



INFORME FINAL TÉCNICO PASANTÍA TECNOLÓGICA

**PASANTIA NATURAL RESPONSE – EPGL–SUIZA-
Código: 08PTEC-2326**

Santiago, Mayo, 2009

Pasante: Andrea Belancic

Empresa: Natural Response S.A.

Entidad Host: Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie de Ecole
de Pharmacie-Geneve-Lausanne, Université de Genève, Suiza

Entidad Supervisora Nacional: Universidad Adolfo Ibáñez

1.- Contenido Informe Final Técnico

Santiago, Mayo, 2009

- 1.1.Fecha salida / llegada
- 1.2.Identificación de empresa y pasante que ejecutaron la pasantía
- 1.3.Grado de cumplimiento del programa de la Pasantía (si es distinto al 100% programado, explicar motivos)
- 1.4.Logros destacables de la Pasantía Tecnológica y **Registro de Acciones de Innovación** a ejecutar o ejecutadas durante la pasantía (actuales y/o futuras).
- 1.5.Fechas de realización y contenidos de el (los) taller (es)
- 1.6.Resultados y conclusiones (en términos generales y específicos)

1.1 Fecha salida / llegada

Fecha Salida	16 de Febrero 2009
Fecha de llegada	30 de Abril 2009

1.2 Identificación de empresa y pasante que ejecutaron la pasantía

Empresa Pasantía	Natural Response S.A.
RUT	96.768.300-0

Nombre Pasante	
RUT	
Domicilio	
Teléfono	
e-mail	
Profesión	Bioquímica
Empresa beneficiaria	
Cargo en la empresa	Jefe de Laboratorio Desarrollo
Experiencia laboral en el área de la pasantía	14 años (I&D y manejo de equipos de cromatografía y conocimiento de espectrometría de masa).
Antigüedad en la empresa	1 año
Centro, entidad y/o empresa tecnológica de destino	Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie, Ecole de Pharmacie, Ginebra, Suiza

1.3 Grado de cumplimiento del programa de la Pasantía (si es distinto al 100% programado, explicar motivos)

El Programa de la pasantía consistió en una capacitación intensiva en el uso de técnicas de separación, HPLC semi-preparativo y cromatografía preparativa centrífuga y de identificación por espectrometría de masa (MS y MS/MS) de las saponinas de distintas fuentes (Quillay, Yucca, Quinoa) con las siguientes actividades realizadas:

Actividades:

1. Identificación de saponinas en extractos purificados de Quillay, Yucca y Quinoa de distintas formulaciones por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS). (100% cumplida)
2. Identificación de saponinas en fracciones producidas por HPLC semipreparativo y cromatografía centrífuga (100%)
3. Identificación de perfil de saponinas de Quillay proveniente de diferentes localidades. Estudio de hidrólisis de saponinas y subproductos marcadores de degradación.(100% Cumplida)

ACTIVIDADES	Avance%	Observaciones
1. Viaje hacia entidad Host / Ginebra-Suiza (16 de Febrero 2009)	100	
2. Entrenamiento en técnicas de identificación de saponinas por HPLC-MS		
2.1. Entrenamiento en el uso de HPLC MS, optimización de la separación.	100	
2.2. Análisis de muestras de Quillay, Yucca y Quinoa preparadas en el punto 1.1 y 1.2.	100	
2.3. Análisis de las muestras de Quillay preparadas en los puntos 1.3. y 1.4.	100	
HITO 2: Entrenamiento realizado, muestras analizadas.	100	
3. Entrenamiento en purificación de saponinas y obtención de estándares.		
3.1. Entrenamiento en uso de técnicas semipreparativas	100	
3.2. Uso de técnicas semipreparativas para la separación de saponinas de Quillay.	100	
HITO 3.1: Entrenamiento realizado, extractos de Quillay purificados preparados.	100	
3.2. Uso de técnicas semipreparativas para producir estándares de saponinas de distintas fuentes.	100	
HITO 3.2: Estándares de saponinas de distintas fuentes (Quillay, Quinoa y Yucca) obtenidos.	100	
3.3. Viaje de regreso a Santiago de Chile (29 de Abril 2009)	100	

Durante estas actividades el trabajo se enfocó en los aspectos teóricos y prácticos de la espectrometría de masa (LC-MS) a nivel del equipamiento utilizado y uso de estos para la aplicación en nuestros productos. Las condiciones cromatográficas óptimas para lograr una buena separación fueron encontradas, y la identificación de las principales saponinas de los extractos determinados. Además se estudió el efecto de la localidad sobre el perfil de saponinas obtenido, y los sub-productos debido a hidrólisis ácida y básica.

