

Actividad toxicológica del extracto hidroalcohólico de cuatro cultivares de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” sobre *Daphnia pulex*. Ayacucho 2023

por ROSA CECILIA RODRIGUEZ TINEO

Fecha de entrega: 06-abr-2024 08:41a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2341540478

Nombre del archivo: RODRIGUEZ-TINEO-Rosa-Cecilia-pregrado-2024-TURNITIN.pdf (1.38M)

Total de palabras: 12259

Total de caracteres: 65227

1
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Actividad toxicológica del extracto hidroalcohólico
de cuatro cultivares de semillas de *Chenopodium*
***quinoa* Willd “quinua” sobre *Daphnia pulex*.**

Ayacucho 2023

Tesis para obtener el título profesional de:

Bióloga, Especialidad: Microbiología

Presentado por:

Bach. RODRÍGUEZ TINEO, Rosa Cecilia

Asesora:

Blga. ANAYA GONZÁLEZ, Roberta Brita

ORCID: 0000-0001-7187-9428

Co – asesora:

Blga. VENTURA CAVERO, Rosana Luzía

ORCID: 0000-0003-2268-491X

Ayacucho-Perú

2024

I. INTRODUCCIÓN

La obtención de los granos de quinua para consumo humano pasa por diversos procesos, uno de los más importantes, es el lavado para eliminar la saponina. Este es un factor antinutricional que proporciona sabor amargo y tiene una gran variedad de actividades biológicas, entre ellas las propiedades hemolíticas y detergentes. Muchas empresas productoras de quinua, aún no han generalizado procesos mecánicos y tecnológicos para eliminar dicho metabolito secundario. La mayoría sigue optando por procedimientos tradicionales, que implican el uso desmesurado de agua, generando así efluentes contaminados. Sin embargo, pocas industrias han incorporado a la saponina en su economía circular, aprovechando sus propiedades, en la medicina, industria farmacológica y agricultura. Tal es así, que la saponina se usa como reemplazo de pesticidas, herbicidas y otros productos sintéticos. Aun así, es necesario realizar evaluaciones de todas las sustancias a las cuales existe exposición humana, mediante bioensayos toxicológicos, que permitan establecer criterios de seguridad y efectividad (Martínez et al., 2010).

Esta investigación se centra en la actividad toxicológica de los extractos hidroalcohólicos, usando *Daphnia pulex* como modelo experimental. La finalidad fue evaluar los efectos tóxicos de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de cuatro cultivares de quinua, a través de los ensayos de toxicidad aguda en dos tiempos de exposición (24 y 48 horas). El experimento se realizó bajo condiciones de laboratorio, usando cinco concentraciones (0,00625; 0,0125; 0,025; 0,050 y 0,1 mg/mL) los cuales permitieron calcular la CL₅₀ y la CL₉₅; asimismo, se evaluó parámetros clave como el porcentaje de mortalidad. La estructura de la tesis comprende una revisión bibliográfica de los metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico, y sus posibles efectos sobre organismos acuáticos. El experimento se realizó en el Laboratorio de Biodiversidad y Sistema de

Información Geográfica (BioSIG) y en el Laboratorio de Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga de la Facultad de Ciencias Biológicas. Se llevó a cabo entre los meses de junio a noviembre de 2023, con la finalidad de lograr los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad toxicológica de cinco concentraciones del extracto hidroalcohólico de cuatro cultivares de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd sobre *Daphnia pulex* en condiciones de laboratorio. Ayacucho 2023.

Objetivo específico

1. Determinar el porcentaje de mortalidad de neonatos de *Daphnia pulex*, sometidas a concentraciones de 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05 y 0,1 mg/mL de los extractos hidroalcohólicos de cuatro cultivares de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" a 24 y 48 horas de exposición.
2. Calcular la concentración letal media (CL₅₀) y concentración letal noventa y cinco (CL₉₅) de los extractos hidroalcohólicos de cuatro cultivares de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua", sobre neonatos de *Daphnia pulex* a 24 y 48 horas de exposición.
3. Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de cuatro cultivares de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua".
4. Determinar cuantitativamente el contenido de saponinas extraídas en los extractos hidroalcohólicos de las semillas de los cuatro cultivares de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Internacionales

Martínez et al. (2010) evaluaron los efectos tóxicos de los extractos acuosos de diferentes plantas medicinales (*Chenopodium quinoa*, *Matricaria chamomilla*, *Urtica sp.*, *Achyrocline sp.*, *Baccharis genistelloides*, *Baccharis latifolia*), así como detergente doméstico y etanol, en *Daphnia sp.* A través del microensayo estático y determinación de la concentración letal media (CL₅₀). Lograron determinar que la solución de detergente fue más tóxica para *Daphnia sp.*, con una CL₅₀= 0,0005 mg/mL en comparación a *Matricaria chamomilla*, *Urtica sp.*, *Achyrocline sp.*, *B. latifolia* y *B. genistiloides*, las cuales todas presentaron CL₅₀= 0,05 mg/mL a 48 horas de exposición. A 96 horas, el etanol presentó una CL₅₀ = 0,0005 mg/mL y el extracto acuoso de *Chenopodium quinoa* una CL₅₀ = 0,05 mg/mL. Los resultados demostraron la alta sensibilidad de *Daphnia sp* a los extractos en base a la dosis suministrada y al tiempo de exposición.

Silva et al. (2003), estimaron la sensibilidad de la población de *Daphnia pulex*, al bicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) a través de la determinación de la concentración letal media (CL₅₀). Los resultados muestran que la concentración de 0,145 mg/L de K₂Cr₂O₇, es capaz de matar al 50 % de la población de *Daphnia pulex*. Los rangos de sensibilidad superior e inferior, están entre 0,092 – 0,197 mg/L respectivamente. Estos resultados revelan que las especies trabajadas son sensibles, por tanto, *Daphnia pulex* es un organismo modelo para realizar evaluaciones de toxicidad.

Escobar (2009) implementó un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando *Daphnia pulex* “pulga de agua”, en el área de la sabana de Bogotá. Determinó el índice de toxicidad de los efluentes industriales y las clasificó de acuerdo a su carga tóxica. Los efluentes industriales con la que trabajo son las industrias de

curtiembre (curtido de cromo y proceso de rivera), industria orgánica (planta cloro – soda), industria termoeléctrica (patio de cenizas) e industria galvanoplástica. Las CL_{50} obtenidas fueron: curtido de cromo ($CL_{50-48}=0,643$ %), proceso de rivera ($CL_{50-48}=0,038$ %), planta cloro soda ($CL_{50-48}=0,033$ %), patio de cenizas ($CL_{50-48}=68,461$ %) y en el proceso de galvanoplastia ($CL_{50-48}=0,060$ %). Estos resultados permitieron clasificar a las industrias en: despreciable (industria de curtiembre), moderada (industria termoeléctrica) y considerable (industria orgánica y galvanoplástica). De esta manera se muestra la utilidad de los bioensayos usando cladóceros constituyen una herramienta útil, de bajo costo, efectiva para el control, evaluación y clasificación de cuerpos de agua receptores. Además, permiten establecer mecanismos de calidad y control ambiental.

Nacionales

Bracho et al. (2022) evaluó ¹ la toxicidad de los extractos acuosos, etanólicos y hexánicos de las especies vegetales de *Petiveria alliaca* “mucura”, *Genipa americana* “huito” y *Solanum mammosun* “teta de vaca”, a través de los ensayos ² de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, a 48 horas de exposición. La mortalidad se determinó por la CL_{50} . Los resultados obtenidos fueron: *P. alliacea* (711,18; 255,50; 65,36 mg/L), *G. americana* (508,07; 154,35; 20,64 mg/L), *S. mammosum* (380,07; 90,59; 3,37 mg/L). Estos resultados demuestran que el empleo de especies vegetales para el control de plagas debe ser usado de manera responsable para generar el mínimo impacto ambiental, para lo cual se debe calcular su toxicidad ambiental.

Locales

Mamani (2019), extrajo las saponinas de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”, para determinar la actividad hemolítica sobre glóbulos rojos humanos tipo “O” y la actividad toxicológica en *Daphnia sp*, los resultados demostraron que las saponinas de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana” no presentan hemólisis mientras se use en pequeñas cantidades y la actividad toxicológica, se calculó por la concentración letal media (CL_{50}). Se obtuvo un resultado de 519,4185 ppm, el tamizaje fitoquímico indicó abundante cantidad de saponinas, sin detectar toxicidad. Sin embargo, las saponinas de la “tacsana”, tienen un alto potencial para investigaciones futuras.

1

2.2. Marco conceptual

2.2.1. *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”

Es una planta herbácea anual, dicotiledónea, que alcanza alturas de 3 metros, de raíz pivotante, tallo cilíndrico, hoja romboidal simple y alternada, tiene inflorescencia en forma de panoja, con flores sésiles, en cuanto al fruto es un aquenio que contiene una semilla de coloración variable, contiene proteínas de alta calidad, así como otros nutrientes (Apaza et al., 2013).

2.2.2. Cultivar

Conjunto de plantas cultivadas que se distinguen por sus características fisiológicas, morfológicas, citológicas y químicas, en su mayoría son seleccionadas por el hombre mediante mejoramiento genético (Arévalo et al., 2006).

2.2.3. Metabolitos secundarios

Compuestos químicos de estructura compleja, que se sintetizan en pequeñas cantidades, tienen funciones ecológicas, protectoras e intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Pérez & Ávalos, 2009).

2.2.4. Saponina

Son moléculas polares constituidas por una aglicona esteroide o triterpénica (grupo hidrofóbico) con una o más cadenas de azúcares (grupo hidrofílico), unidos por un enlace glicosídico (El Hazzam et al., 2020).

2.2.5. Toxicidad

10
Capacidad de una sustancia de causar efectos negativos sobre los organismos vivos, está determinada por la dosis, la potencia del tóxico, las propiedades fisicoquímicas del compuesto, tiempo de exposición, susceptibilidad del individuo y la vía de exposición (Roldán, 2016).

2.2.6. Ecotoxicidad

13
Disciplina científica que estudia el efecto de las sustancias tóxicas (naturales o sintéticas) sobre los organismos y ecosistemas (Planes & Fuchs, 2015).

2.2.7. Concentración letal media (CL₅₀).

8
Es la concentración de un compuesto que ocasiona la muerte del 50 % de organismos expuestos en un periodo de prueba, se expresa en unidades de masa de la sustancia por mililitros (Ramírez & Mendoza, 2008).

2.2.8. Concentración letal noventa y cinco (CL₉₅)

Es la concentración de un compuesto que ocasiona la muerte del 95 % de organismos expuestos en un periodo de prueba, se expresa en unidades de masa de la sustancia por mililitros (Ramírez & Mendoza, 2008).

2.2.9. *Daphnia pulex* “pulga de agua”.

Crustáceos planctónicos, conocidos como pulga agua, que habitan lagos, lagunas y estanques temporales poco profundas, pertenecen a los Phyllopoda (a veces llamado Branchiopoda), estos organismos presentan un sistema de filtración especializada, utilizan varias estructuras para alimentarse de manera eficiente de las partículas suspendidas en el agua (Ebert, 2005).

2.3. Bases teóricas

2.3.1. *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”

a. Taxonomía

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” Cronquist (1988).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Chenopodiaceae
Género	Chenopodium
Especie	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd
Nombre Vulgar	“quinua”

Oficina Regional para América Latina y el Caribe, (2011).

Definición y origen

La quinua es un pseudocereal, con alto valor nutricional (20 aminoácidos, 10 de ellos aminoácidos esenciales). Las evidencias históricas mencionan que su domesticación fue hace más de 5 000 años en las inmediaciones del Lago Titicaca de Perú y Bolivia, desde donde se expandió a los países andinos (Apaza et al., 2013).

b. Descripción botánica y agronómica

Planta dicotiledónea, con un periodo vegetativo que varía desde 90 a 150 días, se cultiva desde el nivel del mar hasta los 4 000 msnm, se adapta a suelos ácidos y alcalinos (4,5 a 9,0 de pH). La planta es erguida, puede alcanzar alturas desde los 60 cm hasta los 3 metros. La raíz es pivotante, profunda, ramificada y fibrosa (pueden alcanzar hasta 180 cm). El tallo es cilíndrico en el cuello de la planta y angulosa en las ramificaciones, pueden ser estriados o acanalados. Las hojas son

simples, ²¹ alternas y están formadas por peciolo largo, fino y acanalado, la lámina de la hoja en la misma planta puede ser romboidal, triangular o lanceolada. La inflorescencia es en panoja, con un eje central y con ramificaciones secundarias y terciarias. Las flores son sésiles y pequeñas (3 mm), sin pétalos, pueden ser hermafroditas (pistiladas y androestériles), con 10 % de polinización cruzada, en cuanto al fruto es aquenio de forma cilíndrica lenticular, el perigonio contiene una sola semilla. Cada una de estas estructuras tienen coloración variable (verde o rojo), dependiendo de las condiciones ambientales y la fertilidad del suelo, sin embargo, el color de los frutos pueden ser de color rojo, amarillo, negro o blanco, dependiendo de la variedad (Apaza et al., 2013; Di Fabio & Parraga, 2017).

c. Valor nutritivo

Tienen proteínas de alta calidad y aminoácidos esenciales. La composición nutricional fue detallada ⁵ por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) ³ (Lan et al., 2023; Di Fabio & Parraga, 2017).

