% das sapogeninas da quinua Kancolla.

Segundo as nossas experiências, foi vantajoso utilizar a coluna OV-17 com programação térmica para a obtenção de perfis mais completos, embora as condições ficassem determinadas para a estima

ção do AO, usando-se a coluna SE-30 com eluição isotérmica.

A sililação com o BSTFA (N,O-bis(trimetilsili)-trifluoroacetamida) também foi favorável devido à rapidez de eluição de seus derivados e à baixa acumulação de silício no detector. Foi necessário, porém, limpar periodicamente o detector, usando alta temperatura.

A formação dos trifluoro acetil derivados, com anidrido trifluoroacético, não foi bem sucedido. Uma vez que, não se obtiveram cromatogramas com picos integráveis nem para as amostras nem para o padrão AO tanto na coluna SE-30 como na coluna OV-17. Talvez este resultado se deva à hidrólise do agente acetilante ou a dos produtos, que poderiam conter traços de umidade antes ou depois da acetilação respectivamente.

4.3. TESTE QUALITATIVO PARA CARBOIDRATOS

Os testes qualitativos de antrona e de Molish foram realizados nas fases aquosas dos hidrolisados como foi descrito no item 3.5. Estes resultados são apresentados na Tabela 29.

Tanto as fases aquosas das saponinas "padrão" (SBM e digitonina), como do extrato P₂₈ e suas respectivas sub-frações "E", reagiram positivamente, demonstrando a presença deste produto da hidrólise. Existe, porém, a possibilidade de contaminação com carboidratos livres do grão, especialmente no extrato P₂₈. A probabilidade de contaminação das sub-frações "E" e de qualquer uma das frações da SBM ou da digitonina p.a é, no entanto, muito baixa.

TABELA 29. Concentrações relativas dos açúcares supostamente libe-
rados durante a hidrólise das saponinas.

Amostras	Teste da antrona	Teste de Molish
E ₃	++	+++
E ₅	++	++
E ₇	+++	++++
E ₉	+	++
E ₁₀	+	++
E ₁₂	+	+++
SBM-I	+	+++
II	++	+++
III	++	+++
IV	++	+++
V	++	+++
P ₂₈	+++++	+++++
Digitonina	+++	+++

Estes resultados dão subsídios à suposição inicial e aos testes afrosimétricos, hemolíticos, etc., de que os extratos e suas frações contêm as substâncias naturais denominadas saponinas. Por outro lado, a presença dos açúcares como produto da hidrólise confirma indiretamente que as substâncias determinadas por gás-cromatografia são as sapogeninas. Cabe ressaltar que o teste da antrona é considerado de grande utilidade na detecção das hexoses, pentoses e ácidos urônicos (5, 37, 107), glucosídeos muito comuns nas saponinas.

4.4. DETERMINAÇÃO DA CURVA-PADRÃO DO TRIMETILSILIL (TMS) DERIVADO DO ÁCIDO OLEANÓLICO (AO).

Obteve-se uma curva-padrão do TMS-AO, apresentada na figura 13, seguindo-se os procedimentos de derivatização, detecção gás-cromatográfica e a quantificação descritos os itens 3.4.10, 3.4.11 e 3.4.12.

As condições para a cromatografia gasosa aparecem na tabela 28 (AO, cromatograma 1) e a determinação quantitativa foi feita, calculando-se a área ($hb_{0,5}$) do pico.

Houve uma alta correlação ($r = 0,9862$) entre as concentrações dos derivados e suas respectivas áreas, indicando que as concentrações testadas ficaram dentro da linearidade do detector e que as duas variáveis estão relacionadas mediante coeficiente de regressão $b = 374,29 \text{ mm}^2 \text{ microgramas}^{-1}$.

