

SAPONINS FROM CHENOPODIUM QUINOA WILLD AND CHENOPODIUM PALLIDICAULE AELLEN AS BIOCONTROLLERS OF PHYTOPATHOGEN FUNGI AND HEMOLYSIS AGENTS

Bianca Guzmán*, Reynaldo Tenorio, Dora L. Cruz, Christian Espinal, Juan A. Alvarado, Patricia Mollinedo

Department of Chemistry, Laboratorio de Pruebas Biológicas, Instituto de Investigaciones en Productos Naturales IIPN, Universidad Mayor de San Andrés UMSA, P.O. Box 303, Calle Andrés Bello s/n, Ciudad Universitaria Cota Cota, Tel. 59122792238, La Paz, Bolivia

Keywords: *Quantification of Saponins, Quinoa, Canihua.*

ABSTRACT

Saponins for its properties as a biopesticide and biocontrol of plant pathogenic fungi, such as *Aspergillus* and *Fusarium*, have the ability to produce red blood cells rupture, which can be measured by the hemolytic index. In this paper the biocontrol activity of saponins extracted from two species of *Chenopodium* (Quinoa and canihua) possible degree of toxicity and eco hemotoxicity, in vitro. We worked with ratings PROINPA samples, extraction of saponins was carried out in aqueous medium. Growth charts and inhibition show that the M-16 extract (saponin) has biocotroladora ability on strains Bol RT-1 (*Fusarium sPp*) and Bull JR-1 (*Aspegilius flavus*) with an inhibition at 12 days to 47.6 %, 42% respectively. Ecotoxicity of *Daphnia magna* show that at a concentration of 25% w / v saponin extracts are not significantly toxic to the environment, the results of tests of hemotoxicity, HC50 has a value of 0.58 mg / ml, the RBC hemolysis was performed by quantification of saponins, it is observed that at a concentration of saponin 0.320 mg / ml (sample 12) A 32. 215% of red cells are lysed, showing a value not too high toxicity. Sample 16 (saponin) proved to have an efficient inhibitory effect on growth of *Aspergillus flavus* and *Fusarium spp.* is not efficient within a short time, but long term if you could control these pests, with the added benefit of safe use for protection of the environment as shown in the proof of ecotoxicity and safe for users as checks haemotoxicity assays.

Original spanish title: *saponinas de chenopodium quinoa willd y cañihua chenopodium pallidicaule aellen como agente biocontrolador de hongos fitopatogenos y agente hemolisante.*

*Corresponding author: bguzmancondarco@gmail.com

RESUMEN

Las saponinas por sus propiedades como biocontrolador o bioplaguicida de hongos fitopatógenos, como los del género *Aspergillus* y *Fusarium*, tienen la habilidad de producir ruptura de los eritrocitos, que se puede medir por el índice hemolítico. En el presente trabajo se evaluó la actividad biocontroladora de saponinas extraídas de dos especies del género *Chenopodium* (Quinoa y Cañihua), su posible grado de eco toxicidad y hemotoxicidad in vitro. Se trabajo con muestras otorgadas por PROINPA, la extracción de saponinas se realizó en medio acuoso. Los cuadros de crecimiento e inhibición muestran que el extracto M-16 (saponina) tiene capacidad biocotroladora sobre las cepas Bol RT-1 (*Fusarium ssp*) y Bol JR-1 (*Aspegilius flavus*) con una inhibición a los 12 días con 47,6 %, 42 % respectivamente. La ecotoxicidad sobre *Daphnia magna* muestran que a una concentración de 25% p/v, los extractos de saponinas no son significativamente tóxicos para el medio ambiente, los resultados de los ensayos de hemotoxicidad, presenta un valor de HC₅₀ de 0.58 mg/ml, la hemólisis de glóbulos rojos se realizaron con la cuantificación de saponinas, se observa que a una concentración de saponina 0.320 mg/ml (muestra 12) un 32.215 % de glóbulos rojos son lisados, valor que muestra un grado de toxicidad no muy elevado. La Muestra 16 (saponina) demostró tener un efecto inhibitor eficiente sobre el crecimiento de para *Aspergillus flavus* y *Fusarium spp.* no es eficiente en un lapso de tiempo reducido, sin embargo a largo plazo si se podría controlar estas plagas, con la ventaja adicional del uso seguro para la conservación del medio ambiente como se muestra en la prueba de ecotoxicidad y segura para los usuarios como se comprueba en los ensayos de hemotoxicidad.