Tabla 2. Valor nutricional de la quinua

Valor nutricional	
Análisis fisicoquímico (g/100 g, de muestra)	
Humedad	8,44
Proteínas	16,19
Fibra	1,84
Cenizas	2,00
Grasa	5,20
Extracto libre de nitrógeno	66,33
Energía	372,09

Di Fabio & Parraga, (2017).

La calidad de los nutrientes se debe principalmente al contenido de aminoácidos esenciales (especialmente la lisina), ácidos grasos esenciales, vitaminas y antioxidantes como los polifenoles y flavonoides. Es considerado como alimento sin gluten apto para pacientes celíacos y personas alérgicas al trigo (Nowak et al., 2016).

d. Variedades de quinua

- **INIA 431 – Altiplano.** Presente en la zona Circunlacustre y Suni de Puno, crece a 3 800 y 3 950 msnm. El color del episperma es blanco, contiene 0,03 % de saponina (Apaza et al., 2013).

- **INIA 427 – Amarilla Sacaca.** Presente en ⁴valles interandinos de las regiones Cusco y Apurímac, entre los 2 750 y 3 650 msnm, el color del episperma es amarillo y contiene 7 % de saponina (Apaza et al., 2013).
- **INIA 420 - Negra Collana.** Adaptado a ⁴la zona Suni del altiplano los 3 800 y 3 900 msnm. El color del episperma es negro brillante, y tiene 0,015 % de saponina (Apaza et al., 2013).
- **INIA 415- Pasankalla.** Crece en ⁴la zona agroecológica Suni del altiplano y en los valles interandinos. Presenta 0,04 % y el episperma tiene un color rojo vino (Apaza et al., 2013).
- **Illpa INIA.** Crece entre 3 800 a 3 900 msnm (en zonas Circunlacustres y Suni Contiene 0,02 % de saponina (Apaza et al., 2013).
- **Salcedo INIA.** Crece entre los 3 800 y 3 950 msnm. Contiene 0,02 % de saponina (Apaza et al., 2013).
- **Quillahuaman INIA.** Crece favorablemente en la región ⁴Cusco y Apurímac, adaptación óptima hasta los 3 500 msnm. Contiene 3 % de saponina (Apaza et al., 2013).
- ⁴**Amarilla Maranganí.** Crece en la región Cusco, adaptación óptima en los valles interandinos de las regiones de Cusco y Apurímac, hasta los 3 650 msnm. Contiene 7 % de saponinas (Apaza et al., 2013).
- **Blanca de Juli.** Crece entre los 3 800 a 3 900 msnm. Contiene 0,04 % de saponinas, y el color del episperma es blanco (Apaza et al., 2013).
- ⁴**Kankolla.** Crece en la zona Circunlacustre y Suni del altiplano entre los 3 800 y 3 900 msnm, con clima frío seco. Contiene 0,35 % de saponina y el color del episperma es blanco (Apaza et al., 2013).
- **Blanca de Junín.** Región Junín, adaptación óptima en los pisos de valles interandinos hasta los 3 500 msnm. Contiene un 3 % de saponina (Apaza et al., 2013).
- **Hualhuas.** Abundante en la región Junín, se adapta a ²¹varias localidades pertenecientes a la cuenca del Mantaro, contiene un 3 % de saponina y el color del episperma es blanco (Apaza et al., 2013).
- ⁴**Huancayo.** Región Junín, cuenca del Mantaro de 3 200 a 3 400 msnm, con las precipitaciones de 500 a 800 mm, debidamente distribuidos en todo su ciclo vegetativo, contiene un 3 % de saponina (Apaza et al., 2013).

2.3.2. Metabolitos secundarios

² Compuestos químicos de estructura compleja y de distribución limitada, se sintetizan en pequeñas cantidades, muchas de ellas tienen funciones ecológicas, otorga sabores amargos en las plantas para repeler a predadores, también intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Pérez & Ávalos, 2009).

a. Clasificación

- **Terpenos**

En este grupo se encuentran pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol y colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardíacos), látex y aceites esenciales (proporcionan sabor y olor a las plantas), y actúan como repelentes de insectos o insecticidas (Pérez & Ávalos, 2009).

- **Compuestos fenólicos.** En este grupo encontramos a los taninos, lignina y flavonoides, estos están implicados en la interacción planta – herbívoro, así como dar coloración a frutos y flores, por eso son importantes en la polinización y en dispersión de semillas. (Pérez & Ávalos, 2009).

- **Glicósidos.** Son ¹⁵ de gran importancia, su nombre se debe al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo, los glicósidos de gran interés son las saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y los glucosinolatos. Cumplen un papel protector y surfactante (Pérez & Ávalos, 2009).

- **Alcaloides.** Cumplen funciones de defensa contra herbívoros (muchos alcaloides son tóxicos), contra patógenos (tienen propiedades antimicrobianas y protegen a la planta contra infecciones fúngicas, bacterianas y virales), y atraen polinizadores (actúan como señales químicas que atraen abejas, aves y mariposas) (Pérez & Ávalos, 2009).

2.3.3. Saponinas

Metabolito secundario formado por moléculas polares constituidas por una aglicona esteroide o triterpénica (grupo hidrofóbico) con una o más cadenas de azúcares (grupo hidrofílico), unidos por un enlace glicosídico. La unión de las tres estructuras proporcionan propiedades tensioactivas, detergentes, emulsionantes (El Hazzam et al., 2020).

a. Clasificación

Saponinas esteroideas

Predominan en las plantas monocotiledóneas angiospermas, se sintetizan por la ruta del ácido mevalónico. Se subdividen en dos grupos; los derivados del espirostano y derivados del furostanol (Dewick, 2002; El Hazzam et al., 2020).

• Saponinas triterpénicas

Es limitado en las monocotiledóneas y abundante en las dicotiledóneas (Caryophyllaceae, Sapindaceae, Polygalaceae y Sapotaceae). Tienen una configuración de 4 a 5 anillos; o 30 carbonos unidos a varios oxígenos, son unidos a partir del isopreno (C_5) a través de la vía del mevalonato citosólico para formar un compuesto de 30 carbonos, derivan del dammarano y se dividen en pentacíclicas y tetracíclicas (Dewick, 2002).

b. Papel biológico

• **Actividad hemolítica.** Las saponinas tienen la capacidad de lisar la membrana de los eritrocitos, los esteroides se fijan en la membrana, ocasionando aumento en la permeabilidad que provoca la detonación de la membrana (Troisi et al., 2014).

• **Actividad antifúngica.** La actividad antifúngica de las saponinas de quinua en cepas de *Candida albicans*, está influenciada por la variación de las unidades de carbohidratos enlazados eterglicosídicamente y el oligoscárido enlazado acilglicosídicamente en C-28 de la aglicona. Los compuestos puros tienen poca o ninguna actividad antifúngica, lo que se concluye que tal actividad es un efecto sinérgico (Stuardo & San Martín, 2008).

• **Actividad antimicrobiana.** Las saponinas solubles en agua tienen actividad antimicrobiana en procariotas y eucariotas, pero solo en densidades celulares pequeñas (Miranda et al., 2014).

• **Citotoxicidad y actividad antitumoral.** Las saponinas son altamente citotóxicas, en particular los oleananos demuestran un efecto antitumoral a través de distintas vías, como anticancerígenos, antimetástasis, inmunoestimulación, quimioprevención, (Troisi et al., 2014).

c. Métodos de desaponificación

• Proceso por vía seca

Escarificación. Procesos llevados a cabo con maquinarias adecuadas, que permiten la fricción entre los granos por acción mecánica, para obtener un polvo rico en saponina llamada “mojuelo”. Esta técnica permite eliminar un 58 % de saponina (Corzo, 2008; Tapia & Fries, 2007).

Termomecánico. Este proceso involucra un lecho fluidizo tipo surtidor, la fricción y los choques entre las semillas, quita las capas externas del episperma, de esto se obtiene un polvo fino, la pérdida de los nutrientes es mínima por la abrasión controlada entre las partículas, y permite el ahorro de agua (Quiroga, 2010).

- **Procesos por vía húmeda**

Los granos de quinua se someten a remojo, agitación, enjuague y escurrido, se utiliza agua caliente de 55°C y agua fría, luego se procede al secado a 60 °C durante 30 minutos con el propósito de evitar la germinación, este proceso elimina un 68 % de saponina (Corzo, 2008).

- **Método combinado**

Se realiza un escarificado para quitar saponinas y se continúa con un lavado para eliminar las saponinas, esta técnica minimiza la ruptura de los granos (Gianna, 2013).

- d. **Método de análisis de las saponinas**

- **Índice de espuma**

Las saponinas rompen la tensión superficial del agua, que provoca la formación de espuma, la cantidad de saponinas en los granos se determina midiendo la altura de la espuma formada, según Galindo (1989), la espuma menor o igual a 5 mm indica una prueba negativa, de 5 a 9 mm sugiere poca cantidad de saponina, de 10 a 14 mm el contenido de saponinas es moderado y es abundante si las mediciones son iguales o sobrepasan los 15 mm (Subieta et al., 2011).

- **Índice de hemólisis**

En una suspensión de eritrocitos, que entran en contacto con la saponinas, se produce la ruptura de la membrana de estas células, provocando la liberación de la hemoglobina, esto genera un cambio de la absorbancia en el sobrenadante de la suspensión, esto permite cuantificar y detectar la presencia de saponinas en los compuestos que se quieren estudiar, y esto permite precisar el grado de pureza de las saponinas (Siller, 2012).

- **Espectrofotometría**

Las saponinas pueden reaccionar con sustancias específicas como el anisaldehído, y otros aldehídos aromáticos con fuerte ácido mineral, estos generan un producto coloreado como resultado de la deshidratación de los aglicones, por tanto estos tienen la capacidad de emitir o absorber radiación electromagnética, para determinar la concentración del producto durante la

reacción, en tanto ³ el espectrofotómetro capta la cantidad de luz emitida a través de la solución contenida en la celda (Triguero, 2021; Siller, 2012).

- **Cromatografía en capa fina (TLC)**

Las placas cromatográficas (gel de silicato) se usan para el análisis de saponinas puras o extractos crudos, los reactivos más comunes para la visualización son vainillina – ácido sulfúrico, Liebermann – Burchard, cloruro de antimonio, anisaldehído – ácido sulfúrico, en la fase móvil se usan solventes como cloroformo, metanol, agua, butanol, etanol, amoníaco, los reactivos reveladores al ser calentados revelan manchas que son medidas con densitómetro para cuantificar las saponinas (Siller, 2012).

- ⁶ **Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

Esta técnica ayuda a obtener saponinas en pequeñas cantidades, las partículas de la fase estacionaria en HPLC son de 5 a 30 μm , las separaciones en su mayoría se realizan en paquetes de sílica de octilsilano con detección de índice de refracción, el solvente más usado es el metanol – agua o acetonitrilo – agua (Siller, 2012).

e. Aplicaciones comerciales de las saponinas

Las saponinas por sus propiedades detergentes, emulsionantes y medicinales son usadas en la industria para la fabricación de detergentes, champús y jabones, la industria farmacéutica las usa como agentes antiinflamatorios y anticancerígenos, la industria alimentaria la ve como un potente estabilizador para mejorar la textura de alimentos y en la agricultura se usa como un pesticida natural (Siller, 2012).

2.3.4. Organismos de prueba

a. Especies de prueba

Son organismos vivos utilizados para evaluar los efectos de sustancias químicas, estos se cultivan con facilidad en el laboratorio, son sensibles a una variedad de contaminantes y están disponibles durante todo el año en fuentes comerciales (United States Environmental Protection Agency, 2002).

Los organismos de prueba de agua dulce recomendados son:

- *Ceriodaphnia dubia* (cladóceros)
- *Daphnia pulex* (cladóceros)
- *Pimephales promelas* (peces)
- *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris) y *Salvelinus fontinalis* (trucha de arroyo)(USEPA, 2002).

b. El género *Daphnia* y sus características

Las *Daphnias* son crustáceos planctónicos, conocidos como pulga de agua. Estructuralmente los cladóceros tienen 10 pares de apéndices: anténulas, antenas, maxilares y mandíbulas, 5 a 6 extremidades en el tronco (son aparatos de alimentación y respiración) al final del abdomen hay un par de garras. Su cuerpo es transparente, segmentado en tres regiones (céfalon, perion y pleon) y están recubiertas por un caparazón de quitina. Asimismo, tiene tagma cefálica formado por seis metámeros que se fusionan para formar un caparazón bivalvo, prolongándose hasta la espina caudal. Su visión está conformada por un ojo compuesto de color negro ubicado en la zona antero – medial del céfalon. El tamaño de las pulgas de agua, varía según la especie, pero en general la longitud corporal oscila entre 0,5 a 6,0 mm (medido desde la cabeza hasta la cola) (Garibotti et al., 2009; Ebert, 2005).