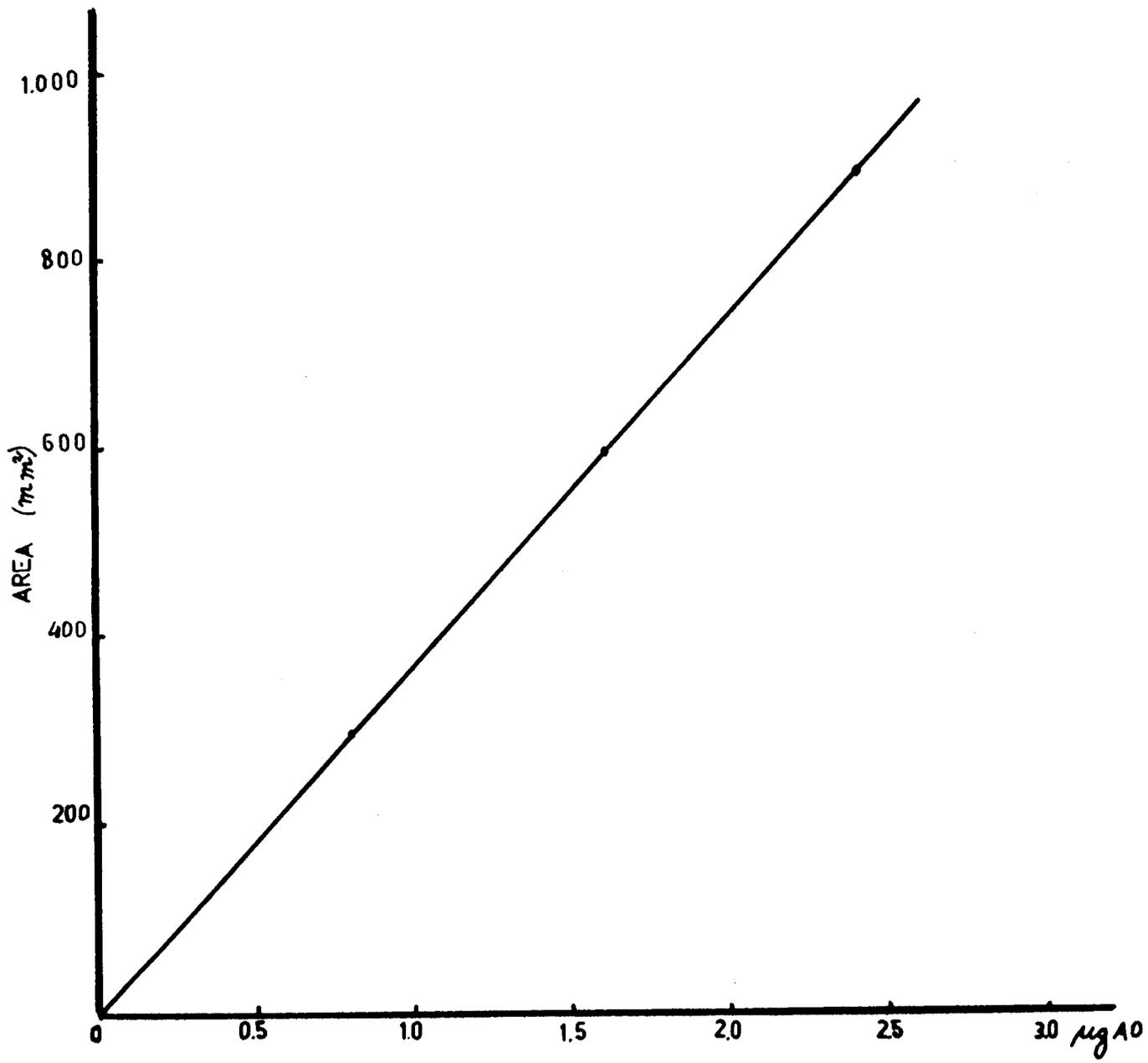


FIGURA 13. CURVA-PADRÃO DO DERIVADO TMS DO ACIDO OLEANÓLICO.

4.5. AVALIAÇÃO DE MÉTODOS GÁS-CROMATOGRÁFICOS PARA DOSAGEM DO AO
(sob a forma de TMS-AO) EM GRÃOS DE QUINUA-KANCOLLA.

Extrações foram realizadas através do método de Kernan et al (70) e dos procedimentos propostos neste trabalho, descritos no Ítem 3.6 e no Diagrama 4, obtendo-se os cromatogramas 12, 13 e 14 (Figuras 14, 15 e 16). Na tabela 30 aparecem as porcentagens de AO e a porcentagem de saponinas.

TABELA 30. Níveis de ácido oleanólico (AO) e porcentagem inferida de saponinas da quinoa-Kancolla, segundo quatro procedimentos de extração[§].

Método	Área do pico pico do TMS:AO (mm ²)	% AO do grão (B.U.)	% Saponina do grão (B.U.)
K ₁	112,75	0,0377	1,60
K ₂	0,0	0,0000	0,00
W ₁	138,00	0,0461	1,96
W ₂	390,00	0,1303	5,53

§ Os resultados são médias de duas extrações.

Explicação:

$$\% \text{ AO} = \frac{\text{AO}}{800} \times 100$$

AO = quantidade (microgramas) de ácido oleanólico obtida da curva-padrão.

800 = quantidade (microgramas) de amostra no volume de injeção.

% Saponina = 42,4405 x % AO (como saponina total)

$$42,4405 = \frac{5,53}{0,1303}$$

5,53 = porcentagem das saponinas totais ($P_{28} + P_{42}$), discutida no Ítem 4.2.1.

0,1303 = porcentagem do AO obtido com o método W_2 , que revelou o maior teor de AO

Na tabela 30, observa-se que a máxima recuperação de ácido oleanólico foi atingida mediante a extração com gradiente de etanol-1-butanol-água, tendo sido eliminada a passagem através do bicarbonato de sódio (procedimento W_2 , Diagrama 4).

Com a finalidade de calcular a relação entre as saponinas totais e o AO tomou-se a porcentagem de saponinas totais (resultado da combinação dos extratos semi-purificados $P_{28} + P_{42}$; Ítem 4.2.1) e o valor de 0,1303% AO do procedimento W_2 , que foi o de maior rendimento. Embora este passo tenha sido baseado na suposição dos extratos serem puros e o conteúdo de AO o mesmo para os dois, esta relação poderá ser utilizado, tentativamente, para determinar o teor de saponinas em outras amostras de quinua-Kancolla, o que foi feito com os extratos K_1 e W_1 .

Contrário ao que se esperava, recuperações de AO através dos procedimentos K_1 , K_2 e W_1 não foram satisfatórias. A baixa porcentagem de AO e de saponinas obtidas pelo procedimento K_1 pode ser o resultado de um ou mais fatores, tais como a possível ineficiência do tratamento alcalino e os passos adicionais de centrifugação e filtragem, que foram necessários para a obtenção da solução aquosa livre de partículas.

Com o método K_2 , que foi uma tentativa de extração aquosa seguida de extração butanólica a pH 4 (item 3.6.2.1), não se obtiveram picos dos TMS-derivados do AO ou de outras saponinas. Este procedimento não incluiu a extração com gradiente de solventes, como no caso do extrato P_{42} , no qual se obteve 15,5% das saponinas totais. Não poderíamos afirmar que a ausência de picos se deveu a ineficiência na extração, porque estes extratos finais não foram liofilizados, podendo os mesmos conter traços de umidade que interfeririam com a derivação.

O procedimento W_1 foi também considerado insatisfatório devido a seu baixo rendimento em AO. Este procedimento diferiu do W_2 apenas em que, depois da hidrólise, o extrato clorofórmico foi passado através da solução de bicarbonato de sódio eliminando-se, assim, a interfase II.

Em conclusão, se fôssemos recomendar um dos procedimentos anteriores na determinação rotineira das saponinas da quinua, sugeríamos o procedimento W_2 em vista da maior recuperação de AO e de sua relativa simplicidade além do curto tempo de operação: 8 horas para dosar três amostras por duplicata desde a extração até a cromatografia gasosa. Cabe ressaltar aqui, que os teores de AO de

quinuas podem ser diferentes em função da variedade e que, portanto, dados sobre todas as variedades deveriam ser apurados antes do método ser considerado de utilidade prática.