INTRODUCCIÓN

Las saponinas son productos naturales derivados de distintas especies vegetales tales como yuca, ginseng, quinoa, quilla, cañihua etc. Estas moléculas están clasificadas, por su estructura, como glucósidos esteroidales o triterpénicos, se caracterizan por las propiedades semejantes a las del jabón: cada molécula está constituida por una parte lipofílica (esteroidal o terpenica) y otra hidrofílica (glicosidos) [1].

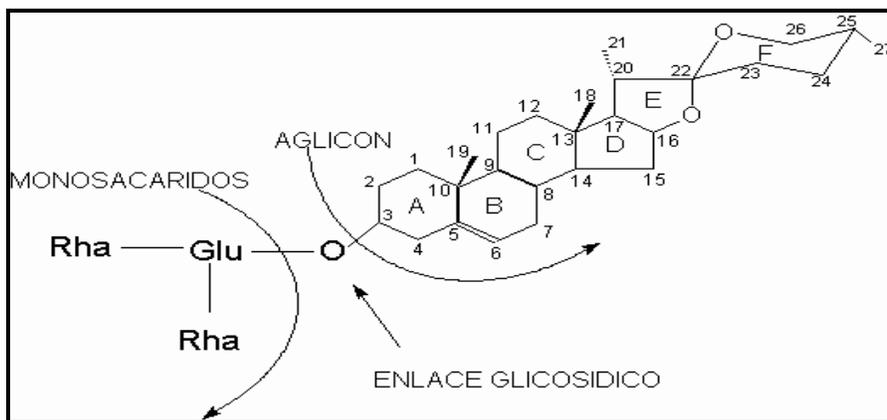


Figura 1. Estructura química de la saponina. Fuente: Orestes J., Nogueiras C. 2008

Tienen mucha importancia en la industria farmacéutica y cosmética. Actualmente su uso se ha diversificado y se aplica experimentalmente en el control de plagas de diferentes cultivos (papa, tomate, haba) por sus propiedades como biocontrolador o bioplaguicida de hongos fitopatógenos, como los de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* [1]. En el último siglo el uso indiscriminado de productos químicos como pesticidas produjo un desequilibrio, afectando a especies animales y a las personas [2]. Como alternativa surgieron estudios de compuestos naturales como bioplaguicidas, sin embargo para no seguir el camino de los pesticidas actualmente empleados [3], estos productos nuevos también deben ser evaluados por su toxicidad tanto para los ecosistemas, como para la salud de los usuarios. Las saponinas tienen la habilidad de producir ruptura de los eritrocitos, este hecho ha permitido emplear esta característica en la detección y en métodos de cuantificación de saponinas. Este método colorimétrico de hemólisis está basado en el procedimiento del índice hemolítico (Plhak, 1983). En la valoración muestra la existencia de saponinas con diferente actividad hemolítica dependiendo de su estructura. Generalmente se encuentran saponinas monodesmósidos más activos que sus análogos bisdesmósidos. Sin embargo de ser muy significativo en los resultados, existe la controversia. Por lo tanto puede ser empleado como un análisis preliminar para la cuantificación.

El presente trabajo pretende evaluar la actividad biocontroladora de saponinas extraídas de dos especies del género *Chenopodium* (Quinoa y Cañihua), su posible grado de eco toxicidad y hemotoxicidad in vitro

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo fue realizado con muestras de granos que fueron otorgados por PROINPA con el nombre de accesiones en el Banco de Germoplasma, que actualmente se encuentra bajo la supervisión del INIAF. Las muestras seleccionadas son las más representativas por su uniformidad y pureza. La Tabla 1 muestra las características de origen de las muestras estudiadas.