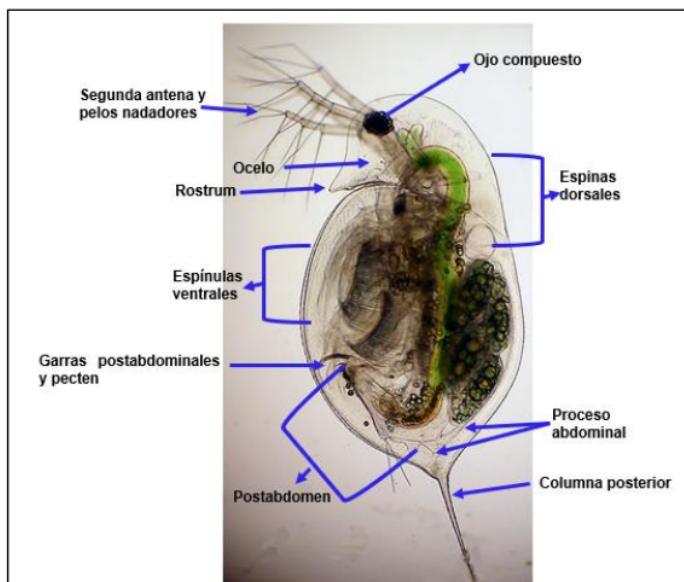


Figura 1. Anatomía de las *Daphnias* (Haney et al., 2013).

c. *Daphnia pulex* “pulga de agua”

• Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica, proporcionada por la base de datos del Sistema Integrado de Información Taxonómica en línea, muestra la siguiente clasificación:

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Daphnia pulex* “pulga de agua” Müller (1785).

Reino	Animal
Phylum	Arthropoda
Clase	Branchiopoda
Orden	Diplostraca
Familia	Daphniidae
Género	Daphnia
Especie	<i>Daphnia pulex</i>
Nombre vulgar	“Pulga de agua”

Integrated Taxonomic Information System (2004)

• Morfología

Daphnia pulex es una especie con características variables, se distingue de las otras especies por los dientes grandes en el pecten medio de la garra post abdominal (5 a 7 dientes). Alcanza 3,5 mm de longitud (USEPA, 2002).

• Distribución

Daphnia pulex se encuentra mayormente en América del Norte (excepto en el Ártico y en los trópicos), pero también están en gran parte de Europa y América del Sur (USEPA, 2002).

• Ecología y hábitat

Se encuentran en lagos, lagunas y estanques temporales, poco profundos, ricos en materia orgánica y con una demanda de oxígeno mayor a 3 – 4 mg/L, son especies de agua limpia y predominan en periodos de baja turbidez. Presentan migración vertical diurna, como mecanismo de defensa contra sus depredadores. Las hembras se reproducen por partenogénesis predominan durante todo el año, los cigotos se desarrollan dentro del ephippium por partenogénesis ameóitica sin aporte genético de los machos, por tanto, la progenie es genéticamente idéntica a la madre, la presencia de machos se da en periodos de escasez, dando como resultado huevos de resistencia (Ephippia) (USEPA, 2002).

• Alimentación

Están adaptadas para vivir en floraciones de algas (ricas en proteínas y carbohidratos), se alimentan de algas y bacterias, en condiciones de laboratorio se alimentan con levadura (USEPA, 2002).

- **Ciclo de vida**

El promedio de vida de *Daphnia pulex* a 20 °C es de 50 días. Se ha reconocido cuatro periodos de vida: huevo, juvenil, adolescencia y adulto, así lo detalla Pennak (1955), las hembras almacenan seis a 10 huevos en la cámara de cría, los huevos eclosionan en la misma cámara, cuando logran asemejarse a los adultos son liberados dos días después de la muda, tiene tres a cuatro etapas juveniles, para alcanzar la etapa de adolescencia (periodo de madurez sexual, los óvulos alcanzan su pleno desarrollo en el ovario), este tiene una sola fase y es de corta duración, el adulto suele tener entre 18 y 25 etapas (USEPA, 2002).

2.3.5. Toxicología

Es la ciencia que se ocupa del estudio de las sustancias tóxicas y el efecto que tienen estas sobre los organismos vivos. Guitart (2008) define a un tóxico como cualquier agente químico o radiación física que, tras entrar en contacto, y ser absorbido por un organismo vivo, en cantidades (dosis) suficientes, puede generar un efecto adverso de manera directa o indirecta, la toxicología trata compuestos exógenos al metabolismo normal del organismo xenobióticos (Roldán, 2016).

a. Toxicidad

Es la capacidad de una sustancia de causar algún efecto nocivo sobre los organismos vivos, está determinada por la dosis, la potencia del tóxico, las propiedades fisicoquímicas del compuesto, tiempo de exposición, susceptibilidad del individuo y la vía de exposición (Roldán, 2016).

b. Tipos de toxicidad

- **Toxicidad crónica.** Implica dosis repetida y prolongada del compuesto químico a probar, los efectos se desarrollan a lo largo del tiempo y puede no ser evidente de inmediato, el objetivo de esta prueba es investigar la toxicidad en órganos, para estimar el nivel de los efectos adversos no observados, en los organismos expuestos se registran los signos y síntomas, se colectan muestras de sangre u otro tipo de fluido y se analizan, al finalizar la prueba los organismos que sobreviven se sacrifican, y se realizan un examen microscópico de órganos y tejidos para caracterizar las patologías asociadas al químico (Roldán, 2016).
- **Toxicidad aguda.** En esta prueba el parámetro cuantificable es la muerte, consiste en realizar una única exposición en un periodo corto, a diferentes concentraciones del compuesto químico a probar y un grupo control, los organismos expuestos se examinan diariamente, se registran los signos y síntomas, generados por el agente expuesto. La cantidad de muertes que se

obtienen en cada grupo de dosis y en el control se registran y se analizan por métodos estadísticos, las medidas de (Concentración Letal Media) CL₅₀ y (Dosis Letal Media) DL₅₀, son muy comunes para este tipo de estudios (Roldán, 2016).

c. Concentración Letal Media (CL₅₀) y su determinación

Es la medida que describe la cantidad o concentración de un xenobiótico, que es capaz de inhibir un proceso biológico en un ambiente específico que resulta ser letal para un 50 % de organismos expuestos en un tiempo determinado. Puede ser determinada construyendo una curva de dosis – respuesta. La CL₅₀ se expresa en unidades de masa de la sustancia por masa seca (mg/mL) (Ramírez & Mendoza, 2008).

Para la determinación de la CL₅₀, primero se realiza el conteo de individuos muertos en cada concentración y en el testigo, la corrección de las mortalidades se realiza con la fórmula de Abbott (Menéndez, 2009).

Fórmula de Abbott (1925) para corregir la mortalidad natural:

$$MC = \frac{X - Y}{100 - Y} (100)$$

Donde:

MC= Mortalidad corregida (%)

X = Mortalidad en el tratamiento (%)

Y = Mortalidad en el testigo (%) (Rayme, 2015).

Si en el transcurso de las pruebas, el porcentaje de mortalidad en los testigos excede al 10% la prueba se anula (Ramírez & Mendoza, 2008).

2.3.6. Ecotoxicología

Es una disciplina científica que estudia el efecto de sustancias y compuestos químicos (naturales o sintéticos) sobre los ecosistemas. Las normativas ambientales se fijan teniendo en consideración las características de los compuestos químicos, su toxicidad, su persistencia en el ambiente y su potencial bioacumulación, por tanto los conocimientos ecotoxicológicos proporcionan información científica para la conformación de convenios internacionales y legislaciones que limiten su uso (Planes & Fuchs, 2015).

a. Principales contaminantes

• Químicos inorgánicos

Metales. Son abundantes en la naturaleza, por las actividades mineras, las concentraciones disueltas causan la muerte de muchas especies acuáticas; el

arsénico es un metal muy usado en la elaboración de plaguicidas, herbicidas y se liberan en grandes cantidades durante la extracción de oro y plomo, es considerado como un agente tóxico y cancerígeno al igual que el cadmio que se utiliza en la galvanoplastia, en baterías y plásticos, en tanto el cobre, zinc, níquel son elementos esenciales, pero son tóxicos en altas concentraciones, es muy usado para los cableados, plomería y electrónica (Carriquiriborde et al., 2021).

Los gases inorgánicos. El CO₂ (dióxido de carbono), los óxidos de nitrógeno (NO_x) y dióxido de azufre (SO₂) son gases que se emiten en grandes cantidades, estos reaccionan en la atmósfera formando ácidos que generan precipitaciones con pH bajo (lluvia ácida), las evidencias a nivel de la salud están vinculadas a enfermedades pulmonares y cardiovasculares e incluso la muerte (Carriquiriborde et al., 2021).

• Químicos orgánicos

Constituido principalmente por plaguicidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas) que ingresan de manera intencional al medio ambiente, asimismo tenemos a los contaminantes que ingresan de manera no intencional al medio ambiente, como son los subproductos de procesos industriales, detergentes, solventes, productos de cuidado personal y farmacéuticos a través de efluentes (Carriquiriborde et al., 2021).

• Físicos

Constituido por fragmentos o partículas subatómicas, energía calorífica, visible y luz ultravioleta (UV), rayos X y los rayos gamma (γ) y la temperatura son factores físicos que causan contaminación térmica, generando cambios en las condiciones ambientales (Carriquiriborde et al., 2021).

b. Biodisponibilidad, bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación de los contaminantes

Los contaminantes que se encuentran en el ambiente, se incorporan a los seres vivos, se acumulan en sitios blanco donde se desencadena el efecto tóxico, a través de tres fases de acción, la primera es la exposición donde influyen factores químicos, físicos y biológicos que determinan su biodisponibilidad (grado de un contaminante que puede ser incorporado por el organismo), la segunda fase es la partición, dada por las condiciones que facilitan la absorción, distribución, metabolización y excreción (bioacumulación) y la tercera fase es la potencia, que es la concentración interna del contaminante que según el mecanismo de acción interactuará con las moléculas del sitio blanco lo que determinará la toxicidad del

contaminante. La biomagnificación se define como incrementación del contaminante de un nivel trófico a otro (Carriquiriborde et al., 2021).

c. Vías de ingreso y efecto de los contaminantes sobre los organismos

Los agentes tóxicos ingresan al cuerpo por inhalación de vapores, aerosoles, gas, polvo y humo, pueden ingresar a través de la boca o nariz (vía respiratoria), así como por la ingestión de alimentos, agua contaminados con sustancias tóxicas (vía digestiva). Algunas sustancias tóxicas pueden ser absorbidas por la piel al entrar en contacto directo (vía cutánea) y muchos agentes tóxicos ingresan por los ojos al haber un contacto directo (vía ocular) (Carriquiriborde et al., 2021).

1

III.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y en el Laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica (BioSIG) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.1.1. Ubicación geográfica del lugar de estudio

Longitud : 634788,67

Latitud : 8603575,11

Altitud (msnm) : 2 791

3.1.2. Lugar de recolección de muestras biológicas

- **Recolección de cultivos de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”.**

Las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”, fueron obtenidas en la región de Ayacucho, provincia Huamanga, distrito de Vilcashuamán, específicamente en el Centro Poblado de Colpapampa ubicado a 3 836 msnm (Figura 2).

Tabla 4. Ubicación geográfica de los puntos de colecta de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”.

Cultivos	Este	Norte	Altitud (msnm)
Quinoa Amarilla Marangani	619993,92	8492747,06	3839
Quinoa Blanca Junín	620004,34	8492691,14	3839
Quinoa Roja Pasankalla	619898,43	8492599,41	3836
Quinoa Negra Collana	620004,39	8492464,89	3839

- **Recolección de *Daphnia pulex* “pulga de agua”**

Los organismos de prueba fueron colectados en la laguna de Condorccocha, que se ubica en el departamento de Ayacucho, provincia Huamanga, distrito Chiara y en la localidad de Condorccocha, a 3 621 msnm (Figura 3).

Tabla 5. Ubicación geográfica de los puntos de colecta de *Daphnia pulex* "pulga de agua".

Puntos de muestreo	Este	Norte	Altitud (msnm)
P1	587605,18	8513856,40	3621
P2	587680,14	8513880,61	3621
P3	587752,11	8513838,76	3621
P4	587711,57	8513804,41	3621
P5	587640,00	8513815,57	3621

P1: Punto uno; P2: Punto dos; P3: Punto tres; P4: Punto cuatro; P5: Punto cinco.