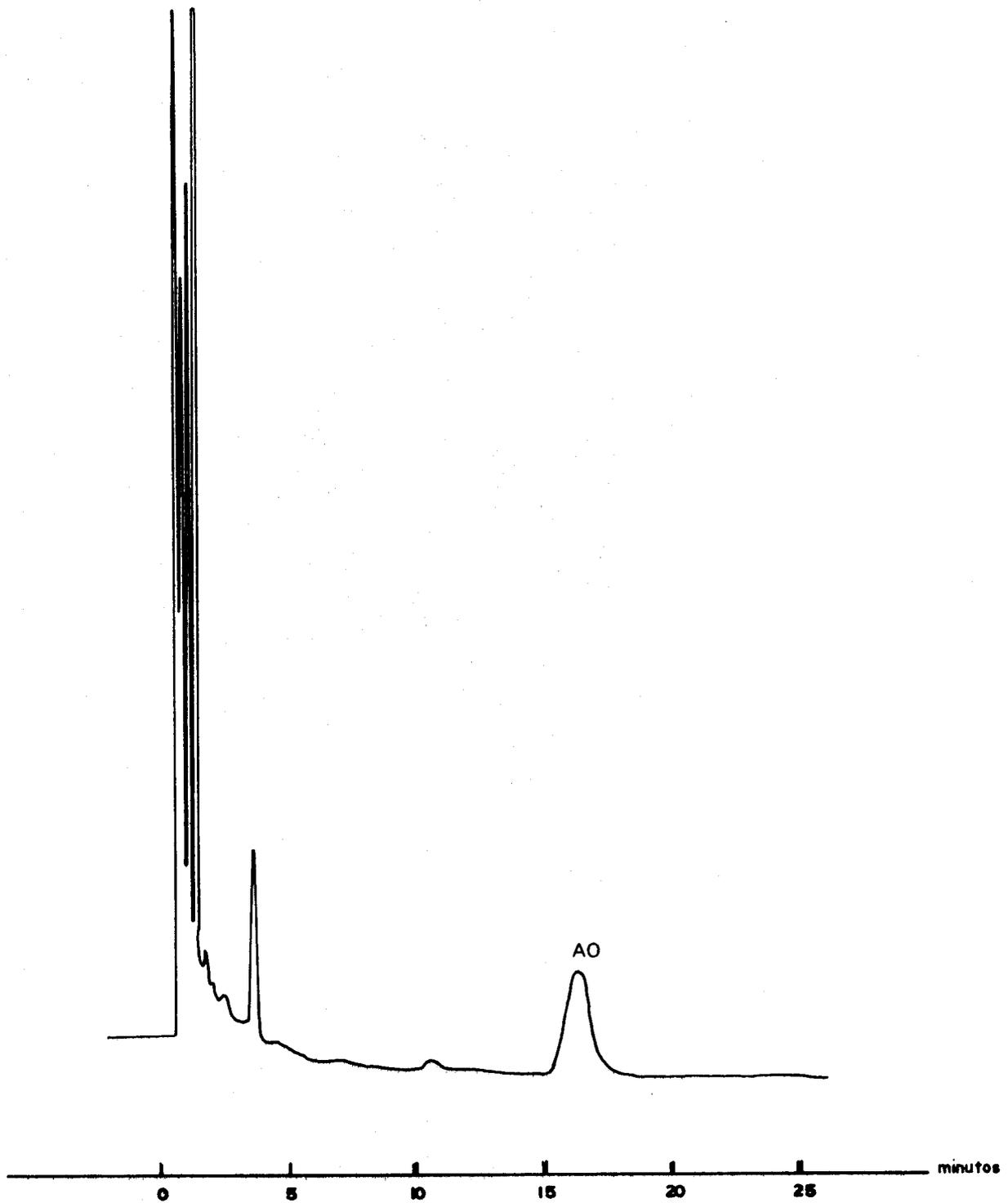


FIGURA 14. CROMATOGRAMA 12: DERIVADOS TMS DO EXTRATO SAPOGENINAS DA QUINUA; MÉTODO: K₁, 3% SE 30, 285°C.

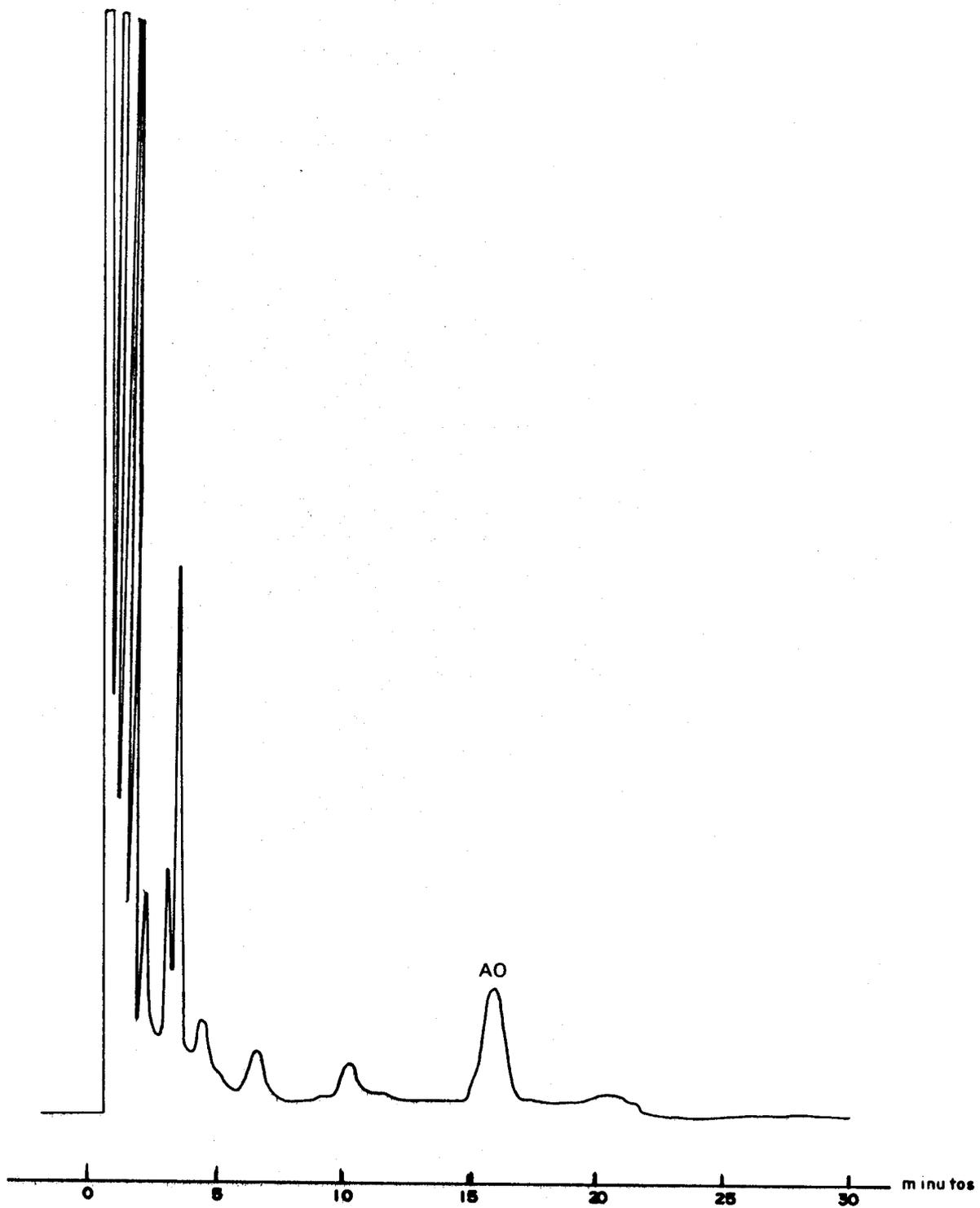


FIGURA 15: CROMATOGRAMA 13: DERIVADOS TMS DO EXTRATO SAPOGENINAS DA QUINUA.
MÉTODO W₁; 3% SE 30, 285°C.