Los cuadros de crecimiento e inhibición muestran que el extracto M-16 (saponina) tiene capacidad biocotroladora sobre las cepas Bol RT-1 (*Fusarium* ssp) y Bol JR-1 (*Aspegilius flavus*) cepas aisladas de la tuna y castaña respectivamente [1]. En la prueba de inhibición contra Bol RT-1 *Fusarium* ssp. Dieron resultados altamente significativos comparados con el control negativo, tanto a los días 4, 7 teniendo su mayor inhibición a los 12 días con 47,6 %, control positivo tuvo una mejor inhibición en todos los tiempos de medición esto se debe por que es un fungicida químico, (Gráfico 1). Así mismo para la cepa Bol JR-1 *Aspegilius flavus* dio un resultado similar

presentándose inhibición a los 4, 7 días, teniendo su mayor inhibición a los 12 días con 42 % comparados con el control negativo, en ambos casos con un $p < 0.01$. Esto se debe a que las plantas contienen compuestos como metabolitos mayoritariamente flavonoides y triterpenos. Las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas, producen diversos metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad antifúngica. Entre los compuestos más conocidos se encuentran: flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, [9]

Tabla 1. Muestras extraídas y cuantificadas

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

Fuente: Cruz L. Dora, 2013

En otro estudio también el extracto metanólico de *Cestrum nocturnum* L. frente a *Rhizopus stolonifer*, se evidenció una inhibición miceliar de 66 y 50 % (algo superior a la obtenidas) de 2 fracciones que en estudios posteriores determinaron que correspondían a saponinas esteroideas. La actividad antifúngica es mayor en las saponinas que en las saponinas acetiladas, siendo esta actividad altamente influenciada por el número de componentes monosacáridos y su secuencia [10]. Las saponinas son glicosidos de terpenoides que se distribuyen ampliamente en el reino vegetal Saponinas esteroideas: están casi exclusivamente en las plantas angiospermas monocotiledoneas. A este grupo pertenecen las saponinas del esparrago. Saponinas triterpénicas: son las más comunes y aparecen principalmente en las angiospermas dicotiledoneas. [11]

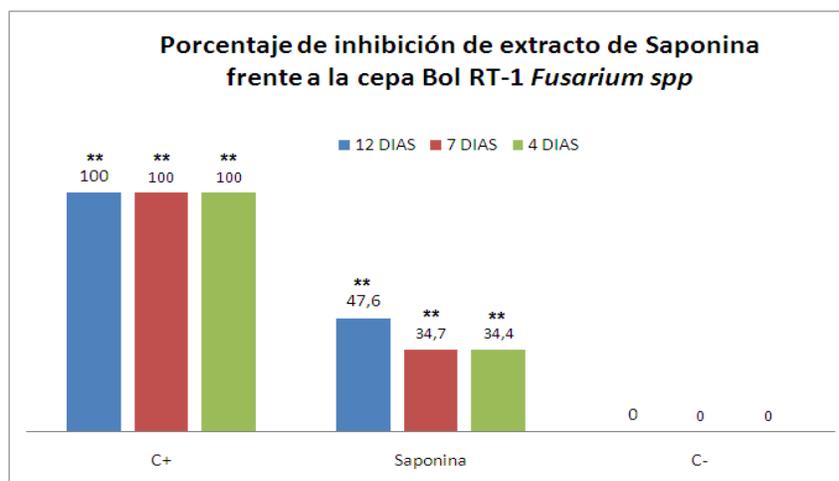
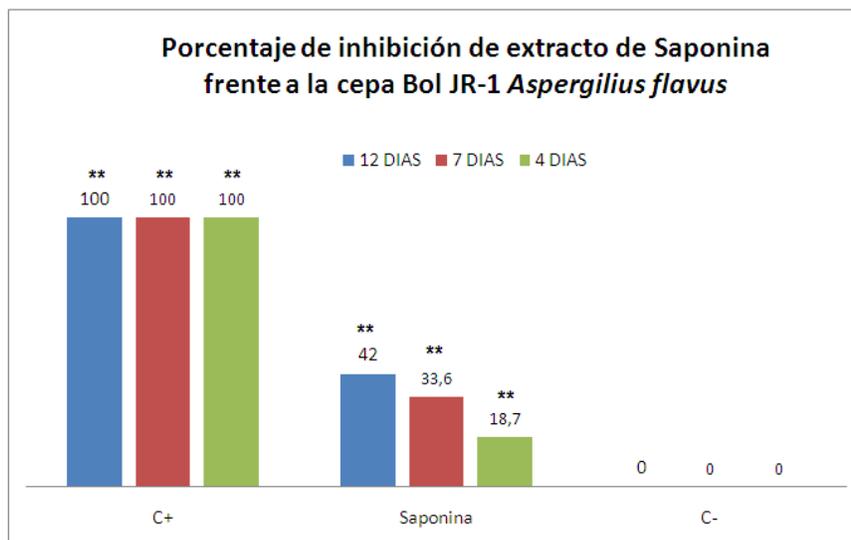
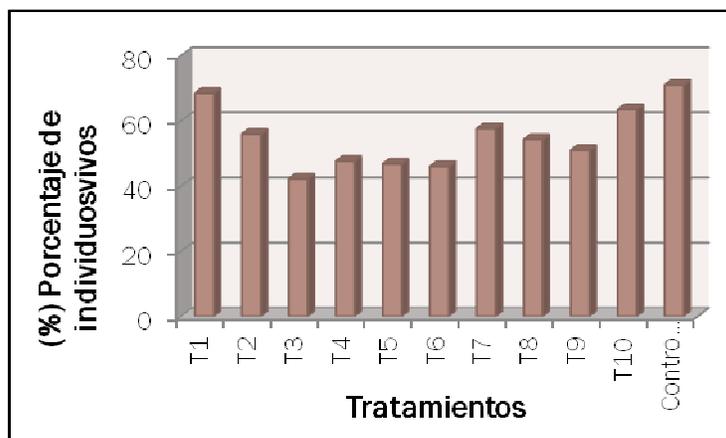