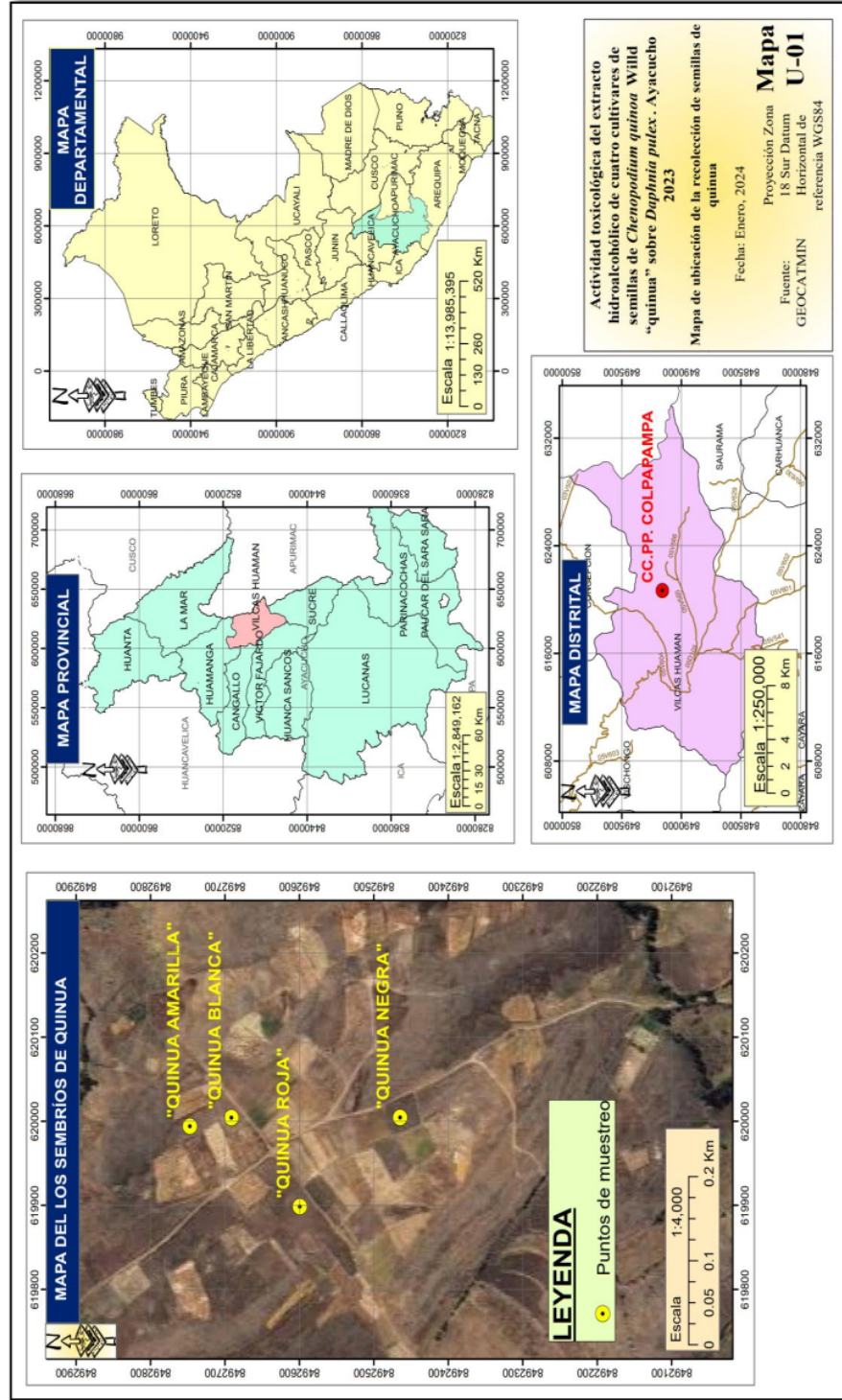
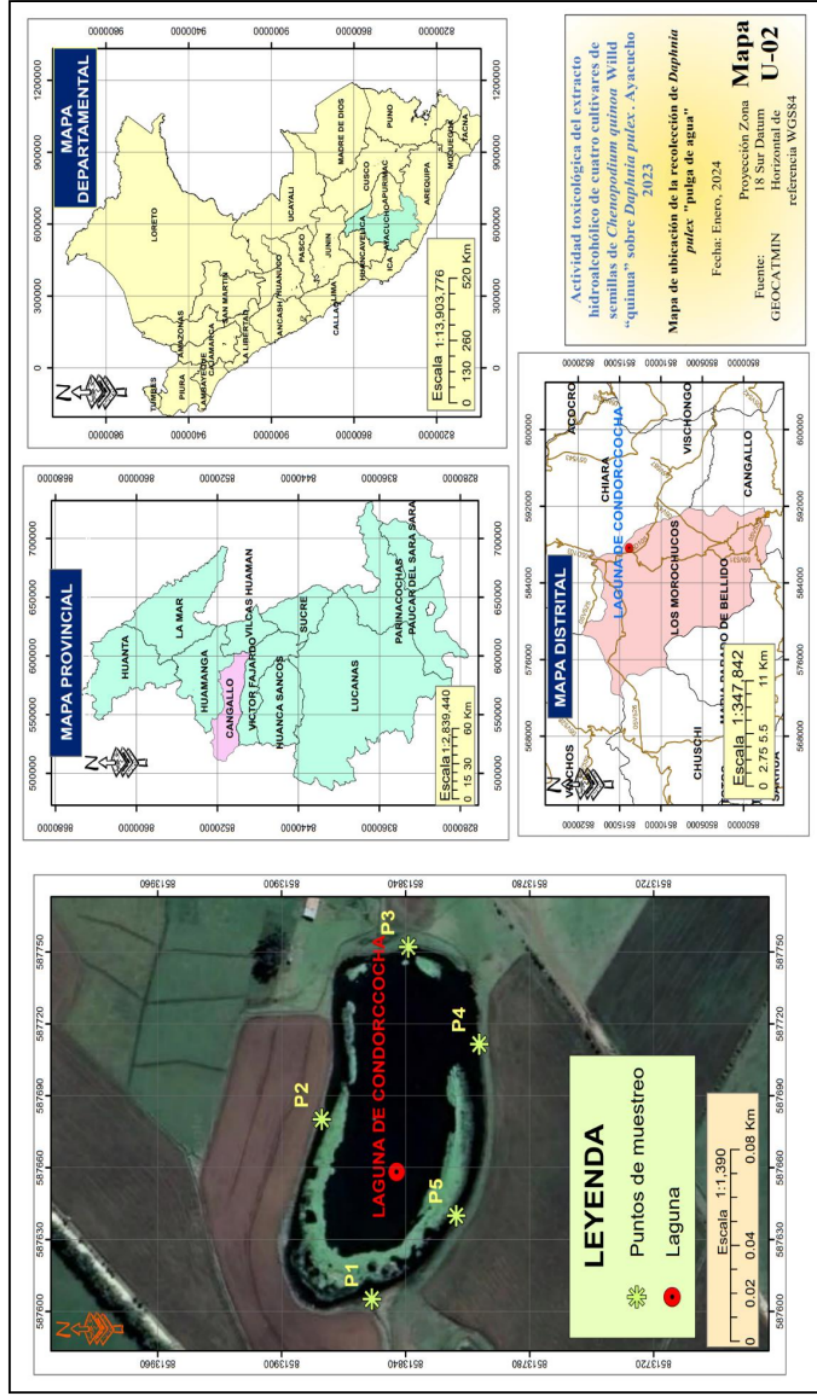


Figura 2. Mapa para la ubicación geográfica de la colecta de semillas de *Chenopodium quinoa* Wild "quinua".



P1: Punto uno; P2: Punto dos; P3: Punto tres; P4: Punto cuatro y P5: Punto cinco.

Figura 3. Mapa para la ubicación geográfica de la colecta de *Daphnia pulex* "pulga de agua".

¹ 3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

1 kg de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd de los cultivares Amarilla Maranganí, Blanca Junín, Roja Pasankalla y Negra Collana.

¹ 3.2.2. Muestra

300 g de semillas de quinua Amarilla Maranganí.

300 g de semillas de quinua Blanca Junín.

300 g de semillas de quinua Roja Pasankalla.

300 g de semillas de quinua Negra Collana.

3.2.3. Organismo de prueba

Neonatos de *Daphnia pulex*.

3.2.4. Unidad experimental

Frasco de plástico con 80 mL de solución de ²extracto hidroalcohólico de semillas de quinua a diferentes concentraciones, conteniendo 10 neonatos de *Daphnia pulex*.

¹ 3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Colecta de semillas

Las semillas de quinua Amarilla Maranganí, Blanca Junín, Roja Pasankalla y Negra Collana, se colectaron en el centro poblado de Colpapampa a 3 836 msnm, en el periodo de cosecha (junio), en cantidades de 1 kg. Estas se almacenaron en bolsas de polietileno, debidamente rotuladas (nombre del cultivar, fecha y lugar de recolección).

3.3.2. Proceso de identificación taxonómica y reconocimiento de variedad de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”

Para realizar la identificación taxonómica, se utilizaron plántulas en buen estado (dispuestas en prensa de madera) y las semillas. Ambos elementos colectados fueron llevados a especialistas botánicos.

3.3.3. Obtención de los extractos hidroalcohólicos

Los procedimientos para obtener los extractos hidroalcohólicos de quinua se llevaron ¹a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, y conllevó los siguientes pasos:

- **Selección**

Se desecharon las semillas en mal estado, así como palillos y piedras presentes en las muestras de quinua. De esta manera se obtuvo 300 g de semillas limpias y en buen estado.

- **Maceración**

Las semillas seleccionadas se colocaron en botellas de color ámbar de capacidad de 2 L, enseguida se agregó 1 200 mL de alcohol al 70 %. Durante siete días se realizó la agitación manual por 20 minutos. Cumplido los días de maceración, se realizó la filtración usando papel Whatman número 41. Los extractos se recogieron en recipientes de porcelana, luego se transfirieron al equipo evaporador rotatorio (Yamato – modelo RE 301) para eliminar el agua. Posteriormente el extracto se secó en la estufa (Labor Muzzeripari Muvek) a 40°C durante tres días (Miranda & Cuéllar, 2000). El resultado final fue un concentrado de consistencia pastosa y de color ámbar (anexo 24).

- **Determinación del porcentaje de rendimiento del extracto hidroalcohólico seco**

Se realizó un raspado a los recipientes de porcelana para extraer el concentrado pastoso, después se pesó en una balanza analítica marca Nimbus NBL 241e Adam. Para la determinación del porcentaje de rendimiento, se utilizó la ecuación empleada por Carrillo et al. (2011).

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Peso (g) del extracto}}{\text{Peso (g) de semillas}} \times 100$$

- **Almacenamiento y mantenimiento**

Los concentrados pastosos fueron almacenados en frascos de vidrio color ámbar y se mantuvieron en refrigeración a 8 °C, hasta el momento de su uso (Miranda & Cuéllar, 2000).

3.3.4. Tamizaje fitoquímico

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La identificación cualitativa de los metabolitos secundarios se realizó a través de la observación de precipitados y cambios de coloración (tabla 6).

Tabla 6. Procedimiento del tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos secos de las semillas de quinua.

Metabolitos secundarios	Procedimientos	Resultados
Alcaloides	Ensayo de Dragendorff Se tomó una pequeña cantidad de muestra y se suspendió en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 %. Se calentó suavemente y una vez enfriado se le agregó tres gotas de reactivo Dragendorff.	• Opalescencia (+) • Turbidez definida (++) • Precipitado (+++)
	Ensayo de Mayer Una pequeña cantidad de muestra se disolvió en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % (solución ácida), se adicionó una pizca de cloruro de sodio en polvo, luego se agitó suavemente y se filtró. Finalmente se añadió tres gotas de reactivo Mayer.	• Opalescencia (+) • Turbidez definida (++) • Precipitado (+++)
	Ensayo de Wagner Se preparó nuevamente la solución ácida, y se añadió tres gotas del reactivo Wagner.	• Opalescencia (+) • Turbidez definida (++) • Precipitado (+++)
Aminas	Ensayo de Ninhidrina Una pequeña cantidad de muestra se diluyó en alcohol, se tomó una pequeña alícuota, después se mezcló con 2 mL de solución de ninhidrina al 2 %. Finalmente se calentó en baño María por 10 minutos.	• Azul violáceo
Antocianidinas	Se preparó 1 mL de muestra etanólica y se agregó 0,5 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado. Luego se calentó en baño María por 10 minutos, se dejó enfriar y seguidamente se añadió 0,5 mL de agua y 1 mL de alcohol amílico. Finalmente se agitó y se dejó en reposo hasta la aparición de dos fases.	• Rojo a marrón en la fase amílica
Azúcares reductores	Reacción de Benedict Se disolvió la muestra del extracto hidroalcohólico seco en 1 mL de agua destilada, se añadió 2 mL de reactivo de Benedict y se calentó en baño María por 10 minutos.	• Precipitado rojo a rojo ladrillo
Catequinas	Se tomó una gota de la solución hidroalcohólica con una pipeta Pasteur y se aplicó sobre papel filtro. Sobre la mancha se agregó dos gotas de solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3).	• Verde carmelita
Flavonoides	Ensayo de Kedde Se tomó 1 mL del extracto en etanol y se mezcló con 1 mL de reactivo Kedde y se dejó reposar por 10 minutos.	• Violáceo

	Ensayo de Shinoda Una pequeña cantidad de muestra (extracto hidroalcohólico seco), se diluyó en 1 mL de ácido clorhídrico concentrado (HCl), a este se añadió tres pedazos pequeños de cinta de magnesio metálico, una vez reaccionado se esperó cinco minutos. Para finalizar se añadió 1 mL de alcohol amílico, se mezcló cuidadosamente y se dejó reposar.	Amarillo, rojo, en la parte amílica
Compuestos fenólicos	Ensayo de Cloruro férrico A una alícuota del extracto hidroalcohólico, se añadió tres gotas de solución de tricloruro férrico (FeCl_3) al 5 %. A una alícuota del extracto acuoso, se añadió una gota acetato de sodio (CH_3COONa) y tres gotas de tricloruro férrico.	- Verde azul (taninos) - Rojo- vino (fenoles)
Lactonas y cumarinas	Ensayo de Baljet A 1 mL de solución etanólica de la muestra, se añadió 1 mL de solución de Baljet.	Rojo claro u oscuro
Quinonas	Ensayo Borntrager Una pizca de muestra se diluyó en 1 mL de cloroformo, luego se añadió 1 mL de hidróxido de sodio al 5 %, seguidamente se agitó para mezclar y para finalizar se dejó en reposo hasta su separación en dos fases.	Rosado rojizo en la fase amoniacal
Saponinas	Prueba de espuma Una pizca de muestra se diluyó con 5 mL agua destilada, y se agitó durante 10 minutos.	Espuma en la superficie de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos
Triterpenos y esteroides	Ensayo de Liebermann-Burchard Una pizca de la muestra se diluyó con 1 mL de cloroformo, seguidamente se añadió 1 mL de ácido acético, se agitó suavemente. Por la pared del tubo de ensayo se dejó resbalar tres gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.	- Rosado – azul (muy rápido) - Verde intenso visible - Verde oscuro – negro al final de la reacción

Miranda y Cuellar (2000).