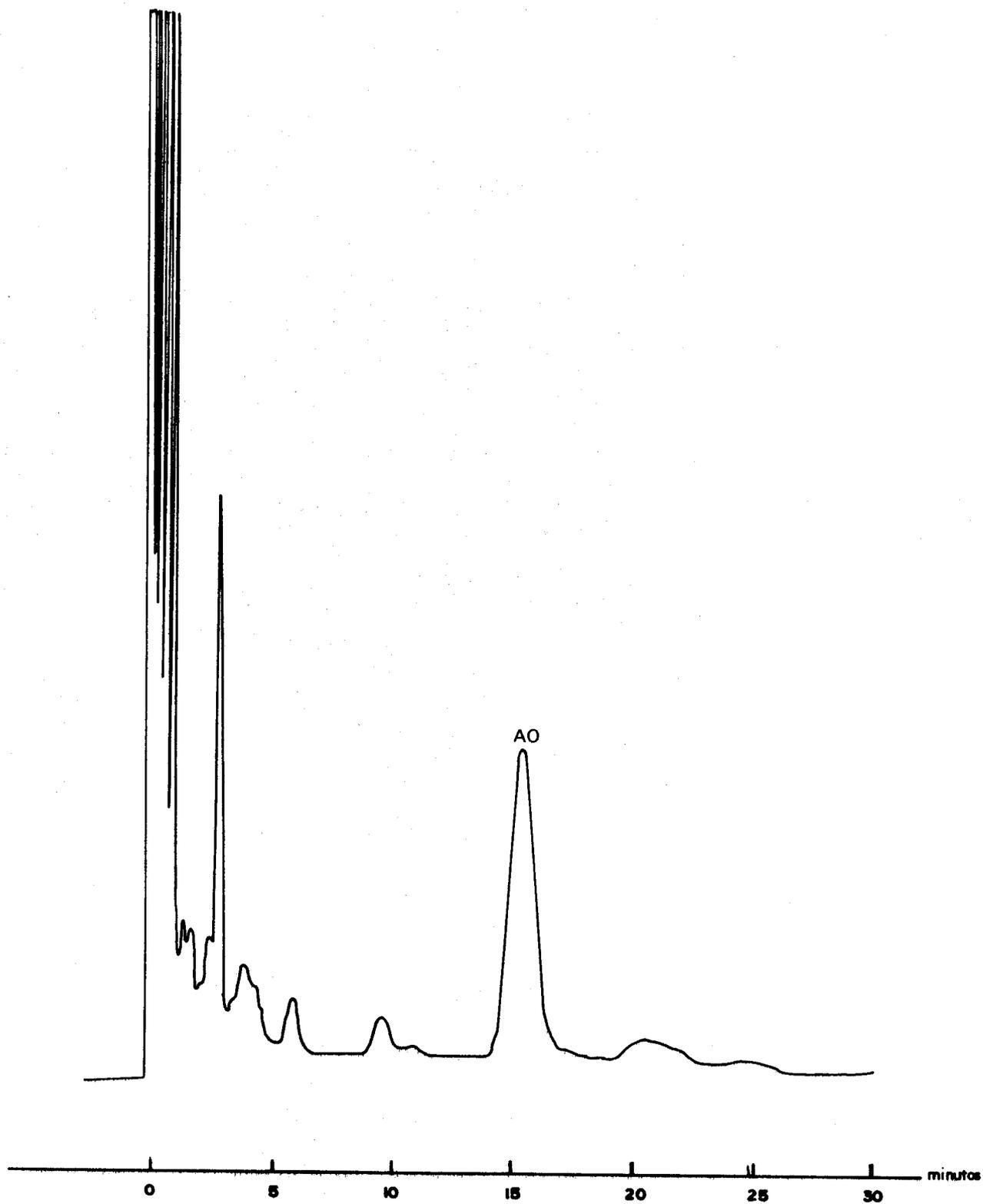


FIGURA 16. CROMATOGRAMA 14: DERIVADOS TMS DO EX TRATO SAPOGENINAS DA QUINUA.
MÉTODO: W_2 , 3% SE 30, 285°C.

5. CONCLUSÕES

Analisando os resultados do estudo cromatográfico das saponinas da quinua, Chenopodium quinoa, Willd., variedade Kancolla, chegou-se as seguintes conclusões:

- 1 - Os métodos estimativos clássicos baseados na produção de espuma, no poder hemolisante, na reação Liebermann-Burchard, na reação do ácido fosfotúngstico não possuem suficiente especificidade, podendo introduzir muito erro na determinação de saponinas mesmo em extratos semi-purificados.
- 2 - A cromatografia em camada delgada revelou que nas saponinas da quinua Kancolla existem pelo menos sete manchas, provavelmente saponinas diferentes, que tem a propriedade de produzir hemólise e o fato de que o revelador Liebermann-Burchard acusou dez manchas para o mesmo extrato sugeriu que o reagente sangue-gelatina em camada delgada é um revelador mais específico que o Liebermann-Burchard.
- 3 - A extração com gradiente de etanol - 1 butanol água foi a que apresentou melhores resultados, dando um rendimento de 4,73% de saponinas brutas. Extração posterior dos grãos com água a pH 4, seguida de partição em butanol, aumentou a recuperação de compostos saponosídeos para um rendimento total de 5,53% (estimativa gravimétrica).

- 4 - Tanto a saponina Merck como a Baker foram considerados improprias como padrões para detecção e quantificação das saponinas da quinua. A saponina branca Merck demonstrou ser uma mistura de saponinas na que o ácido oleanólico poderia estar presente em quantidades muito pequenas.
- 5 - O ácido oleanólico, uma sapogenina triterpênica, constituiu o 79.5% (por normalização interna) das sapogeninas sililáveis no extrato de sapogeninas semi-purificadas da quinua Kancolla. Pode-se dizer então que as saponinas desta variedade são de natureza triterpênica, faltando apenas uma confirmação por análise espectrométrica de massa.
- 6 - Um procedimento simplificado de extração das saponinas com gradiente de etanol + butanol + água, seguido de hidrólise e gás-cromatografia ofereceu alta recuperação de ácido oleanólico, demonstrando ser de possível utilidade na determinação rotineira de ácido oleanólico nas saponinas da quinua.
- 7 - O conteúdo de ácido oleanólico nos grãos ou farinhas de quinua poderia ser usado diretamente na indústria como índice de qualidade ao invés do teor saponinas.