Gráfico 1. Análisis de la capacidad biocontrolada del extracto M-16 de saponina sobre *Fusarium spp*, a los 12 días de evaluación.



Gráfica 2. Análisis de la capacidad biocontrolada del extracto M-16 de saponina sobre *Aspergillus flavus*, a los 12 días de evaluación.

Los resultados de las pruebas de ecotoxicidad sobre *Daphnia magna* Gráfica 3, muestran que a una concentración de 25% p/v, los extractos de saponinas no son significativamente tóxicos para el medio ambiente.

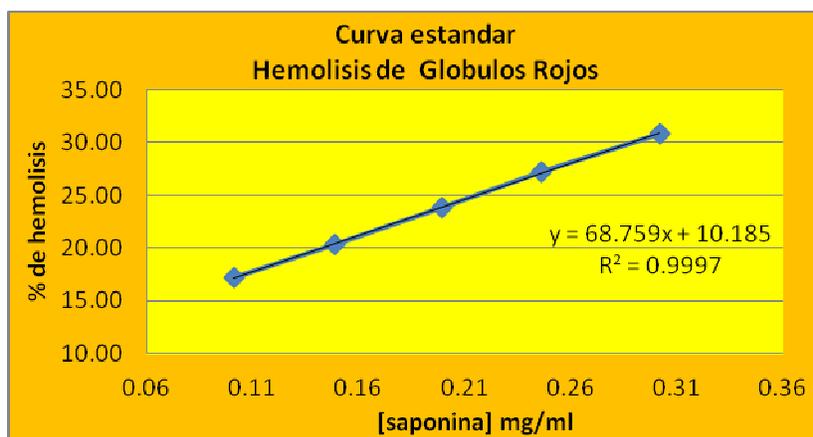


Gráfica 3. *Daphnia magna*, mediada por las concentraciones de saponina

Curva estándar de Saponina por hemólisis de Glóbulos Rojos.