3.3.5. Cuantificación de saponinas

a. Preparación del reactivo Liebermann – Burchard

Teniendo en cuenta las indicaciones de Monje et al. (2016) se preparó el reactivo Liebermann Burchard, mezclando anhídrido acético y ácido sulfúrico en proporción 1:5, la mezcla fue enfriada durante cinco minutos en el refrigerador a 4 °C (Gianna, 2013).

b. Barrido espectral con saponina purificada

Para obtener la máxima longitud de onda a la cual se absorbe la muestra de saponina, se realizó un barrido espectral. Para este fin se desarrollaron una serie de actividades tomando en cuenta las especificaciones de Ramos (2016):

- Se pesó 1 mg de saponina de *Quillaja saponaria* (Sigma) y se disolvió en 1 mL de agua destilada purificada. Se agitó a 1 500 RPM por 30 segundos.
- 1 mL de la solución se transfirió a un tubo de ensayo con tapa rosca. Seguidamente se agregó 3,5 mL del reactivo Liebermann Burchard. La mezcla se agitó por 30 segundos a una velocidad de 3 500 RPM. Luego se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- El barrido espectral se realizó entre 400 a 600 nm (Lozano et al., 2012; Gianna 2013). Se usó el equipo de espectrofotometría UV visible marca Genesys 10S VIS. Este procedimiento se realizó por triplicado.
- La mayor absorbancia fue a 420 nm (anexo 1).

c. Elaboración de curva de calibración

• **Preparación de solución madre.** Se preparó una solución madre de 1 mg/mL de la saponina de *Quillaja saponaria* (patrón) (Ramos, 2016).

• **Curva de calibración.** Partiendo de la solución madre se prepararon soluciones de 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 mg/mL, se tomó 1 mL de cada dilución y se mezcló con 3,5 mL de reactivo Liebermann Burchard, se agitó en vórtex por 30 segundos, se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 420 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado (Ramos, 2016).

Las concentraciones iniciales se multiplicaron con el factor de dilución:

$$FD = \frac{Vm}{Vt}$$

Donde:

FD: Factor de dilución

V_m: Volumen de la muestra (1 ml)

V_t: Volumen de la muestra + volumen del reactivo LB (4,5 mL) (Ramos, 2016).

Las absorbancias se registraron en el software Excel. Con los datos se realizó una gráfica (anexo 2) y se obtuvo una ecuación de correlación lineal, que permitió calcular la concentración de saponinas. La absorbancia medida fue la suma de las saponinas en sí, del reactivo y del pigmento. Para obtener una absorbancia real de las muestras se utilizó la siguiente ecuación:

$$AR = AMR_C - AM - AR_C$$

Donde:

AR: Absorbancia real

AMR_C: Absorbancia de la muestra con el reactivo de color

AM: Absorbancia de la muestra

AR_C: Absorbancia del reactivo Liebermann Burchard (Gianna, 2013).

d. Cuantificación de saponinas

Para cuantificar las saponinas de las muestras de quinua, se pesó cinco gramos de cada extracto seco de quinua y se dispuso en fioles de 50 mL seguidamente se enrazó con agua destilada, se agitó suavemente por 30 minutos, 1 mL de cada solución se transfirió a tubos con tapa de goma, luego se agregó 3,5 mL de reactivo de reactivo Liebermann Burchard, se agitó en vórtex por 30 segundos, y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo, se realizó la lectura de la absorbancia a 420 nm (el procedimiento se realizó por triplicado) (Ramos, 2016).

3.3.6. Colecta de agua y *Daphnia pulex* “pulga de agua”

• Colecta de muestras de agua

En cinco puntos equidistantes de la Laguna, se tomaron muestras de agua en recipientes de capacidad de 650 mL, estas se rotularon debidamente y se llevaron al Laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica (BioSIG).

• Colecta de *Daphnia pulex* “pulga de agua”

La colecta de *Daphnia pulex*, se realizó con la red de zooplankton (luz de malla de 50 µm), y fueron trasladadas en recipientes de 3 L que contenían el agua de laguna (Garcés, 2013).

• Identificación de *Daphnia pulex* “pulga de agua”

La identificación de pulgas de agua, hasta especie, se realizó en el Laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica (BioSIG), con la ayuda del microscopio compuesto (Marca: Olympus; modelo: CX31RTSF). Se aisló organismos ejemplares vivos y se colocaron en un portaobjeto con una gota de Lugol. Se observó las diferentes partes del individuo, como la vesícula óptica, rostro, antena, garra post abdominal, espina caudal. Estas fueron identificadas usando claves pictóricas y clave taxonómica de Pennak (1955).

3.3.7. Medición de los parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos se midieron con el multiparámetro (Marca: Hanna, modelo: H198131), se midieron los siguientes parámetros: dureza total, dureza cálcica, pH, sólidos disueltos totales y conductividad (USEPA, 2002). Los resultados obtenidos se detallan en el anexo 3.

• Preparación de agua reconstituida

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos, permitieron preparar agua reconstituida para el cultivo de las pulgas de agua a nivel de laboratorio. Se emplearon las cantidades de los reactivos indicados en la tabla 7, para preparar la solución madre de agua reconstituida al 100 %. Luego se tomó 0,8 mL de la solución madre y se transfirió a una fiola de 1 000 mL y se completó con agua destilada (Gámez & Ramírez, 2008).

Tabla 7. Composición del agua reconstituida.

Reactivo	Descripción del producto	Gramos/Litro
Cloruro de calcio	Marca Fagalab – P.M:110,99 g/mol	13,5
Sulfato de Magnesio heptahidratado	Marca HiMedia – P.M: 246,47 g/mol	36,5
Cloruro de potasio	Marca Meyer – P.M: 40,00 g/mol	10
Bicarbonato de sodio	Marca Portugal	10

P.M: Peso molecular

Gámez & Ramírez, (2008).

Una vez obtenida el agua de cultivo se realizó las medidas de los parámetros fisicoquímicos (anexo 3).

3.3.8. Aclimatación de *Daphnia pulex* a condiciones de laboratorio

La aclimatación de los organismos de prueba, a condición es del Laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica (BioSIG).

Temperatura: 21-25 °C

Fotoperiodo: 16 horas luz; 8 horas oscuridad (Ramírez & Mendoza, 2008).

• Prueba de sensibilidad

Se seleccionaron cinco pulgas de agua de tamaño pequeño, y se colocaron en un recipiente con 50 mL de agua reconstituida. Después de 24 horas, se observó que las pulgas tuvieron una tasa de supervivencia del 100 %.

• Cultivo y mantenimiento de *Daphnia pulex* “pulga de agua”

Se colocaron 10 *Daphnias* grávidas en un litro de agua reconstituida. Se alimentó diariamente con siete gotas de levadura diluida a una concentración de 0,002

mg/mL. Cada cinco días, se realizó el cambio y limpieza del recipiente (USEPA, 2002).

Después de una semana, al observar un aumento en la población. Se seleccionaron neonatos de dos días de edad. Utilizando una pipeta Pasteur se colocaron a una pecera de 20x60 cm, con 3 L de agua reconstituida y alimento. Las condiciones en la pecera se mantuvieron sin aireación, con temperatura entre 20 a 21 °C y pH de 6,02. Los parámetros fisicoquímicos se especifican en el anexo 3 (USEPA, 2002).

- **Limpieza**

Cada 5 días, se llevó a cabo el proceso de limpieza, el cual implicó desechar la mitad del agua reconstituida de la pecera y reemplazarla con 1 500 mL de agua reconstituida fresca.

- **Recolección de neonatos**

Pasado tres semanas se evidenció aumento en la población de *Daphnia pulex*. Los neonatos (menos de un día de nacidos) fueron usados para las pruebas experimentales. Se escogieron 10 neonatos, y se dispusieron en pequeños vasos descartables.

3.3.9. Elaboración de pruebas piloto

- Las unidades experimentales estuvieron expuestas a concentraciones de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 mg/mL de los extractos hidroalcohólicos de los cuatro cultivares de quinua.
- Se realizó lecturas de mortalidad a las 6, 12 y 24 horas de iniciado el experimento.
- La lectura definitiva se realizó a las 24 horas, donde se obtuvo mortalidades absolutas de los neonatos de *Daphnia pulex* en las concentraciones de 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 mg/mL.
- La lectura en la concentración 0,1 mg/mL dio como resultado, tasas de mortalidad del 70 %, 50 %, 60 % y 50 % en 24 horas, en los extractos de quinua Amarilla Maranganí, Blanca Junín, Roja Pasankalla y Negra Collana, respectivamente. Basados en estos resultados, se establecieron concentraciones experimentales definitivas de 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05 y 0,1 mg/mL (Ramírez & Mendoza, 2008).

3.3.10. Preparación de las concentraciones de los extractos hidroalcohólicos

- Se preparó una solución stock de 0,2 mg/mL (120 mg de extracto seco: 600 mL de agua reconstituida).
- Las concentraciones de 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05 y 0,1 mg/mL. Se prepararon usando la fórmula de dilución ($C_1V_1=C_2V_2$). Las cantidades de solución madre y agua reconstituida se precisan en la tabla 8.

Tabla 8. Características de las soluciones para la preparación de cinco concentraciones de los extractos de quinua.

Concentración (mg/mL)	Solución stock 0,2 mg/mL (mL)	Agua reconstituida
0,00625	18,75	581,25
0,01250	37,5	562,5
0,02500	75	525
0,05000	150	450
0,10000	300	300

3.3.11. Preparación de las unidades experimentales

Las unidades experimentales estuvieron constituidas por recipientes descartables de capacidad de 100 mL, estas contenían 80 mL de agua reconstituida con la concentración del extracto de quinua, como se señala en la tabla 8, los neonatos de *Daphnia pulex*, fueron asignados de manera aleatoria, se dio inicio al experimento cuando los neonatos fueron colocados en los recipientes que contenían los tratamientos, las lecturas de mortalidad se realizaron a 24 y 48 horas.

Tabla 9. Características de las unidades experimentales.

Unidades experimentales	Concentración (mg/mL)	N° de individuos expuestos de <i>Daphnia pulex</i>
1	0,00000	10
2	0,00625	10
3	0,01250	10
4	0,02500	10
5	0,05000	10
6	0,10000	10

3.4. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) y concentración letal noventa y cinco (CL₉₅).

La concentración letal media (CL₅₀) se realizó tomando datos de las mortalidades acumuladas a 24 y 48 horas de exposición. Se realizó el análisis Probit, con un límite de confianza del 95 % (USEPA, 2002).

3.5. Diseño experimental

Se usó un ² diseño completamente al azar (DCA), y se estudió el efecto de las cinco concentraciones de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de cuatro cultivares de *Chenopodium quinoa* Willd (0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05 y 0,1 mg/mL) sobre *Daphnia pulex* (neonatos menores o iguales a 24 horas), a 24 y 48 horas de exposición, se consideró el control negativo para realizar las correcciones de acuerdo a la fórmula de Abbott (Ramírez & Mendoza, 2008).

3.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron registrados en tablas y representados en figura ² de tendencia central y de dispersión. La finalidad fue comparar los porcentajes de mortalidad causadas por cada cultivar y las concentraciones de los extractos hidroalcohólicos en 24 y 48 horas de exposición.

Se aplicaron pruebas estadísticas de normalidad, como Kolmogorov Smirnov y Shapiro Wilk. Los resultados indicaron que el nivel de significancia fue muy bajo ($p < 0,001$), lo que sugería que los datos no se distribuían normalmente. Bajo este supuesto, se optó por utilizar pruebas estadísticas no paramétricas, como Kruskal Wallis con un nivel de confianza del 95 % ($\alpha = 0,05$). Esta se utilizó para comparar las tasas de mortalidad de los diferentes cultivares de quinua y las concentraciones. Para estos ¹⁶ análisis se utilizó el Software SPSS 27 (Levin & Rubin, 2004). La estimación de la concentración letal media (CL_{50}) y concentración letal noventa y cinco (CL_{95}) se realizó utilizando la metodología Probit, usando el Software MINITAB 21 (USEPA, 2022).

IV. RESULTADOS

Tabla 10. Mortalidad acumulada promedio de los neonatos de *Daphnia pulex* causada por cinco concentraciones crecientes del extracto hidroalcohólico de cuatro cultivares de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua". Ayacucho 2023.