6. BIBLIOGRAFIA

1. AGARWAL,S. & RASTOGI,R. (1974). Review: Triterpenoid saponins and their genins. *Phytoch.*,13:2623.
2. ALI-ZADE,T.; KONDRATENKO,E. & ABUBAKIROV,N. (1970). Triterpenes glycosides of G. triacanthos. *Chem. Nat. Comp.*, 6(4):482.
3. ALVISTUR,J.; WHITE,P. y COLLAZOS,C. (1953). El valor biológico de la quinua. *Bol.Soc.Quím.Perú*, 19:197.
4. AMERICAN ASSOCIATION CEREAL CHEMISTRY. (1969). *Approved Methods*, 7^o ed.
5. AMINOFF,D.; BINKLEY,W.; SCHAFFER,R. & MOWRY,R. (1970). "Analytical methods for the carbohydrates," in: *The Carbohydrates*, W. Pigman and D. Horton, V.II, Chap. 45.
6. ANDRZEJEWSKA,E. (1978). *Comunicação pessoal*, *Pants. Zak. Hig. Warsaw, Poland*.
7. APPLEBAUM,S.; MARCO,S. & BIRK,Y. (1969). Saponins as possibles factors of resistance of legume seeds to attack of insects. *J. Agr. Food Chem.*, 17(3):618.
8. BACIGALUPO,A. (1970). *Posibilidades de utilización de la quinua, cañihua, trigo y otras semillas de uso común*. Pub. INCAP, Guatemala, Ago., 1971.
9. BARUA,A. & BASAK,A. (1972). Chemical examination of the seeds of E. phaseoloides M. *Indian Chem. Soc.*, 49(11): 1199.

10. BASU, N. & RASTOGI, R. (1967). Triterpenoid saponins and sapogenins. *Phytoch.*, 6(9):1249.
11. BIRK, Y. (1969). "Saponins", in: *Toxic Constituents of Plants Foodstuffs*, I. E. Liener, Ac. Press, pp. 169-210.
12. BIRK, Y.; GESTETNER, I. & ISHAAYA, I. (1963). A thermostable hemolytic factor in soybeans. *Nature*, 197(4872):1089.
13. BOGACHEVA, N.; KOGAN, L. & LIVIZOV, N. (1972). Triterpene glycosides of Ch. ambrosoides L. *Chem. Nat. Comp.*, 8(3):395.
14. BOMBARDELLI, E. (1977). Ginseng extract recovery and use in pharmaceuticals. *Chem. Abstr.*, 88:94811g.
15. BOMBARDELLI, E.; BONATI, A.; GABETTA, B.; MARTINELLI, M. & MUSTICH, G. (1976). Gas-liquid chromatography and mass spectrometric investigation on saponins in P. ginseng extracts. *Fitoterapia*, XLVII(3):99.
16. BRUIN, A. de. (1964). Investigation of the food values of quinoa and cañihua seeds. *J. Food Sci.*, 29(6):872.
17. BUGLOS, J. & BOCSA, I. (1976). Lowering of saponin content of M. sativa L. *Chem. Abstr.*, 86:168037s.
18. CARBAJO, G. (1977). "La quinua y su valor nutritivo" en: *Curso de Quinua, Fondo Simón Bolívar-Min. Alim.-IICA-UNTA, Perú, Abril: 11-16.*
19. CARDOZO, A. (1976). La quinua y los requisitos como alimento animal. *Primera Reunión Binacional sobre Planificación de la Producción de Quinua en Colombia-Ecuador, Min.*

Salud Pública, Pasto, Colombia.

20. CARDOZO, A. y BATEMAN, J. (1961). La quinua en la alimentación animal. Turrialba, 11(2):72.
21. CARPIO, F. (1976). Recetario para preparación de la quinua, II Conv. Inter. Quen., Potosí, Bolivia, IICA.
22. CHAKRAVARTI, R.; CHAKRAVARTI, D.; DATTA, S. & MITRA, M. (1968). Enzymatic hidrolisis of steroidal saponins. Indian J. Chem., 6(10):570.
23. CHAMBAZ, E. & HORNING, C. (1967). Steroid trimethylsilyl ethers. Anal. Lett., 1(3):201.
24. CHEEKE, P.; KINZELL, J. & PEDERSEN, M. (1977). Influence of saponins of alfalfa utilization by rats, rabbits and swine. J. Ann. Sci., 46(3):476.
25. CHEEKE, P. (1976). Nutritional and physiological properties of saponins. Nut. Rep. Int., 13(3):315.
26. CHEEKE, P. (1971). Nutritional and physiological implications of saponins: a review. Can. J. Ann. Sci., 51(3):621.
27. CHIRVA, V.; CHEBAN, P.; KINTYA, P. & BOBEIKO, V. (1971). Structure of triterpenoid glycoside from Ch. anthelminticum roots. Chem. Nat. Comp., 7(1):27.
28. CHO, S. (1977). Saponin of Korean ginseng part III. Chem. Abstr., 88:41584d.
29. COLINA W., C. (1942). Nuevos destinos de los granos de quinua y cañihua en la alimentación nacional. Rev. Fac. Farm.

Bioq. UNMSM, Perú, 7(29/30):40.

30. CONSTABLE, D.; BIGATT, T. & CONSTABLE, F. (1960). Infrared absorption in the spectrum of the tea saponin. Chem. Abstr., 55:21801f.
31. CONVENCION INTERNACIONAL DE QUENOPODIACEAS: Quinoa y Cañihua. Segunda. (1976). Potosí, Bolivia, IICA, Abril: 26-29.
32. COOK, R. (1961). Reactions of steroids with acetic anhydride and sulfuric acid: the Liebermann-Burchard test. The Analyst, 86(1023):373.
33. CORES, R. & RUYSSSEN, R. (1953). Standardization of the determination of the hemolytic activity. Chem. Abstr., 48:785d.
34. CORNEJO, G. (1976). Estructura anatómica de la quinua. II Con. Int. Quen., Potosí, Bolivia, IICA.
35. CUNDIFF, R. (1964). Spectrophotometric determination of Glycyrrhizic acid in Licorice extract, Anal. Chem., 36(9):1871.
36. DENDY, A.; EMMETT, B. & OKE, O. (1975). "Minor food seeds", in: Food protein sources, Ed. N.W. Price, Cambridge University press, Cambridge, London.
37. DOMINGUEZ, X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica, Centro Regional de Ayuda Técnica, AID, México.
38. ELDRIDGE, A. & WOLF, W. (1969). Crystalline saponins from soybean protein. Cereal Chem., 46(4):344.