1.4 Logros destacables de la Pasantía Tecnológica

Logros destacables de la pasantía tecnológica

Conocer la realidad Suiza, que ha tenido éxito en elegir la innovación como vía hacia la competitividad. Basado en saber hacer de un pueblo que ha convertido el conocimiento adquirido a lo largo de los años en Servicios financieros e industria farmacéutica, en productos innovadores y servicios de vanguardia vinculados a estos sectores.

Suiza, es un país ubicado en un lugar estratégico de Europa, cuya **calidad de vida** se encuentra por encima de la media europea. Su **economía** se ha caracterizado durante los últimos años por su gran estabilidad con un crecimiento continuo del producto interno bruto, además de un gran esfuerzo de inversión en I+D.

Resultados logrados:

- Se logro las condiciones óptimas de separación de saponinas en un sistema LC-MS para lograr una buena identificación de las saponinas en las diferentes muestras a analizar.
- Se determinó los espectros de masa característicos de las principales saponinas en las fracciones y productos a que se analizaron. Se identificaron las principales saponinas de los extractos y determinar marcadores de masa específicos de las principales.
- Se determinó que existe influencia de la localidad de donde proviene la materia prima sobre el perfil de saponinas.
- Se determinaron marcadores de hidrólisis o degradación de los productos.

1.5 Fechas de realización y contenidos de él (los) taller (es)

Actividad	Contenido	Tipo de actividad	Fechas
1	Optimización separación analítica HPLC, diferentes columnas.	Técnicas de separación	17 feb- 16 mar
2	Cromatografía líquida columnas abiertas	Técnicas de separación	17 feb-16 mar
3	Flash Chromatography fase normal y reversa.	Técnicas de separación	16 mar- 9 abr
4	HPLC semipreparativo: columnas fase reversa.	Técnicas de separación	23 mar - 9 abr
5	SPE(solid phase extraction)	Técnicas de separación	23 mar - 9 abr
6	TLC	Técnicas de separación	17 feb-16 mar
7	HPLC MS/MS ion trap (Finnigan).	Técnicas de identificación	30 mar- 29 abr
8	HPLC TOF (Waters).	Técnicas de identificación	13 abr-29 abr

1.6 Resuma brevemente las conclusiones y resultados de la pasantía

Podemos resumir los resultados con dos grandes hitos:

- 1.- Capacitación en técnicas de identificación de las saponinas por LC-MS.
- 2.- Capacitación en técnicas de separación y purificación de saponinas.

1.6.1.- Se logró identificar las principales saponinas en extractos purificados de Quillay, Yucca y Quinoa de distintas formulaciones por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS/MS) y LC-TOF.

En primer término el trabajo se centró en la optimización de las condiciones cromatográficas para lograr una buena separación analítica por HPLC y luego proceder a inyectar las muestras en el LC-MS. Se pudo inyectar más de 100 muestras entre muestras de Quillay provenientes de distintas localidades, muestras de otros productos (Quinoa, Yucca), muestras de productos comerciales de quillay y productos purificados durante la estadía (fracciones y productos puros).

Existen diferencias importantes en cuanto a los perfiles de hojas y cortezas/ramas, lo cual puede indicar diferencias a nivel de la biosíntesis o degradación de las saponinas en estos órganos. Dada la gran cantidad y complejidad de la información recolectada aún seguimos trabajando en su análisis.

1.6.2. Se logró la capacitación en diferentes técnicas de separación cromatográficas y se las utilizó para obtener fracciones de saponinas de diferentes orígenes (Quillay, Quinoa) y saponinas puras de quillay para ser utilizadas como estándares.

Se utilizaron y probaron diferentes técnicas cromatográficas de separación utilizando como base para las pruebas un extracto comercial de quillay (Super Sap/NR). Las técnicas que resultaron más promisorias fueron la Flash Chromatography con columnas de fase reversa (RP-18) y el HPLC

semipreparativo también con columnas de fase reversa. La naturaleza de los solventes utilizada en cada caso es diferente (metanol y acetonitrilo), y los gradientes y condiciones cromatográficas fueron optimizados para cada caso. No se logró buenos resultados con otras técnicas probadas (columnas DIAION, fase normal, etc).

Se realizaron separaciones a nivel de gramos de producto, lo cual podría ser fácilmente escalable a una decena o centena de gramos. Para una separación más específica de componentes puros, la técnica más útil resultó ser el HPLC prep. En este caso estamos hablando de generar cantidades pequeñas de producto, del orden de decena o centena de miligramos, pero de gran pureza. Esto permitió obtener saponinas puras que serán utilizadas como estándares a futuro en nuestra empresa.

A mediano plazo se espera:

- Implementar nuevo control de calidad por LC-MS para los productos destinados a la empresa farmacéutica.
- Adquirir nuevas técnicas de separación en la empresa.
- Obtener nuevos productos enriquecidos en fracciones específicas de saponinas.