Cultivar	Concentración (mg/mL)	Mortalidad ² acumulada		Mortalidad promedio acumulada	
		24 h (n°)	24 h (%)	48 h (n°)	48 h (%)
Amarilla Maranganí	0,00625	0,000	0,000	1,333	13,333
	0,01250	1,333	13,333	1,667	16,667
	0,02500	2,333	23,333	4,667	46,667
	0,05000	3,333	33,333	9,667	96,667
	0,10000	5,667	56,667	10,000	100,000
	Promedio	2,533	25,333	5,467	54,667
Blanca Junín	0,00625	0,000	0,000	1,000	10,000
	0,01250	1,000	10,000	2,000	20,000
	0,02500	1,667	16,667	4,333	43,333
	0,05000	4,000	40,000	7,667	76,667
	0,10000	5,333	53,333	9,000	90,000
	Promedio	2,400	24,000	4,800	48,000
Roja Pasankalla	0,00625	0,000	0,000	1,333	13,333
	0,01250	1,000	10,000	2,000	20,000
	0,02500	2,333	23,333	4,333	43,333
	0,05000	5,000	50,000	8,333	83,333
	0,10000	5,667	56,667	8,333	83,333
	Promedio	2,800	28,000	4,867	48,667
Negra Collana	0,00625	0,000	0,000	1,000	10,000
	0,01250	0,667	6,667	1,333	13,333
	0,02500	1,333	13,333	2,333	23,333
	0,05000	1,667	16,667	4,333	43,333
	0,10000	3,000	30,000	6,667	66,667
	Promedio	1,333	13,333	3,133	31,333

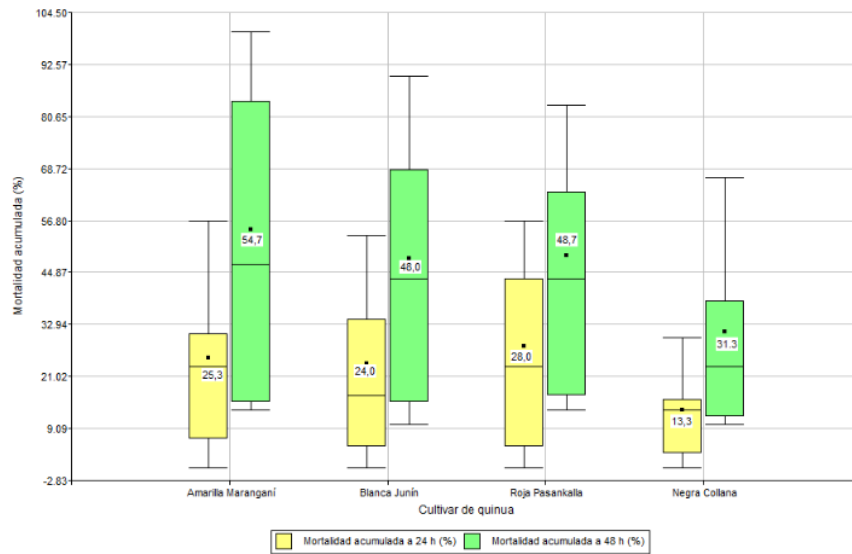
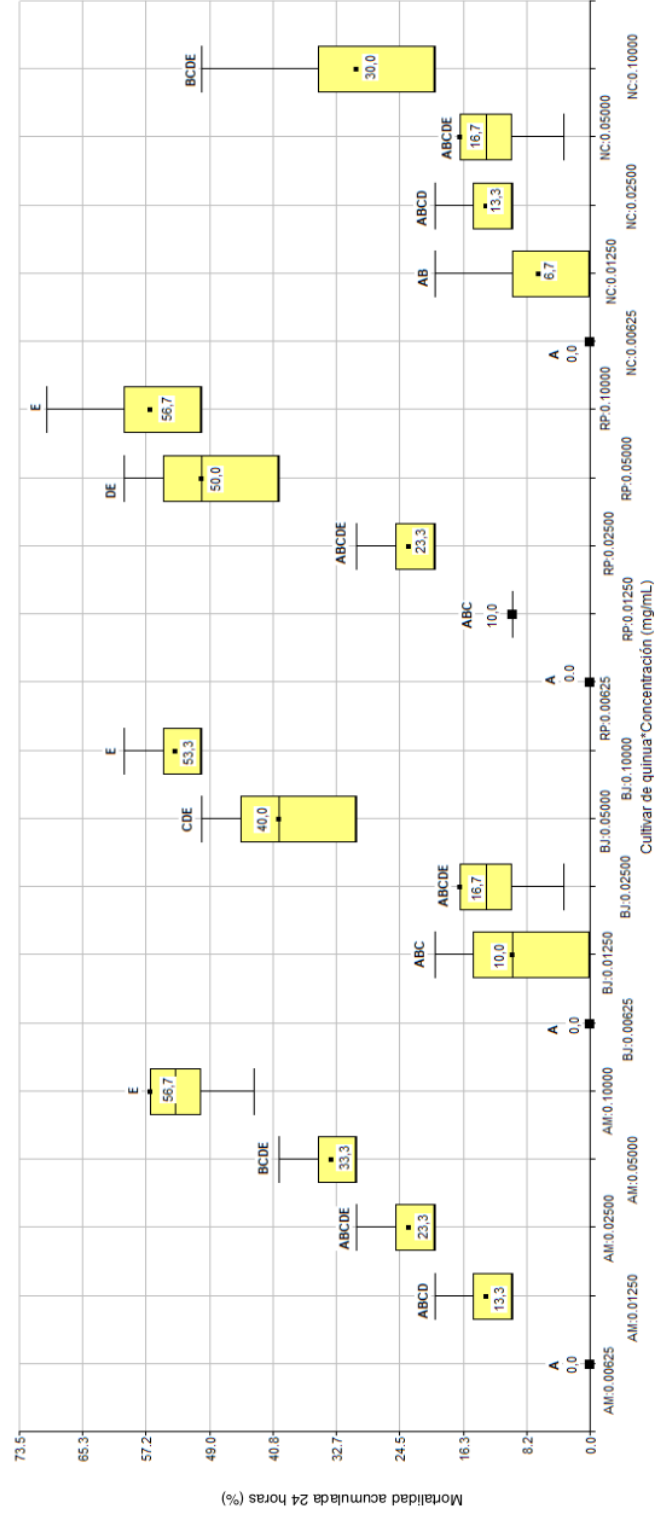
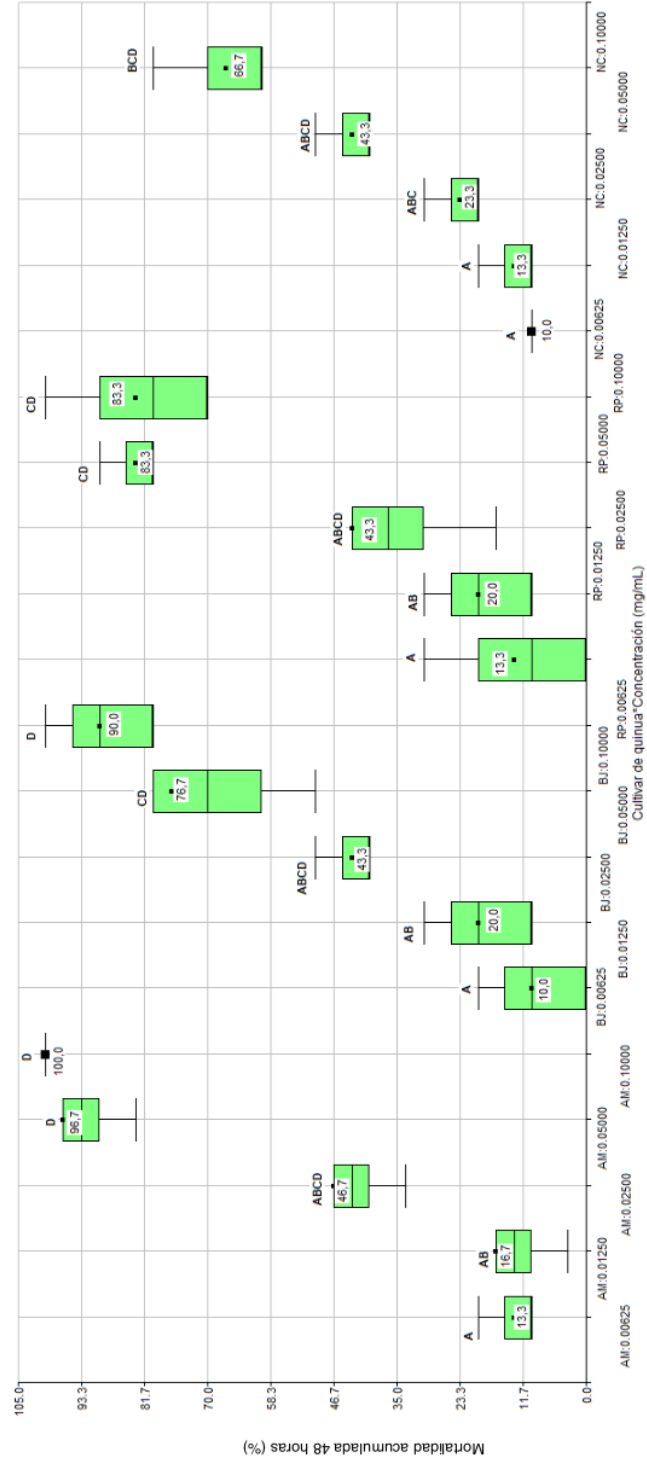


Figura 4. Mortalidad ² acumulada promedio de los neonatos de *Daphnia pulex* "pulga de agua", causada por los extractos hidroalcohólicos de cuatro cultivares de *Chenopodium quinua* Willd "quinua". Ayacucho 2023.



AM: Amarilla Marangani; BJ: Blanca Junin; RP: Roja Pasankalla; NC: Negra Collana

Figura 5. Porcentaje de mortalidad acumulada de neonatos de *Daphnia pulex* "pulga de agua" registrados a 24 horas de exposición en cinco concentraciones de extractos hidroalcohólicos de cuatro cultivares de semillas de quinua. Ayacucho 2023.



AM: Amarilla Marangani; BJ: Blanca Junin; RP: Roja Pasankalla; NC: Negra Collana

Figura 6. Porcentaje de mortalidad acumulada de neonatos de *Daphnia pulex* "pulga de agua" registrados a 48 horas de exposición en cinco concentraciones de extractos hidroalcohólicos de cuatro cultivos de quinua. Ayacucho 2023.

2
 Tabla 11. Valores de CL₅₀ y CL₉₅ con sus intervalos de confianza a 24 y 48 horas de exposición para los extractos hidroalcohólicos de las semillas de cuatro cultivares de quinua. Ayacucho 2023.

Tratamientos	Tiempo de exposición (h)	Intervalo de confianza (95%)			Intervalo de confianza (95%)		
		CL ₅₀	Inferior	Superior	CL ₉₅	Inferior	Superior
Amarilla	24	0,0837	0,0677	0,1131	0,1807	0,1413	0,2687
Marangani	48	0,0252	0,0211	0,0302	0,0493	0,0416	0,0630
	24	0,0851	0,0695	0,1130	0,1774	0,1401	0,2579
Blanca Junín	48	0,0382	0,0298	0,0477	0,0976	0,0809	0,1274
Roja	24	0,0766	0,0624	0,1001	0,1679	0,1333	0,2407
Pasankalla	48	0,0386	0,0289	0,0493	0,1094	0,0895	0,1461
Negra	24	0,1363	0,1005	0,2613	0,2688	0,1866	0,5787
Collana	48	0,0700	0,0564	0,0917	0,1629	0,1289	0,2346