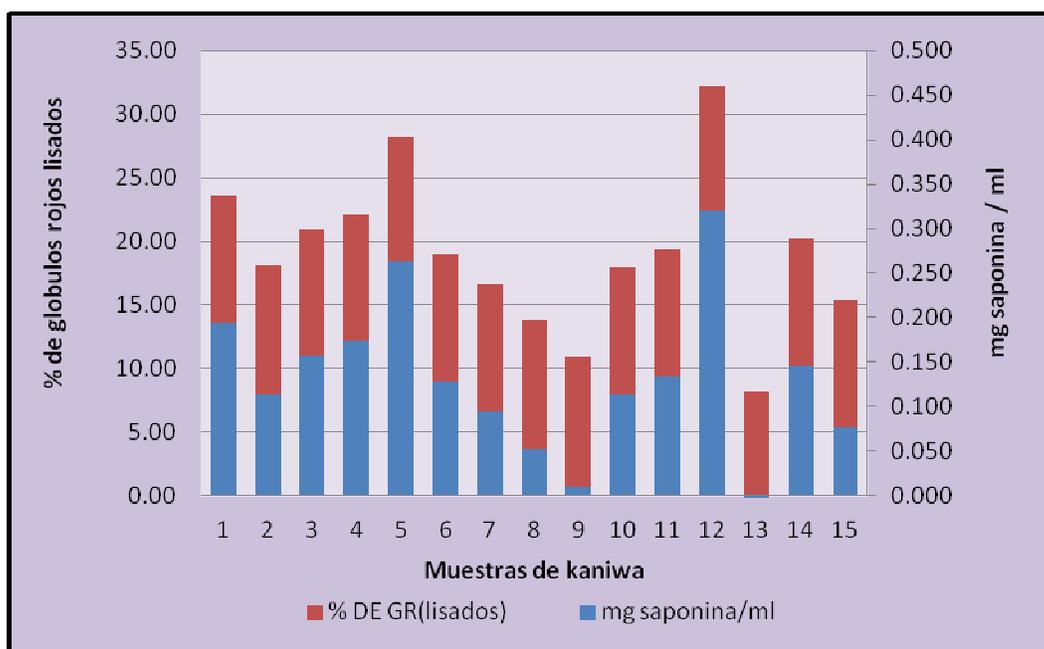
Por el método espectrofotométrico UV/Vis.

La curva estándar promedio de saponinas por hemólisis de Glóbulos rojos fue determinada siguiendo el protocolo de [7]. Los resultados muestran la curva estándar promedio de los ensayos por quintuplicado. La curva de calibración toma en cuenta la interferencia de color de las muestras en la determinación del blanco para cada determinación con los glóbulos rojos, también se considero la desviación estándar de las medidas. Los resultados se muestran en la Gráfica 4. En la que se puede comprobar el comportamiento lineal de la relación entre el porcentaje de Hemólisis y concentración de saponina cumpliendo la Ley de Beer para determinaciones de concentraciones desconocidas de saponinas de muestras de granos.



Gráfica 4. Curva Estándar – Espectrofotometría UV/Vis

De acuerdo a los resultados de los ensayos de hemotoxicidad Graf 4. , presenta un valor de HC50 de 0.58 mg/ml, *Análisis de saponinas en muestras de granos de cañihua*
Con el método espectrofotométrico de hemólisis de glóbulos rojos se realizaron la cuantificación de saponinas en la cañihua en mg saponina/ml. Así como también se determinaron el porcentaje de glóbulos rojos lisados de acuerdo a la concentración de saponinas presentes en cada una de las muestras como se puede observar en la Gráfica 5.



Gráfica 5. Porcentaje de glóbulos rojos lisados con saponina, obtenidos de muestras de Canihua

En la gráfica se observa que a una concentración de saponina 0.320 mg/ml (muestra 12) un 32.215 % de glóbulos rojos son lisados, valor que muestra un grado de toxicidad no muy elevado.

SECCION EXPERIMENTAL

Equipos y Reactivos

Las lecturas de absorbancia se realizaron en un Espectrofotómetro UV/Vis PERKIN ELMER. El solvente utilizado para la extracción de saponinas fue agua destilada, el análisis colorimétrico se realizó con glóbulos rojos para determinar el porcentaje de hemólisis. También se utilizó un estándar de saponina.

Materia prima

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

Método de extracción de saponinas

La extracción de las saponinas [5] se realizó en medio acuoso debido a que el etanol es capaz de extraer otras moléculas [6]. Además, se tomó en cuenta que el consumo de este grano implica el lavado con agua, por parte de los consumidores, para remover los compuestos amargos o saponinas.

Inhibición de extractos de saponina frente a las cepas Bol RT-1 Fusarium spp y Bol JR-1 Aspergillus flavus

Se realizó una dilución de saponina a una concentración de 1mg/mL en medio Patata Dextrosa Agar Difco TM (PDA), como control negativo se empleó agar agua, y para el control positivo se utilizó PDA y Mancozeb ([Etileno bis de magnesio (ditiocarbonato)], solución aplicada 60 g /20 L). a una concentración de 3 g/L. Una vez gelificados los medios de cultivo, se procedió a la siembra de un disco de 5 mm de diámetro (de un cultivo fresco de 4 días) de *Fusarium spp* y *Aspergillus flavus* respectivamente, en el centro de la caja de Petri, se evaluó el crecimiento hasta el día 12.

Cuantificación de saponinas y determinación del porcentaje de hemólisis por espectrofotometría UV-VIS

Para la cuantificación de saponinas y determinación del porcentaje de hemólisis se hace uso de glóbulos rojos para formar productos coloridos. Para lo cual también se elaboró una curva de calibración con un estándar de saponina de concentración 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mg de saponina/ml según el método propuesto por 2010. Para determinar la longitud de onda máxima de absorción (λ máx.) se realizó un barrido con un estándar de saponina, obteniéndose así λ máx. a 415 nm, longitud de onda a la cual se realizaron las lecturas correspondientes a la curva de calibración de la gráfica 4. De la misma forma fueron analizadas todas las muestras.

CONCLUSION

La Muestra 16 (saponina) demostró tener un efecto inhibitorio eficiente sobre el crecimiento de para *Aspergillus flavus* de 42 % a los 12 días y del 47 % de inhibición sobre *Fusarium spp*. Esta actividad comparada con los antifúngicos sintéticos MANCOZEB, no es eficiente en un lapso de tiempo reducido, sin embargo a largo plazo si se podría controlar estas plagas, con la ventaja adicional de el uso seguro para la conservación del medio ambiente como se muestra en la prueba de ecotoxicidad y segura para los usuarios como se comprueba en los ensayos de hemotoxicidad.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen al DIPGIS por su eficiente administración de los fondos que nos proporciona el IDH y al Convenio UMSA-ASDI que financia a los Proyectos “Valoración de compuestos Bioactivos de Bajo Peso Molecular en Alimentos” y al Proyecto “Biocontroladores”.

REFERENCES

1. Tenorio R., Terrazas E, Alvarez M. A., Vila J. L., Mollinedo P., concentrados de saponina de chenopodium quinoa y de caiphora andina: alternativas como biocontroladores de hongos fitopatógenos, *Rev. Bol. de Quim.*, 2010;27(1):33-40.
2. Perez Y., Cantillo T., Ramos E., González M. y López M., Prospección de hongos de suelo con potencialidades para el control biológico en suelos de agroecosistemas cubanos *Fitosanidad 2009 13(1):3-5*

3. Espinal, C.H. . Evaluación de actividad biocontroladora de *Trichoderma inhamatum cepa BOL 12 QD*, frente a *Botrytis fabae*, causante de la mancha chocolate en el haba (*Vicia faba*). FCFB - UMSA tesis de grado
4. Hernández, R., Obtención de crudos de saponinas hipocolesteromizantes del *Chenopodium quinoa* Willd , *Rev Cubana Med Milit* 1997; 26(1):55-62.
5. Repo-Carrasco, R., Acevedo de la Cruz, A., Icochea, J., Kallio, H. **2009**, Chemical and Functional Characterization of Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) Grain, Extrudate and Bran. *Plant Foods Human Nutrition*, 1-8. doi 10.1007/s11130-009-0109-0.).
6. Monje, C.Y., Raffaillac, J.P. 2006. "Determinación de Saponinas totales en quinua (*Chenopodium quinoa* Wild) por Método espectrofotométrico". Memorias del 4to. Congreso Nacional de la Asociación Boliviana de Protección Vegetal. Oruro, 5 al 7 de Abril 2006. C.E.A.C.' Dpto. Fitotecnia ' FCAPV VIO. ABPV, Oruro, Bolivia. 217-218.
7. Bonifaz, L.E. 2010. Determinación de la actividad Insecticida de la Saponina de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild) hidrolizada y no hidrolizada sobre *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. 54-72.
8. Orestes J., Nogueiras C. Las saponinas y sapogeninas esféricas. *Revista Ciencias.com*. 2008. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara. Cuba, 1-5.
9. Davicino R. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev. peru. biol.* 2007, 14(2): 247-251.