39. ELMER, E. (1942). Quinoa-Chenopodium quinoa. Chem. Abstr., 39:2582.
40. E. MERCK DARMSTADT. Alcaloides y Glucósidos, Publ. V/23/2270/1.5/1169, Alemanha.
41. FALES, H. & LUUKKAINEN, T. (1965). O-methylloximes as carbonyl derivatives in gas chromatography, mass spectrometry and NMR. Anal. Chem., 37(7):955.
42. FERNANDES, A. (1967). Farmacognosia, II vol. Fundação Calouste, Gulbenkian-Lisboa, Cap. 3.
43. FERRARI, C. (1976). Investigación para la utilización de la quinua. II Conv. Inter. Quen., Potosí, Bolivia, IICa.
44. FOKINA, G. & BELOVA, F. (1975). Gas-liquid chromatography of triterpenoids. Chem. Nat. Comp., 11(6):735.
45. FONTAN, J. (1953). Saponins IV. Chem. Abstr., 47:9567e.
46. FROLOVA, G.; OVODVO, Y. & SUPRUNOV, N. (1971). Triterpenes glycosides of the leaves of E. senticosus I. Isolation and general characteristics, Chem. Nat. Comp., 7(5):614.
47. FUCHS, L. & ILIEV, V. (1952). Saponin hemolysis V, VI., Chem Abstr., 46:8691i.
48. GEHRKE, C. & LEIMER, K. (1971). Trimethylsilylation of amino acids derivatization and chromatography. J. Chrom., 57:219.
49. GENKINA, G. (1977). Spectrophotometry of the glycosides of oleanolic acid and hederagenin in concentrated sulfuric acid. Chem. Nat. Comp., 13(2):188.

50. GENKINA,G.; KONDRATENKO,E.; MZHEL'SKAYA,L. & ABUBAKIROV,N.
(1969). A spectrophotometry method of determining molecular weights of triterpene glycosides. Chem. Nat. Comp., 5(6):501.
51. GESTETNER,B.; ASSA,Y.; HENIS,Y. & BONDI,A. (1971). Lucerne saponins IV. J. Sci. Food Agri., 22(4):168.
52. GLEISPACH,H. (1974). The use of different silylating agents for structure analysis of steroids. J. Chrom., 91:407.
53. GONNERMANN,R. (1919). The saponins of Ch. quinoa, E. helioscopea, E. peplus and M. perennis. Chem. Abstr., 14:1553.
54. GONZALES,R. (1917). Investigation of Ch. quinoa. Chem. Abstr., 13:1083.
55. HANZAS,P. & BARR,W. (1970). Millipore-antimony pentachloride colorimetric method for the rapid determination of saponin in refined beet sugar. Food Sci. Tech. Abstr., 2(7)L417.
56. HEFTMANN,E. (1965). "II Saponins" in: Plant Biochemistry, Ed. A. P., pp700-703.
57. HIAI,S.; OURA,H. & NAKAJIMA,T. (1976). Color reaction of some saponins and sapogenins with vainillin and sulfuric acid. Planta Méd., 29(2):116.
58. HILLER,K. (1978). Isolation of 3-O-D-glucopyranosyl oleanolic acid 28-O-D-xylopiranoside from E. bromeliifolium. Pharmazie, 33(1):78.
59. HILLER,K. & ERIKA,F. (1975). Isolating antimycotically active saponin mixture from umbelifers. Chem. Abstr.,

85:83220a.

60. HOLLSTEIN,E.; KEIPERT,M. & HILLER,K. (1970). Gas chromatography detection of the ester components of triterpenes saponins. Chem. Abstr., 73:101942w.
61. IKEKAWA,N.; NATORI,S.; ITOKAWA,H.; TOBINAGA,S. & MATSUI,M. (1958). Extration and purification of sapogenins. Chem. Abstr., 53:3612f.
62. INGLEZ,J. (1954). Quinoa volta ao cartaz. Cha. Quin. 89(5):591.
63. JARA,J. & SELLES,E. (1951). The hemolytic index of saponins. Chem. Abstr., 47:9401a.
64. JOO,C. (1977). Biochemical studies on ginseng saponins X. Chem. Abstr., 88:130976a.
65. JUNGE,I. (1973). Lupine and quinoa. Lab. Bioeng. Univ. Concepción, Chile, Julio.
66. KARPOVA,V.; KINTYA,P. & CHIRVA,V. (1975). The structure of saponin A from N. thyrsiflora. Chem. Nat. Comp., 11(3): 364.
67. KARTING,T.; D-NOEHAMMER,R. & WEGSCHAIDER,O. (1972). Spectrophotometric determination of steroidal and triterpenoid compounds II. Anal. Abstr., 24(2):1105.
68. KAWANO,K.; SATO,H. & SAKAMURA,S. (1977). Isolation and structure of furostanol saponin in Asparagus edible shorts. J. Agr. Biol. Chem., 41(1):1.
69. KERNAN,J. (1978). Comunicação pessoal, Saskat. Res. Council, Saskat., Canadá.

70. KERNAN, J.; COXWORTH, E. & FLEMING, S. (1973). Microdetermination of triterpene sapogenin content of K. scorparia L. seed using GLC. J. Agr. Food Chem., 21(2):232.
71. KIRICHENKO, A.; TARASENKO, V.; GONCHARENKO, B. & GORBATKO, V. (1978). Ways of treating conveying wash waters of beet-sugar refineries. Chem. Abstr., 88:78496c.
72. KISISHARA, S. (1978). Comunicação pessoal, Kobe Daig. Nagak. Kenk. Hok., Toyo, Japão.
73. KITAGAWA, I. & KOBAYASHI, O. (1977). On the structure of the major saponin from the starfish Acanthaster planci. Tet. Lett., (10):859.
74. KLEBE, J.; FINKBEINER, H; & WHITE, D. (1966). Silylations with Bis(trimethylsilyl)acetamide, a highly reactive sily donor. J. Am. Chem. Soc., 88(14):3390.
75. KNIGHT, J. (1977). Analysis of Fenugreek sapogenins by gas chromatography. J. Chrom., 133(1):222.
76. KOCHETKOV, N.; KHORLIN, Y. & OVODOV, Y. (1966). Triterpenes saponins IX. Chem. Abst., 65:7223c.
77. KOFLER, L. (1922). Differentiation and quantitative determination of the saponins. Cem. Abstr., 16:3605.
78. KOFLER, L.; FISCHER, R. & NEWESLY, H. (1929). Detection of saponins in drugs and foods. Chem. Abstr., 24:1181.
79. KRAVETS, Y.; GOLOVNYAK, Y.; PUSTOKHOD, G.; IVANOVA, L.; STRAZHESKO, D. & GRABCHAB, S. (1974). The composition of substances from sugar plant syrups by activated granulated

- carbon. Food Sci. Tech. Abst., 6(10)L748.
80. KROKHMALYUK,V. (1975). Gas-liquid chromatography of steroid and triterpene saponins using water vapour as the carrier gas. Chem. Abstr., 86:96051s.
81. KROKHMALYUK,V.; KINTYA,P. & CHIRVA,V. (1975). The structure of saponin B from C. songarica. Chem. Nat. Comp., 11(5): 600.
82. LALLOUETTE,P.; RICHOU,R. & RICHOU,H. (1969). Antiinflammatory effect to inflammatory substances. Chem. Abstr., 73: 23821q.
83. LARRY,D.; FULLER,M. & HARRILL,P. (1970). Quantitation of ammonium glycyrrhizinate by gas-liquid chromatography of the silyl ether ester derivative of the aglicone. J.A.O.A.C., 53(4):698.
84. LIVINGSTON,A.; WHITEHAND,L. & KOHLER,G. (1977). Microbiological assay for saponin in alfalfa products. J.A.O.A.C., 60(4): 950.
85. LOOS,R. (1953). Electrophoresis of saponins on paper. Chem. Abstr., 48:951e.
86. LUBSEN,C. (1918). Chemical examination of de seeds of Ch. quinoa. Chem. Abstr., 12:2390.
87. MAHONEY,A.; LOPEZ,J. & HENDRICKS,D. (1975). An evaluation of the protein quality of quinoa. J. Agr. Food Chem., 23(2): 190.

88. MARCHETTI, I. (1953). Preparación y estudio químico de pastas alimenticias de huevos, harina de quinua y trigo. Actas y Trabajos el IV Congreso de Química, Lima, Perú.
89. MARINI-BETTOLO, G.B. (1972). Productos naturales de origen vegetal de interés farmacológico para América Latina. *Commentarii*, II(59):5.
90. MAZZOCCO y RIETTI. (1941). Composición química y valor nutritivo de algunos alimentos sudamericanos. *Bol. Soc. Quím. Perú*, VII(2):61.
91. MELL, C. (1941). Interesting sources of natural dyestuffs. *Chem. Abstr.*, 36:2147.
92. MINTZER, M. (1937). As quinoas duas plantas de fructo alimenticio da região dos Andes. *A Fazenda*, 32(6):188.
93. MORRIS, R.; DYE, W. & GISLER, P. (1961). Isolation, purification and structural identity of an alfalfa root saponin. *J. Org. Chem.*, 26:1241.
94. MUJICA, A. (1977). "Tecnología del cultivo de la quinua" en: *Curso de quinua*, Fondo Simón Bolívar-Min. Alim.-IICA-UNTA, Perú, Abril:11-16.
95. MULLER-HOSSLY, E. (1917). A simple method for detection of saponin. *Chem. Abstr.* 11:3342.
96. MURAVER, I.; SHATILO, V. & SEMENCHENKO, V. (1972). A spectrophotometric method for the quantitative determination of ursolic acid. *Chem. Nat. Comp.*, 8(6):738.
97. MYOGA, K. & SHIBATA, F. (1977). Ladino clover saponins and

- the gas chromatographic assay method. Chem. Abstr.,
87:197325k.
98. NARREA,R. (1976). Cultivo de la quinua. Bol. Nº5, Min.
de Alimentación, Perú.
99. NEGRON,A.; ALVAREZ,E. & CALMET,E. (1976). La quinua y la
cañihua en raciones de pollos parrilleros en Puno, Perú.
II Conv. Inter. Quen., Potosí, Bolivia, IICA.
100. NORMAN,L.; BROWN,P. & PARISIER,E. (1975). Food science in
developing countries. Science, 188:589.
101. OGIHARA,Y. & INOUE,O. (1976). Droplet counter-current
chromatography for separation of plants products. J.
Chrom., 128:218.
102. OTSUKA,H. (1978). Separation and determination of saponins
of B. rodix by DCC. Planta Méd., 33(2):152.
103. OTSUKA,H. (1977). The evaluation of ginseng and it's
congeners by DCC. Planta Méd., 32(1):9.
104. OWEN,J. (1977). Studies on the distribution, biosynthesis
and function of steroidal saponins in echinoderms.
Chem. Abstr., 86:86401s.
105. PANOSYAN,A. & MNATSAKANYAN,V. (1977). Structure of an
pentacyclic triterpene alcohol from C. aquarrosa.
Chem. Nat. Comp., 13(1):59.
106. PARKHURST,R.; THOMAS,D. & SKINNER,W. (1973). Molluscicidal
saponins of P. dodecandra. Phytoch., 12:1437.
107. PEARSON,D. (1970). The Chemical Analysis of Foods, Sixth

Edition. J. & A. Churchill, London.

108. PETTIT, G. (1976). Antineoplastic agents XLV. J. Pharm. Sci., 65(10):1558.
109. POWELL, R.; SMITH, C. & MADRIGAL, R. (1976). Antitumor activity of S. vesicaria, S. punicea and S. drummondii seeds extracts. Planta Méd., 30(1):1.
110. PULGAR, M. (1954). La quinua o suba en Colombia. Publ. N° 3, Min. Agricultura, Bogotá, Colombia.
111. QUERZOLA, I. (1957). Fabricación y estudio químico bromatológico de galletas elaboradas a base de harinas de quinua y trigo. Anales Fac. Farm. Bioq., UNMSM, Perú, 8:149.
112. REICHARD, O. (1911). The reaction of saponins. Chem. Abstr., 5:969.
113. RIVERO, M. (1941). A quinoa. Cha. Quin., 63(6):703.
114. ROA, A. y VEGA, C. (1977). Estudio de Pre-inversión sobre el Fomento de la Producción Agro-industrial de Quinoa en el Departamento de Puno. IICA-OEA, Fondo Simón Bolívar, Min. Alimentación, Perú.
115. ROMERO, A.; BACIGALUPO, A.; ZAPATA, E. & CASTILLO, J. (1978). Influence of texturization and expansion of quinoa (Ch. quinoa Var. Sajama) on its acceptability and nutritional value. Resumos e Temas Livres do XI Cong. Inter. Nutrição, R.J., Brasil, Ag.27-Set.1.
116. RUYSSSEN, R.; CORES, R. & OMMELAGH, D. (1947). Determination of saponins by the hemolytic index. Chem. Abstr.,

42:2635i.

117. RUYSSSEN,R. & HUBLÉ,J. (1946). Hemolysis by saponins. Chem. Abstr., 41:3518h.
118. SAKAMOTO,I.; MORIMOTO,K. & TANAKA,O. (1976). Quantitative analysis of dammarque types saponins. Food Sci. Tech. Abstr., 8(8)H1412.
119. SARKAR,B. & RASTOGI,R. (1960). Paper chromatography of triterpenoid saponins. Chem. Abstr., 55:17378c.
120. SCHLOSSER,E. (1976). Role of saponins in antifungal resistance III. Food Sci. Tech. Abstr., 8(7)J1127.
121. SCHULTEN,H.; KAMORI,T. & KAWASAKI,T. (1977). Field adsorption mass spectrometry of natural products I. Tetrah., 33(19):295.
122. SCHULTZ,F. (1942). Experiments on foam time I. Chem. Abstr., 36:5075.
123. SEGAL,R.; MILO-GOLDZWEIG,I.; ZAITSCHEK,D. & NOAM,M. (1978). A facile method for detection of the genuine saponin from a saponin extract. Anal. Biochem.,84(1):78.
124. SMOCZKIEWICZ,M.; NITSCHKE,D. & STAWINSKI,T. (1977). Microdetermination of traces of saponin glycosides in plant materials not containing saponins. Chem. Abstr., 88:34014q.
125. SOKOLOV,S. (1971). Effect of saponins from M. aralia on the electrical activity of the heart. Chem. Abstr., 79:61507y.

126. SOROS, K. & BORBELY, M. (1976). Saponins in A, B and C sugars and in molasses in some Yugoslavian factories. Food Sci. Tech. Abstr., 8(12)L1010.
127. SOUZA, A. (1969). A ocorrência de espumíferos tóxicos em bebidas. Pes. Agr. Brs., 4:109.
128. STAHL, E. (1969). Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook, 2^o ed., Springer-Verlag, N.Y.
129. STALLING, D.; GERKE, C. & ZUMWALT, R. (1968). A new silylation reagent for amino acids BSTFA. Biochem. Biophys. Res. Comm., 31(4):616.
130. SWEELEY, C.; BENTLEY, R.; MAKITA, M. & WELLS, W. (1963). Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. J. Am. Chem. Soc., 85(5):2497.
131. TAGIEV, S. & ISMAILOV, A. (1978). Study of saponins of G. bicolor roots. Chem. Abstr., 89:39367n.
132. TAPIA, M. (1977). "Industrialización de la quinua" en: Curso de Quinua, Fondo Simón Bolívar-Min. Alim. IICA-UNTA, Perú, Abril:11-16.
133. TAPIA, M. (1976). El cultivo de la quinua en los Andes. II Conv. Inter. Quen., Potosí, Bolivia, IICA.
134. TELLERIA, M. (1976). Estudo comparativo da composição e dos efeitos dos tratamentos térmicos em quatro variedades de quinua. Tese de Mestrado, FEAA, UNICAMP, SP, Brasil.

135. TEMPLETON, W. (1969). An Introduction to the Chemistry of the Terpenoids and Steroids, Ed. Butterworths, Chap. 6.
136. VARSHNEY, I.; PAL, R. & VYAS, P. (1976). Studies on Lebbekamin E a new saponin from A. lebbek B. J. Indian Chem. Soc., 53(8):859.
137. VARSHNEY, I. & SHARMA, S. (1968). Saponins and sapogenins XXII. Indian J. Chem., 6(8):474.
138. VASUYOKOVA, N.; PASISHNICHENKO, V.; DAVYDOVA, M. & CHALENKO, G. (1977). Study on the fungitoxi properties of steroids saponins from D. deltoidea rihzomes. Chem. Abstr., 87:33923e.
139. VECHERKO, L.; SVIRIDOV, A.; ZINKEVICH, E. & KOGAN, L. (1975). The structure of calendulosides C and D from the roots of C. officinalis. Chem. Nat. Comp., 7(5):614.
140. VENDRIG, J. (1964). Growth regulating activity of some saponins. Nature, 203(4951):1301.
141. VILDOSO, L. (1976). La quinua-Problemas agronómicos en Potosí. II Conv. Inter. Quen., Potosí, Bolivia, IICA.
142. VILLAR, V. (1948). Saponinas en el reino vegetal. Farmacognosia - Ann. Inst. Celestino Mutis, Madrid, 7/8(13):306.
143. VIÑAS, E. (1953). Relación entre el contenido de amino ácidos esenciales y valor nutritivo de la proteína de la quinua. Actas y Trabajos del IV Cong. Peruano de Química, Perú.
144. WALL, M. (1952). Steroidal sapogenins I. J. Biol. Chem., 198:533.

145. WASIKY,R. (1943). New method for determination of saponins.
Rev. Soc. Brs. Quim., 11:57.
146. WHITE,P.; ALVISTUR,E.; DIAZ,C.; VIÑAS, E. WHITE,H. & COLLAZOS,C.
(1955). Nutritive content and protein quality of quinoa
and cañihua seeds. J. Agr. Food Chem., 3(6):531.
147. WINDHOLZ,M. (1976). The Merck Index, Ninth Edition, Published
by Merck & Co. Inc. U.S.A, p.417.
148. WOLF,W. (1967). Trypsin inhibitors, hemagglutinins, saponins
and isoflavones of soybeans. Chem. Abstr., 73:63752z.
149. WOLTERS,B. (1968). Antibiotic effect of saponins IV. Planta
Méd., 16(1):114.
150. WU,W. y FLORES,M. (1961). Tabla de composición de alimentos
para uso em América Latina, INCAP-ICNND, Guatemala.
151. YAHARA,S.; KASAI,R. & TANAKA,O. (1977). New dammarque type
saponins of leaves of P. japonicus. Chem. Abstr., 88:
89972f.
152. YAMASAKI,K.; KASAI,R.; OKIHARA,M. & TANAKA,O. (1977).
Application of C-13 NMR to the structural elucidation of
acylated plant glycosides. Tetrah. Lett., (14):1231.
153. YOSIOKA,I.; FUJIO,M.; OSAMURA,M. & KITAGAWA,I. (1966).
A novel cleavage method of saponin with soil bacteria,
intending to the genuine sapogenin on the Panax saponins.
Tetrah. Lett., 4(50):63603.