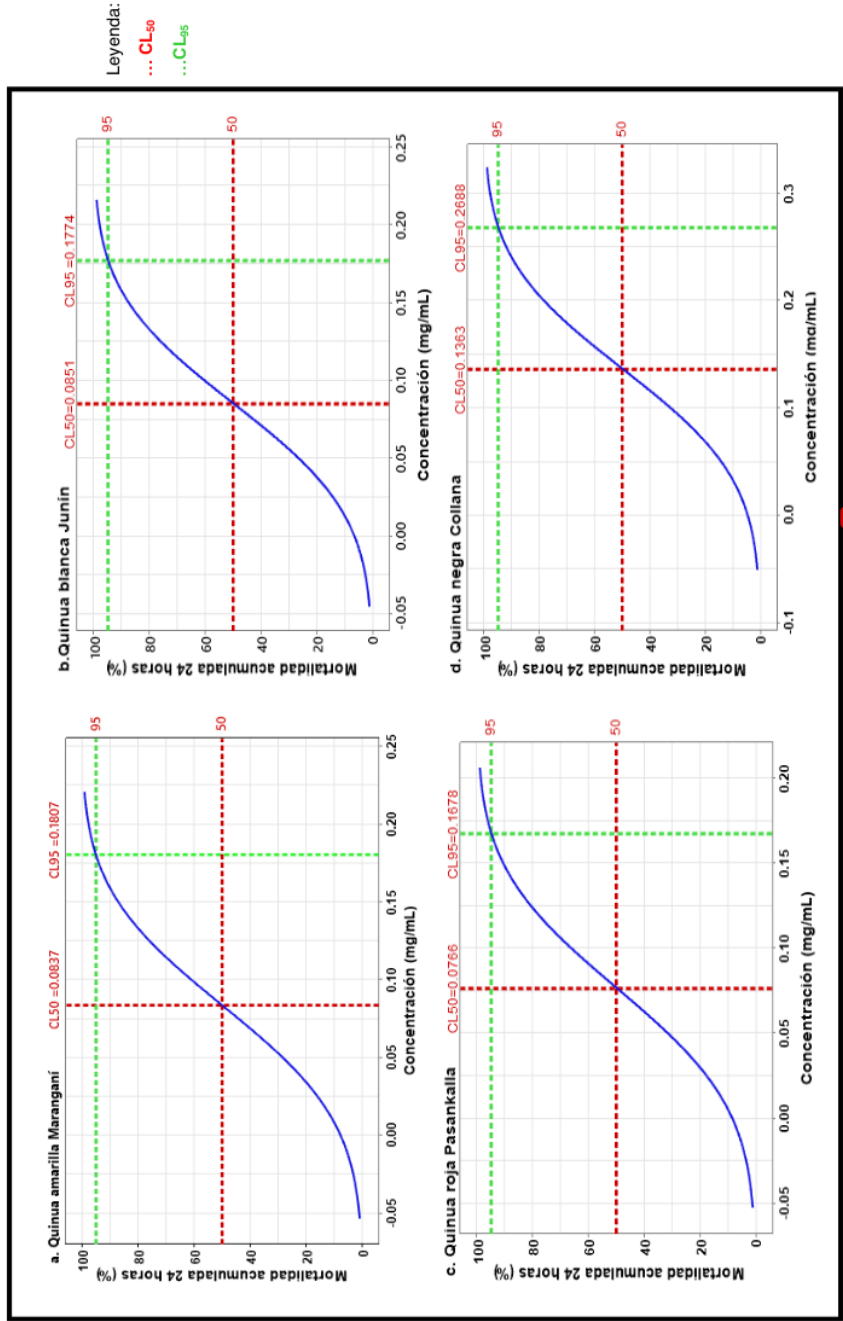


Figura 7. Tendencia de la mortalidad acumulada, calculado por Probit y CL₅₀ y CL₉₅ de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de cuatro cultivos de semillas de quinoa a 24 horas de exposición. Ayacucho 2023.

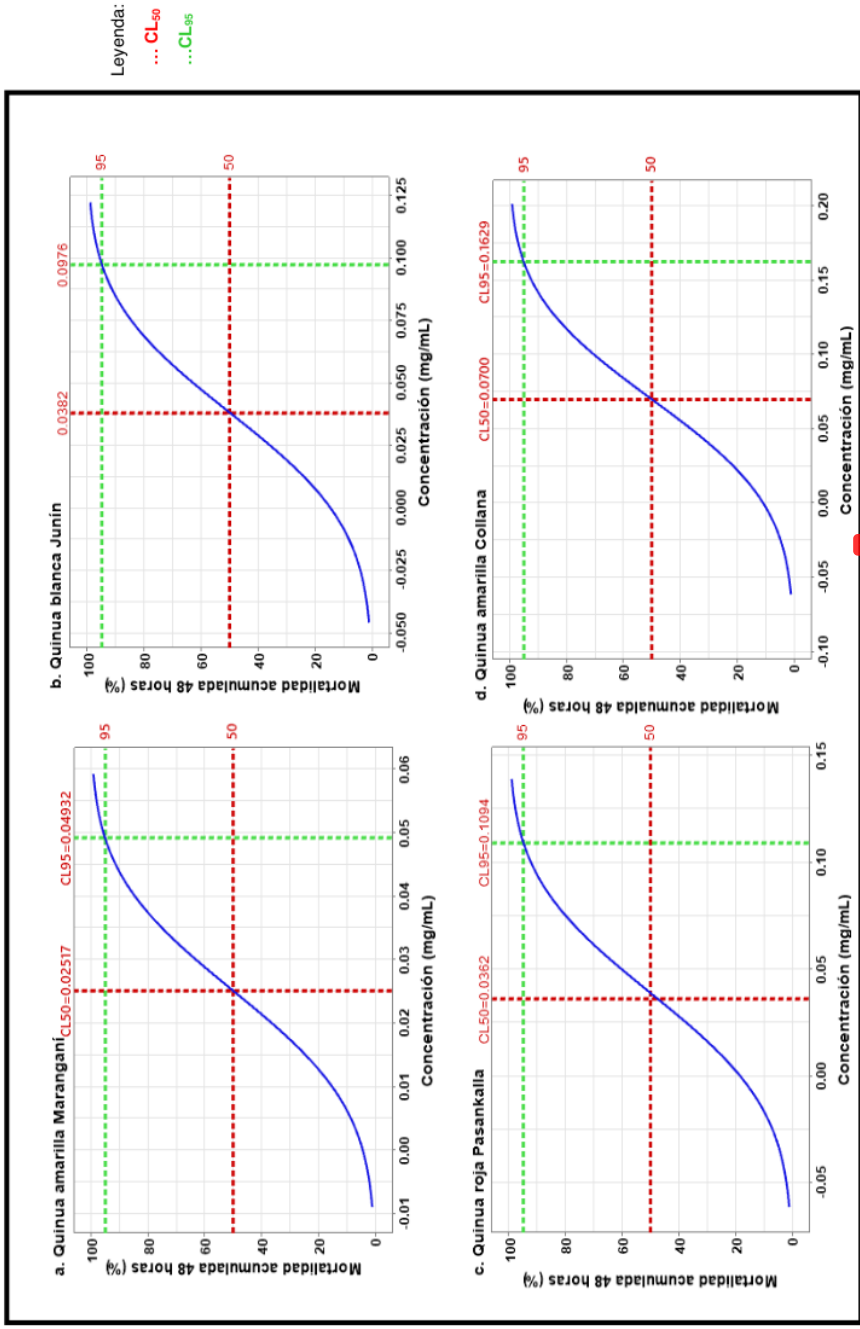


Figura 8. Tendencia de la mortalidad acumulada, calculado por Probit y CL_{50} y CL_{95} de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de cuatro cultivos de semillas de quinua a 48 horas de exposición. Ayacucho 2023.

Tabla 12. Tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de cuatro cultivares de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua". Ayacucho 2023.

Componentes químicos	Resultados				Observaciones
	AM	BJ	RP	NC	
Catequinas	-	-	-	-	No hay coloración prescrita
Quinonas	-	-	-	-	No hay coloración prescrita
Azúcares reductores	++	+	++	+	Precipitado rojo ladrillo
Lactonas y Cumarinas	++	+	+	++	Coloración rojiza
Antocianidinas	+++	+++	+++	+++	Coloración marrón rojiza
Triterpenos esteroides	y ++	+	+	+	Coloración rosada
Fenoles y taninos	+	+	+	+	Coloración verdosa
Saponinas	+++	++	++	+	Altura de más de 2 mm
Aminoácidos / aminos	+++	+	+	+	Coloración violácea
Flavonoides	++	+	++	++	Coloración rojiza en la fase amilica
Cardenólidos	-	-	-	-	No hay coloración prescrita
Alcaloides	+	+	+	++	Turbidez

Leyenda

AM: Amarilla Marangani

BJ: Blanca Junin

RP: Roja Pasankalla

NC: Negra Collana

No presenta (-)

Poco (+)

Regular (++)

Abundante (+++)

Tabla 13. Contenido de saponinas en las semillas de cuatro cultivares de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua". Ayacucho 2023.

Cultivar de quinua	Absorbancia (promedio)	Absorbancia (real)	Concentración de saponinas en (mg/mL)	Concentración de saponinas (mg/g)	Concentración de saponinas (mg/5g)
Amarilla Maranganí	1,5450	0,247	0,376	3,76	18,80
Blanca Junín	1,3500	0,131	0,199	1,99	9,95
Roja Pasankalla	1,3520	0,102	0,154	1,54	7,70
Negra Collana	1,2580	0,0450	0,067	0,64	3,00

V. DISCUSIÓN

La figura 4, muestra los porcentajes de mortalidad acumulada de los neonatos de *Daphnia pulex* “pulga de agua”, registradas a 24 y 48 horas de exposición a los extractos hidroalcohólicos de cuatro cultivares de quinua. Los resultados indican que negra Collana, presenta niveles bajos de mortalidad a 24 y 48 horas de exposición, con 13,3 % y 31,4 % respectivamente. Por otro, la quinua Amarilla Maranganí, Blanca Junín y Roja Pasankalla muestran altas tasas de mortalidad, aunque con diferencias mínimas entre ellas. A 24 horas la roja Pasankalla (28,0 %) muestra un porcentaje de mortalidad ligeramente superior a la amarilla Maranganí (25,3 %) y Blanca Junín (24,0 %). Mientras a 48 horas, destaca amarilla Maranganí con 54,7 % respecto a los demás. Sin embargo, al realizar la prueba de Kruskal Wallis (anexo 6), no se halló significancia estadística ($p>0.05$), lo que sugiere que las mortalidades generadas por cada extracto, son estadísticamente similares. La principal causa de mortalidad, se atribuye a los elementos contenidos en el extracto hidroalcohólico. Bracho et al. (2022), llevaron a cabo un proyecto de investigación, con el objetivo de evaluar la toxicidad de los extractos acuosos, etanólicos y hexánicos de tres especies vegetales (*Petiveria alliacea*, *Genipa americana* y *Solanum mammosum*), a través de ensayos de toxicidad aguda, usando *Daphnia magna*, donde atribuyen la mortalidad de estos organismos a la compleja composición química de los metabolitos secundarios. Además, los resultados indican que los extractos orgánicos son más tóxicos que los acuosos. Torres (2023), identificó que el extracto hidroalcohólico de quinua Amarilla Maranganí, contiene varios compuestos, entre ellas saponinas, alcaloides, catequinas, fenoles, taninos, lactonas y cumarinas. Además, refiere que la saponina es el principal metabolito responsable de la muerte de *Brevicoryne brassicae* “pulgón de col”. Este trabajo de investigación contiene procesos de identificación y cuantificación de saponinas, las cuales se explican más adelante.

² La figura 5, muestra los porcentajes de mortalidad de neonatos de *Daphnia pulex* “pulga de agua” causado por cinco concentraciones crecientes de los extractos hidroalcohólicos de cuatro cultivares de quinua, expuestas a 24 horas. Se puede observar, la relación proporcional de la concentración y la tasa de mortalidad. La concentración menor (0,00625 mg/mL) no evidenció signos de mortalidad en neonatos de *Daphnia pulex*. Por otro lado, las tasas de mortalidad surgen a partir de la concentración 0,0125 mg/mL. En concreto, Negra Collana presentó 6,7 %; Blanca Junín y Roja Pasankalla 10,0 %; y Amarilla Maranganí 13,3 %. En las concentraciones 0,025 mg/mL; 0,05 mg/mL y 0,1 mg/mL, las tasas de mortalidad fueron aumentando gradualmente. Por otra parte; la figura 6 muestra tasas de mortalidad a 48 horas de exposición, en este caso se puede observar que 0,00625 mg/mL ocasionó tasas de mortalidad de 10,0 % en Negra Collana y Blanca Junín y 13,3 % en Amarilla Maranganí y Roja Pasankalla. Asimismo, las concentraciones de 0,0125 mg/mL; 0,025 mg/mL y 0,05 mg/mL, registraron un aumento en las tasas de mortalidad con respecto a 24 horas de exposición. La concentración más alta (0,1 mg/mL) generó mortalidad absoluta en quinua Amarilla Maranganí y los extractos de Blanca Junín, Roja Pasankalla y Negra Collana, presentaron mortalidades de 90,0 %; 83,3 % y 66,7 % respectivamente. Martínez et al. (2010), realizaron estudios de los efectos tóxicos de los extractos acuosos de quinua en *Daphnia magna*, mostró que a 96 horas de exposición el extracto tiene $CL_{50} = 0,05$ mg/mL. Además, señala que a intervalos de exposición reducidos no hay valores significativos. Roberts et al. (2022); menciona que las variaciones de las tasas de mortalidad en diferentes tiempos de exposición se deben a diversas causas. Una de ellas es la acumulación de la sustancia tóxica. A menores tiempos de exposición la cantidad de la sustancia es relativamente baja en los organismos, pero a medida que pasa el tiempo, la sustancia tóxica tiende a acumularse en concentraciones más altas. Otro factor, es la activación de vías metabólicas, durante las primeras horas de exposición, los organismos activan mecanismos de defensa que contrarrestan los efectos tóxicos. Sin embargo, cuando transcurre el tiempo estos sistemas se vuelven ineficaces y de esta manera se va generando daños celulares de manera progresiva.

La figura 7, muestra las tendencias teóricas de las mortalidades acumuladas de los neonatos de *Daphnia pulex* “pulga de agua”, en relación a cinco concentraciones crecientes de extractos hidroalcohólicos de las semillas de quinua y muestran las CL_{50} y CL_{95} , que representan las concentraciones en las

cuales muere el 50 % y 95 % de neonatos expuestos. En 24 horas de exposición, Negra Collana fue menos tóxico ($CL_{50} = 0,1363$ mg/mL; $CL_{95} = 0,0,2688$ mg/mL). Por otro lado, Roja Pasankalla presentó mayor toxicidad con respecto a los demás cultivares ($CL_{50} = 0,0766$ mg/mL y $CL_{95} = 0,1679$ mg/mL), los cultivares de quinua Amarilla Maranganí y Blanca Junin mostraron niveles de toxicidad ($CL_{50} = 0,0837$ mg/mL; $CL_{95} = 0,1413$ mg/mL y $CL_{50} = 0,0851$ mg/mL; $CL_{95} = 0,1679$ mg/mL, respectivamente), que se encuentran muy cercanas a Roja Pasankalla. En cambio, a 48 horas de exposición (figura 8) podemos observar los cambios en los niveles de toxicidad. En este contexto, se puede observar que la quinua Amarilla Maranganí ($CL_{50} = 0,0252$ mg/mL; $CL_{95} = 0,0493$ mg/mL), superó a Roja Pasankalla ($CL_{50} = 0,0386$ mg/mL; $CL_{95} = 0,1094$ mg/mL). Negra Collana continuó mostrando bajos niveles de toxicidad ($CL_{50} = 0,0700$ mg/mL; $CL_{95} = 0,1629$ mg/mL).

En resumen, los hallazgos sugieren que los extractos hidroalcohólicos de las semillas de quinua, tienen diferentes niveles de toxicidad en *Daphnia pulex*, lo que puede ser importante para la regulación ambiental e industrial. No obstante, se necesita más investigaciones para comprender completamente los efectos del extracto en ecosistemas acuáticos y en la salud humana. Jiang et al. (2018) determinó la CL_{50} de quinua amarilla a 48 horas de exposición. La concentración 0,00022 mg/mL, genera mortalidad del 50% en la población de neonatos de *Daphnia magna*. Al comparar los resultados, podemos ver que el extracto de quinua es más tóxico en *Daphnia magna* que en *Daphnia pulex*. Sin embargo, se pueden deber a muchos factores como; la variedad, la proporción de agua y alcohol, las condiciones fisicoquímicas de las unidades experimentales y la cantidad de saponinas extraídas. La tabla 10, muestra el porcentaje de rendimiento de los extractos hidroalcohólicos secos obtenidos en las semillas de quinua, Amarilla Maranganí presentó 7,9 %; Blanca Junín 4,83 %; Roja Pasankalla 3,4 % y Negra Collana 1,77 %. Huayanca (2021) mostró que el porcentaje de rendimiento obtenido en la accesión de quinua amarilla, fue de 18 %. Esto demuestra que hay mayor rendimiento, al triturar las semillas y someterlas al método de extracción asistida por microondas. Las características fisicoquímicas (anexo 13), fluctúan al iniciar y finalizar la prueba. A 24 horas, la dureza total en las soluciones que contienen los extractos hidroalcohólicos de quinua Amarilla Maranganí, Blanca Junín y Roja Pasankalla variaron ligeramente. La solución con el extracto de quinua Negra Collana fluctuó más que las demás. El pH se mantuvo dentro del rango establecido y cercanas al control negativo. En cuanto, a la

conductividad eléctrica varía en todos los tratamientos, estos cambios se deben a que los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico, que se ionizan al mezclarse con el agua (Rayme, 2015). La disminución del oxígeno disuelto se debe a que las sustancias en la quinua usan el oxígeno para formar otros compuestos, generando un descenso considerable.

Ramírez & Mendoza, (2008), menciona que ¹⁸ la concentración final del oxígeno disuelto debe ser mayor a 2 mg/L. Las soluciones con extracto de quinua Amarilla Maranganí, Blanca Junín y Roja Pasankalla, cumplieron las especificaciones. El oxígeno disuelto en el extracto de quinua Negra Collana son menores a lo establecido, por lo que se puede concluir que las mortalidades en neonatos de *Daphnia pulex*, la mortalidad también se ve influenciada por falta de oxígeno. La CL₅₀, es muy usado para el calcular las concentraciones de medicamentos, pesticidas, herbicidas, medicamentos, alimentos y metales pesados, la CL₉₅ no es muy calculada o usada, pero en aquellos compuestos altamente tóxicos y peligrosos es obligatorio su cálculo, ya que implica riesgos ambientales a gran escala. El cálculo de estas, es importante para establecer políticas de regulación ambiental. (USEPA, 2002). Las saponinas y los componentes presentes en los extractos de quinua, al ser productos de origen natural, son biodegradables y su permanencia en cuerpos de agua es a corto plazo (Troisi et al., 2014), por tanto aún no hay estudios que hablen de procesos de bioacumulación y biomagnificación en los ecosistemas. Sin embargo, no se debe subestimar la presencia de las saponinas y demás metabolitos secundarios, en altas concentraciones, la presencia de estas puede interferir significativamente en la vida acuática y ocasionar daños en la integridad de organismos particularmente sensibles.

La tabla 12, muestra los resultados de los tamizajes fitoquímicos. En los cuatro cultivares, se puede observar una alta concentración de antocianidinas (+++) y pocas cantidades de fenoles y taninos (+). La quinua Amarilla Maranganí presentó saponinas y aminoácidos en abundancia (+++). Los azúcares reductores, lactonas, cumarinas y flavonoides en cantidades regulares (++) y poca presencia de alcaloides (+). La quinua Blanca Junín presentó saponinas, azúcares reductores y flavonoides en cantidades regulares (++) y muy pocas (+) las cantidades de azúcares reductores, aminoácidos y alcaloides. Roja Pasankalla presentó cantidades regulares (++) de saponinas, azúcares reductores y flavonoides, pero la presencia de lactonas, cumarinas, aminoácidos y alcaloides

son pocas (+), y finalmente Negra Collana presentó cumarinas, flavonoides y alcaloides en cantidades regulares (++) y pocas cantidades de azúcares reductores, saponinas y aminoácidos. Quispe (2017) evaluó la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" sobre larvas del III estadio de *Culex quinquefasciatus*, y atribuyó la mortandad de estos organismos a la presencia de lactonas y alcaloides en el extracto hidroalcohólico. Al realizar el tamizaje fitoquímico evidenció la presencia de estos compuestos biotóxicos en abundancia (+++). Al comparar *Culex quinquefasciatus* y *Daphnia pulex*, se puede sostener que las pulgas de agua al ser organismos altamente sensibles, son mucho más vulnerables, a cualquier agente tóxico, en menores concentraciones (Jiménez, 2015). Wink & Schimmer (2010), asegura que los alcaloides y las lactonas, generan una interrupción de la señal neural, debido a que afectan a los canales iónicos, a los receptores neuronales, a enzimas encargadas de degradar neurotransmisores y a los mensajeros secundarios, también tiene la capacidad de intercalar el ADN (frena la síntesis de proteínas), esto conlleva a la muerte en las pulgas de agua. Los flavonoides y las antocianidinas, son polifenoles que generan la oxidación de los ácidos grasos insaturados de la membrana, ocasionando la formación y proliferación de radicales lipídicos que provocan la destrucción de las membranas celulares (Batista et al., 2009). Por lo tanto, se puede concluir que los metabolitos secundarios antes descritos, son compuestos biotóxicos que generan mortalidad en *Daphnia pulex*. Sin embargo, los aminoácidos, tienen efectos antagónicos que contrarrestan en cierta medida la muerte en las pulgas de agua. Huamán (2017), determinó que existe mayor ²crecimiento poblacional de *Daphnia magna* "pulga de agua", cuando se alimenta con jugo de *Spinacia oleracea* "espinaca". Para Lisiewska et al. (2011) el jugo de espinaca presenta aminoácidos como: la leucina, prolina, valina y metionina. Asimismo, las variedades de quinua contienen diferente proporción de fenilalanina, tirosina, histidina, metionina, lisina, isoleucina, treonina, tirosina y valina (Campos et al., 2022). Los aminoácidos mejoran la funcionalidad gástrica, intervienen en la reparación celular y ayudan el metabolismo ²de los ácidos grasos. la leucina, valina, y la isoleucina están inmiscuidas ²en la producción de energía y reducen ²los trastornos neuromusculares. En cambio la metionina es un detoxificante y ejerce protección contra radicales libres (Bojanic, 2011).

La tabla 13, muestra la cantidad de saponinas obtenidas en los cuatro cultivares de quinua, a través del método de espectrofotometría UV-VIS. Es así que la quinua Amarilla Maranganí tiene 3,79 mg/g, Blanca Junín 1,99 mg/g, Roja Pasankalla 1,54 mg/g y Negra Collana 0,64 mg/g. Triguero (2021) ³ cuantificó las saponinas de cuatro variedades de *Chenopodium quinoa* Willd, por el método de cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (GC/MS), la cantidad de saponinas, reportadas por cada variedad fueron: 13,8 mg/g en quinua Real Amarilla, 11,2 mg/g en quinua Real Blanca, 8,39 mg/g en quinua Real Roja Pasankalla y 8,39 mg/g en quinua Real Negra. Se puede apreciar la diferencia en los resultados obtenidos. Esto se atribuye a la especificidad y sensibilidad del método empleado. Apaza et al. (2013) menciona que el contenido de saponina varía según la variedad, las variedades con mayor saponina son las amarillas, seguidas de las blancas, rojas y negras. Las saponinas vegetales son glucósidos anfifílicos, constituida por una aglicona triterpénica (grupo hidrofóbico) y por una cadena de azúcares (grupo hidrofílico), unidos por enlace glicosídico, estas estructuras proporcionan a las saponinas propiedades tensioactivas, detergentes y emulsionantes. Por estas propiedades las saponinas de quinua son muy utilizadas en diferentes industrias, principalmente en la agricultura son usadas como biopesticidas. Estas ayudan a controlar eficientemente las plagas que afectan sembríos (El Hazzam et al., 2020). Estudios preliminares mencionan que ⁹ las saponinas se anclan al colesterol de la membrana celular, causando la solubilización y permeabilización de sus componentes de manera reversible (Stewart et al., 2016) y al ingresar provocan tensión y debilitamiento en la bicapa lipídica, lo que conlleva a la formación de poros (Islam et al., 2018). Los poros son un medio donde se produce el escape de las moléculas presentes en el citosol de las células (Zheng & Gallot, 2020). En consecuencia, las saponinas actúan como irritantes gastrointestinales y hemolíticos. Esto provoca una descompensación iónica, que genera parálisis en las células musculares, alteraciones gastrointestinales que inhiben la absorción correcta de los alimentos (Martínez et al., 2010).

VI. CONCLUSIONES

1. Las mayores tasas de mortalidad de neonatos de *Daphnia pulex* fueron registradas en el extracto hidroalcohólico de las semillas de Amarilla Marangani a la concentración de 0,1 mg/mL, asumiendo mortalidades de 56,7 % en 24 horas y 100 % a 48 horas de exposición.
2. La tasa de mortalidad a 48 horas es menor en el extracto hidroalcohólico de las semillas de quinua Negra Collana con valores de CL₅₀ y CL₉₅ de 0,07 mg/mL y 0,16 mg/mL. Y la mayor se registra en Amarilla Marangani con valores de CL₅₀ y CL₉₅ de 0,03 mg/mL y 0,05 mg/mL.
3. Se determinó que el extracto hidroalcohólico de las semillas de quinua Amarilla Marangani presentó abundante saponina (+++), la quinua la Blanca Junín y Roja Pasankalla cantidades regulares (++), y negra Collana con poca cantidad de saponina. (+). Asimismo, los extractos de los cuatro cultivares presentaron lactonas, azúcares reductores, antocianidinas, fenoles, flavonoides y alcaloides.
4. En la cuantificación de las saponinas, la quinua Amarilla Marangani presenta mayor cantidad con 0,376 mg/mL. Seguida de Blanca Junín y Roja Pasankalla con 0,199 mg/mL y 0,154 mg/mL respectivamente. La quinua negra Collana presentó la menor cantidad de saponinas con 0,069 mg/mL.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se sugiere purificar los extractos hidroalcohólicos para obtener el metabolito específico y luego someterlas a pruebas de toxicidad. Esto para evitar cualquier efecto que pueda potenciar o disminuir la mortalidad en los organismos de prueba.
2. Se recomienda ¹⁸ llevar a cabo estudios de toxicidad crónica utilizando saponinas de quinua en varios organismos de prueba, como peces, con el fin de evaluar los efectos subletales de las saponinas.

Actividad toxicológica del extracto hidroalcohólico de cuatro cultivares de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” sobre *Daphnia pulex*. Ayacucho 2023

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	4%
2	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	4%
3	repositorio.umsa.bo Fuente de Internet	1%
4	www.scribd.com Fuente de Internet	1%
5	pt.scribd.com Fuente de Internet	1%
6	idoc.pub Fuente de Internet	1%
7	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	1%
8	prezi.com Fuente de Internet	1%

9	hdl.handle.net Fuente de Internet	1 %
10	repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
11	bolivianchemistryjournal.org Fuente de Internet	<1 %
12	cosechador.siu.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
13	estrucplan.com.ar Fuente de Internet	<1 %
14	repository.unad.edu.co Fuente de Internet	<1 %
15	repositorio.upagu.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
16	revistas.unsch.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
17	Janaina Sánchez García. "Desarrollo y caracterización de nuevas harinas de lenteja y quinoa fermentadas con <i>Pleurotus ostreatus</i> ", Universitat Politècnica de Valencia, 2023 Publicación	<1 %
18	docplayer.es Fuente de Internet	<1 %
19	Submitted to Universidad Nacional del Centro del Peru	<1 %

20

revistas.lasalle.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

21

repositorio.inia.gob.pe

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo