

**EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE SAPONINAS DE LOS  
RESIDUOS DEL BENEFICIO DEL FIQUE**

**JOHNNY LEONARDO PÉREZ OCHOA  
LILI ANDREA QUITIÁN MÉNDEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS  
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA  
BUCARAMANGA, 2009**

**EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE SAPONINAS DE LOS  
RESIDUOS DEL BENEFICIO DEL FIQUE**

**JOHNNY LEONARDO PÉREZ OCHOA  
LILI ANDREA QUITIÁN MÉNDEZ**

**Trabajo de grado para optar al título de  
Ingeniero Químico**

**DIRECTOR: HUMBERTO ESCALANTE HERNANDEZ Ph.D**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS  
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA  
BUCARAMANGA 2009**

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	6
ETAPA DE MUESTREO .....	7
ETAPA DE CARACTERIZACIÓN DEL BAGAZO DEL FIQUE.....	7
ETAPA DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS PRESENTES EN EL BAGAZO DE FIQUE .....	7
Extracción.....	8
Filtrado .....	9
Evaporación de solventes.....	10
Dilución.....	10
Desengrase .....	10
Hidrólisis.....	10
Secado .....	11
Cuantificación .....	11
COMPROBACIÓN DE PRESENCIA DE SAPONINAS .....	12
ETAPA DE CARACTERIZACIÓN DE LOS CRUDOS DE SAPOGENINAS .	12
RESULTADOS Y ANALISIS .....	13
Caracterización de los residuos del fique .....	13

Extracción y Cuantificación .....	14
Influencia de las variables en el porcentaje de rendimiento.....	15
Influencia del tiempo de extracción.....	17
Influencia de la relación Solvente–Sólido.....	18
Influencia de la concentración de solventes.....	19
COMPROBACIÓN DE PRESENCIA DE SAPONINAS.....	21
Ensayo de espuma.....	21
Ensayo de hemólisis.....	22
CARACTERIZACIÓN DE LOS CRUDOS OBTENIDOS .....	24
CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27
ANEXOS .....	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular generalizada de saponinas .....	3
Figura 2. Estructura molecular Hecogenina .....	4
Figura 3. Comparación de métodos Soxhlet Vs Ultrasonido para la extracción de saponinas del bagazo de fique. ....	6
Figura 4.a. Unidad de baño de ultrasonido utilizada para extracción de saponinas .....	8
Figura 4.b. Equipo soxhlet utilizado para extracción de saponinas .....	8
Figura 5.a, 5.b Gráfico de Pareto para Extracciones Soxhlet.....	15
Figura 5.c, 5.d Gráfico de Pareto para EAU.....	16
Figura 6. Influencia del tiempo en el porcentaje de rendimiento de extracción de saponinas. ....	17
Figura 7. Influencia de la relación Solvente–Sólido en el porcentaje de rendimiento de extracción de saponinas .....	18
Figura 8. Influencia de concentración de butanol en el sistema de solventes en el porcentaje de rendimiento de extracción de saponinas. ....	19
Figura 9. Influencia de la concentración de Metanol en el sistema de solventes en el porcentaje de rendimiento de extracción de saponinas.....	20
Figura 10. Fragilidad osmótica.....	23
Figura 11. Espectro infrarrojo de crudo obtenido .....	25
Figura 12. Espectro infrarrojo de Hecogenina. ....	25

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental para extracción de saponinas por método Soxhlet...	9
Tabla 2. Diseño experimental para extracción de saponinas por método EAU .....	9
Tabla 3. Resultados caracterización pulpa de fique. ....	13
Tabla 4. Rendimiento de extracción de sapogeninas - métodos Soxhlet y Ultrasonido .....	14
Tabla 5. Propiedades de solventes utilizados .....	19
Tabla 6. Modelos matemáticos para la extracción de saponinas, obtenidos con el programa STATGRAPHICS Plus 5.1. ....	21
Tabla 7. Ensayo de espuma. ....	22
Tabla 8. Ensayo de hemólisis. ....	23

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO I PROTOCOLO TOMA DE MUESTRA DE BAGAZO .....	31
ANEXO II DIAGRAMA DE PROCESO.....	32
ANEXO III MATRIZ DE EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	33
ANEXO IV PROTOCOLOS DE METODOLOGÍA.....	35
ANEXO V PROTOCOLO COMPROBACIÓN DE PRESENCIA DE SAPONINAS .	40
ANEXO VI FOTOGRAFÍAS DEL PROCESO.....	42
ANEXO VII GRAFICAS DE CURVAS DE FRAGILIDAD OSMÓTICA .....	44

## RESUMEN

### TITULO

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE SAPONINAS DE LOS RESIDUOS DEL BENEFICIO DEL FIQUE \*.

### AUTORES

PÉREZ OCHOA, Johnny Leonardo \*\*

QUITIÁN MÉNDEZ, Lili Andrea \*\*

### PALABRAS CLAVES

*Palabras clave: extracción asistida por ultrasonido (EAU), saponinas esteroideas, sapogeninas, extracción, fique.*

### DESCRIPCIÓN

Del proceso de beneficio del fique se aprovecha sólo el 4% de la planta, que corresponde a la fibra, el otro 96% está compuesto por jugo y bagazo que tradicionalmente son desechados generando altos volúmenes de bio-sólidos, alrededor de quinientas mil toneladas por año a nivel nacional, los cuáles son desaprovechados, generando además problemas de contaminación. Debido a que estos residuos contienen componentes de importancia industrial como lo son las saponinas, se emplearon los métodos de extracción asistida por ultrasonido (EAU) y Soxhlet para analizar la eficiencia de extracción de cada método. Para la comparación de las dos técnicas, los parámetros utilizados son (solventes, proporción de los solventes, relación solvente-bagazo, tiempo). Y se desarrollo un diseño factorial  $2^3$  para el total de los experimentos. La extracción asistida por ultrasonido fue llevada a cabo a una frecuencia de 37 MHz y una temperatura de 45<sup>0</sup>C a presión atmosférica por tiempos de 1 y 2 horas y la extracción soxhlet fue llevada a la temperatura de punto de ebullición por tiempos de 4 y 8 horas. La producción total de crudos de saponinas fue determinada gravimétricamente, cromatográficamente (TLC) y por espectrometría (IR) y comparadas con valores de acreditación. Los resultados indicaron que la extracción asistida por ultrasonido (EAU) comparada con el método soxhlet en su capacidad de extracción, y adicionando la reducción de tiempos de extracción de 8 horas a 1 hora, nos indica que puede ser una técnica alternativa para la extracción de saponinas del bagazo de fique, aunque con algunas limitantes para su escalado a nivel industrial.

\*Proyecto de Grado

\*\*Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director Humberto Escalante Hernández.

## ABSTRACT

### TITLE

EVALUATION OF SAPONINS EXTRACTION METHODS OF THE WASTE OF BENEFIT OF SISAL \*.

### AUTHORS

PÉREZ OCHOA, Johnny Leonardo \*\*

QUITIÁN MÉNDEZ, Lili Andrea \*\*

### KEYWORDS

*Ultrasound assistant extraction (UAE), steroidal saponin, sapogenin, extraction, sisal.*

### DESCRIPTION

The process of benefit of sisal only 4% of the plant take advantage of, that corresponds to the fiber, other 96% is made up of juice and bagasse which traditionally they are rejected generating high volumes of bio-solids, around five hundred thousand tons per year at national level, which they are failed to take advantage of, generating in addition contamination problems. Because these remainders contain components of industrial importance as they are it the saponins, the methods of ultrasound assistant extraction (EAU) and Soxhlet were used to analyze the efficiency of extraction of each method. For the comparison of the two techniques, the used parameters are (solvents, proportion of the solvents, relation solvent-bagasse, and time). And development a factorial design  $2^3$  for the total of the experiments. The extraction attended by ultrasound was carried out to a frequency of 37 MHz and to temperature of 45<sup>0</sup>C to atmospheric pressure per times of 1 and 2 hours and the extraction soxhlet was taken to the temperature of boiling point per times of 4 and 8 hours. The total production of saponins crude was determined gravimetrically, chromatographically (TLC) and by spectrometry (IR) and compared with values of accreditation. The results indicated that the ultrasound assistant extraction (EAU) compared with the method soxhlet in its extraction capacity, and adding the reduction of extraction times of 8 hours to 1 hour, indicate to us that can be an alternative technique for the saponins extraction of the bagasse of sisal, although with some limiting for scaled his at industrial level.

\*Proyecto de Grado

\*\*Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director Humberto Escalante Hernández.

## INTRODUCCIÓN

El fique es una planta perteneciente al orden de las *Liliiflorae*, familia *Agavácea* y género *Furcraea*. El fique tiene sus orígenes en la América tropical en la región Andina de Colombia y Venezuela. Existe una gran variedad de especies de fique, las más conocidas son Tunosa Común (*Furcraea Gigante*), Ceniza (*Furcraea Cabuya*), Rabo de Chucha (*Furcraea andina*), Bordo de Oro (*Furcraea Castilla*), uña de águila (*Furcraea macrophylla*), objeto de este estudio, entre otras[1]

El cultivo del fique solo es posible en regiones donde prevalecen las condiciones de trópico durante la mayor parte del año; preferiblemente bajo temperaturas entre 17 a 24 °C, lluvias entre 1000 y 4000 mm/año y una altitud entre 1000 y 3000 msnm, dependiendo la variedad de la planta. La planta de fique crece casi en todos los climas del país, desde las llanuras costeras hasta los 3.000 m de altura, de ahí se ha difundido hasta la costa oriental de Brasil y a todas las Antillas[1].

En Colombia, se cultiva el fique y se produce la cabuya desde tiempos inmemoriales, para la fabricación de hamacas, redes, cuerdas, alpargatas, jíqueras, costales y enjalmas. El proceso de beneficio del fique se aprovechó sólo el 4% de la planta, que corresponde a la fibra, el otro 96% está compuesto por jugo y bagazo.

Tradicionalmente los residuos son desechados generando altos volúmenes de biosólidos, alrededor de quinientas mil toneladas por año a nivel nacional, los cuáles son desaprovechados, generando además problemas de contaminación ya que usualmente estos desechos son vertidos a los efluentes sin ningún tipo de tratamiento y en otras ocasiones son dejados en el lugar donde se lleva a cabo el beneficio lo que puede contaminar cuerpos de agua superficial por escorrentía o aguas subterráneas por filtración[1].

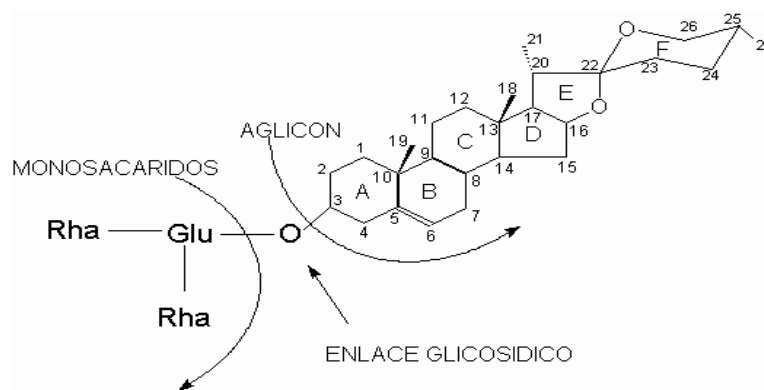
La parte desaprovechada de la planta posee grandes características que al ser explotadas le pueden brindar un gran valor industrial al cultivo del fique, por eso algunas universidades del país han planteado diferentes soluciones para este problema.

En Universidad Nacional sede Bogotá decidieron aprovechar las saponinas y carbohidratos de la pulpa y jugo del fique, y utilizarlos también como fungicidas.[2, 3]. En la sede de Palmira se usó el bagazo como alimentos para animales[4], en la sede Medellín y en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín los aprovecharon como insecticidas [5, 6], y para obtener cortisona [7] y en la Universidad industrial de Santander para producción de biogás[8]. Es de resaltar que aunque se han desarrollado estos estudios ninguno de ellos ha sido industrializado. A nivel internacional no se reportan estudios enfocados en solucionar el problema del fique ya que es un cultivo de tradición colombiana.

La hoja de fique está compuesta por carotenoides, azúcares, clorofila, ceniza, celulosa, minerales, resinas y saponinas entre otros[9]. La obtención de saponinas mediante un proceso de extracción sólido líquido es uno de los posibles aprovechamientos industriales que se le podrían dar a los desechos del fique.

Las saponinas son compuestos naturales, glucósidos de esteroides o triterpenoides caracterizados desde el punto de vista estructural por presentar enlaces glicosídicos y/o éster entre una genina poco polar y restos glucosídicos, desde el punto de vista de su actividad se caracterizan por formar espuma en soluciones acuosas y por hemolizar los glóbulos rojos. Las saponinas tienen un amplio rango de actividades biológicas tales como su acción antimicótica, antiviral, hipolesterolemica, hipoglicémica, antitrombótica, diurética, antiinflamatoria y molusquicida.[10].

Las saponinas esteroides se pueden reconocer fácilmente en análisis fitoquímicos preliminares mediante ensayos de espuma, hemólisis de glóbulos rojos, Lieberman-Burchard y ensayos en carbohidratos[11].



**Figura 1.** Estructura molecular generalizada de saponinas

Las saponinas del fique son de naturaleza esteroide y por hidrólisis de estas se obtienen las sapogeninas esteroides que son de gran interés para la industria farmacéutica por ser sustancias esteroidales, sexuales y corticoides, de gran valor comercial, que se usan como anticonceptivos y se consideran productos de transformación, de síntesis parcial cuya materia prima es de origen vegetal, siendo el fique una de las escasas plantas poseedoras de esta sustancia[12].

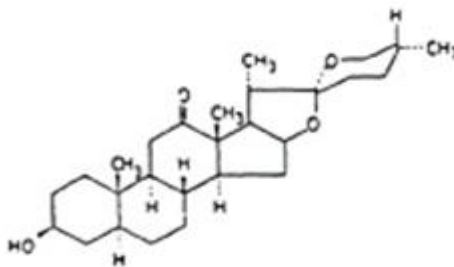
En este trabajo se planteó como objetivo principal evaluar dos métodos de extracción de las saponinas presentes en el bagazo del fique; con el fin de buscar el aprovechamiento industrial de los residuos del beneficio de esta planta.

La investigación de las saponinas ha tenido su mayor desarrollo en países como China y Tailandia en donde han extraído e identificado gran cantidad y variedad de saponinas de diferentes especies de plantas y con distintos métodos de extracción. Especies vegetales como *Pueraria*[13], *Gynospermma pentaphyllum* [14], *Ganoderma atrum* [15], *Ziziphus Jujuba* [16] han sido analizadas con resultados positivos para el aislamiento de saponinas, sin embargo ha sido el

*Ginseng*, planta a la que se le atribuyen propiedades medicinales, el principal objeto de estudio en la extracción de saponinas.

En latinoamérica también se han desarrollado varios estudios de extracción de saponinas. En Guatemala extrajeron saponinas esteroidales de *Yucca Elephantipes* (flor de izote)[17]. En Cuba hicieron un análisis de 88 especies de flora cubana a las que les realizaron pruebas químicas para identificar saponinas[18]. En otros países como Argentina, Nicaragua, Chile y México se han desarrollado estudios con fines estrictamente medicinales.

La obtención de sapogeninas a nivel nacional ya ha sido objeto de estudio, en la Facultad de Ingeniería Química de la UPBM [7] obtuvieron un método mejorado para producir hecogenina, una sapogenina esteroidal, a partir de hojas de la planta de fique. En la Universidad Industrial de Santander se desarrolló como trabajo de grado el modelo de una planta para la obtención de saponina, pero hasta el momento ese proyecto no ha sido puesto en marcha[19].



**Figura 2.** Estructura molecular Hecogenina

En la Universidad Nacional se desarrolló, a nivel de planta piloto un proceso para obtener sapogeninas: Hecogenina y Tigogenina del jugo de fique de la variedad tunoso común, en el cual se mejora el proceso de extracción convencional por Soxhlet, sometiendo al jugo a un proceso de autólisis. Estas investigaciones demostraron que el jugo de fique, puede darle un alto valor agregado a los subproductos del fique, debido a que las sapogeninas esteroidales son ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica.

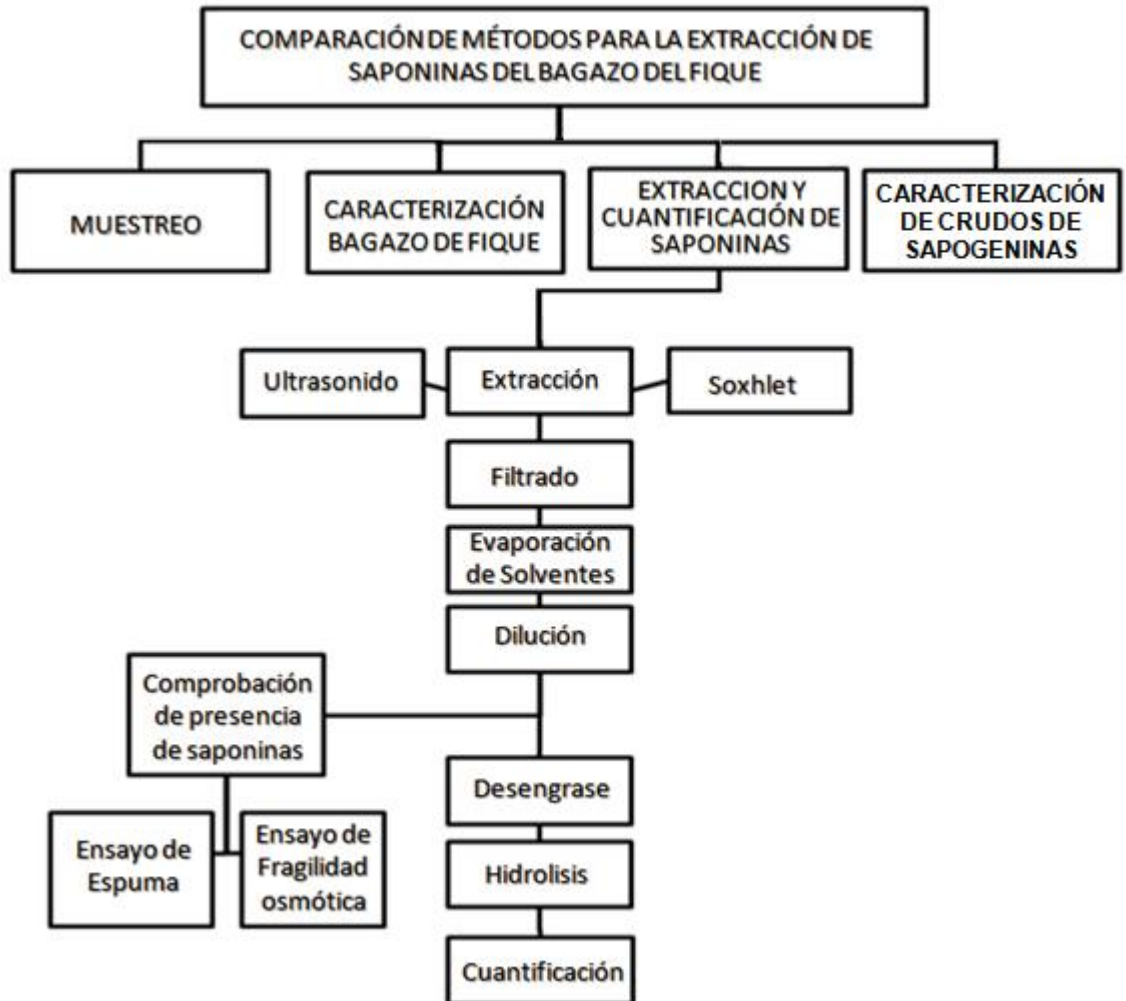
La extracción de saponinas se realiza por los métodos: Soxhlet, acelerado por solventes, asistido por microondas o ultrasonido y extracción con fluidos súper-críticos[20]. En este trabajo, para la extracción de las saponinas del fique, se optó por comparar la extracción Soxhlet por su reconocimiento como método tradicional y la extracción asistida por ultrasonido (EAU), por ser un método eficiente y necesitar menor tiempo de extracción. Los métodos Soxhlet y EAU utilizan solventes polares, como alcoholes y mezclas de estos con agua. Para este trabajo se utilizaron dos mezclas de solventes, metanol-agua, y butanol-etanol, aunque se reportan estudios en donde los solventes utilizados fueron mezclas de butanol con agua[21].

La extracción soxhlet es un método ciclico en el que se usa un equipo de tres piezas (balón, camara extractora y condensador) que se utiliza para extraer compuestos contenidos en materiales sólidos. El compuesto se diluye en el solvente por la afinidad polar que hay entre ambos produciendose una solución del compuesto en el disolvente que se irá concentrando a medida que el ciclo se repita[22].

El método de extracción asistido por ultrasonido (EAU) proporciona una alta eficiencia de contacto en la muestra entre la matriz y el disolvente. Un efecto de cavitación sónica es producido bajo la irradiación del ultrasonido en donde micro-burbujas son formadas cuando la presión negativa es suficientemente alta. Una vez creadas, estas burbujas crecen y se comprimen cuando las presiones son negativas y positivas respectivamente, la constante expansión y compresión genera el colapso de las burbujas en donde se rompen las paredes celulares y facilitan la penetración de solvente en estas, se aumenta la temperatura disminuyendo la viscosidad y estos factores hacen que el fenómeno de transferencia de masa sea mejor [23].

## METODOLOGÍA

El desarrollo metodológico se llevó a cabo en tres etapas: Muestreo, Caracterización del bagazo de fique y Extracción / cuantificación de las saponinas obtenidas. La metodología se resume en el diagrama mostrado en la Figura 3.



**Figura 3..** Metodología para la comparación de métodos Soxhlet Vs Ultrasonido para la extracción de saponinas del bagazo de fique.

## **ETAPA DE MUESTREO**

El municipio de mogotes con una extensión total de 487,86 Km<sup>2</sup> está ubicado en el departamento de Santander a 33 Km de del municipio de San Gil, a 1700 msnm. En este municipio existen 1733 hectáreas de plantaciones de fique. Para este trabajo se tomaron muestras de la planta de Beneficio el Guayabetal.

Se recogieron hojas de fique en las que no se observaran laceraciones o daños ocasionados por alguna clase de microorganismos. Se limpió la máquina desfibradora con alcohol al 70%. Al iniciar el proceso de desfibrado se descartaron la primera y última fracción expulsadas de la maquina, y se tomaron las muestras de la fracción del intermedia. Se llenaron bolsas sellables teniendo cuidado de no dejar espacios de aire, se midió el valor del pH. Las bolsas fueron rotuladas con fecha y lugar de muestreo (octubre 7 Planta de Beneficio el Guayabetal) y se pusieron en una nevera de icopor con hielo. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su uso.

## **ETAPA DE CARACTERIZACIÓN DEL BAGAZO DEL FIQUE**

A las muestras de bagazo de fique se les realizó una caracterización, consistente en la determinación de: humedad, nitrógeno, potasio, fosforo, azufre, cobre, cinc, carbono, sólidos, materia orgánica y poder calórico. La caracterización se realizó mediante análisis de gravimetría, suma de nitrógenos, emisión, colorimetría, turbidimetria, absorción atómica, y walkey black.

## **ETAPA DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS PRESENTES EN EL BAGAZO DE FIQUE**

La ejecución de esta etapa incluyo: extracción, filtrado, evaporación de solventes, dilución, desengrase, hidrólisis, secado y cuantificación, además paralelamente se realizó una comprobación de presencia de saponinas.

## Extracción

La extracción de las saponinas mediante el método Soxhlet fue llevada a cabo en un equipo Soxhlet de 130 ml de capacidad y la extracción asistida por ultrasonido fue ejecutada en una unidad de limpieza ultrasónica ELMASONIC E30H a una frecuencia ultrasónica de 37 KHz.



**Figura 4.a.** Unidad de baño de ultrasonido utilizada para extracción de saponinas



**Figura 4.b.** Equipo soxhlet utilizado para extracción de saponinas

Para cada solvente se planteó un diseño factorial de experimentos  $2^3$ . Los experimentos se hicieron por duplicado para las extracciones Soxhlet y por triplicado para las extracciones asistidas por ultrasonido. Los tiempos de extracción fueron de 4 y 8 horas para las extracciones Soxhlet y de 1 y 2 horas para las extracciones asistidas por ultrasonido. Las relaciones solvente-bagazo fueron 7 y 14 [ml de solvente/g de bagazo] para los niveles bajo y alto en el diseño experimental. Las relaciones volumétricas para los sistemas de solventes utilizados fueron metanol-agua 30/70 y 70/30 y butanol-etanol 30/70 y 50/50.

Los diseños experimentales sobre los cuales se hicieron las pruebas para la investigación son los que se presenta en las tablas 2.a., 2.b., 3.a. y 3.b.

**Tabla 1.** Diseño experimental para extracción de saponinas por método Soxhlet

Factores Niveles	Tiempo	Sistema de solventes	Relación solvente-sólido
Alto	8 horas	Metanol 70%	14 (ml/g)
Bajo	4 horas	Metanol 30%	7 (ml/g)

Factores Niveles	Tiempo	Sistema de Solventes	Relación solvente-sólido
Alto	8 horas	Butanol-etanol 30/70	14 (ml/g)
Bajo	4 horas	Butanol-etanol 50/50	7 (ml/g)

**Tabla 2.** Diseño experimental para extracción de saponinas por método EAU

Factores Niveles	Tiempo	Sistema de solventes	Relación solvente-sólido
Alto	2 horas	Metanol 70%	14 (ml/g)
Bajo	1 horas	Metanol 30%	7 (ml/g)

Factores Niveles	Tiempo	Sistema de Solventes	Relación solvente-sólido
Alto	2 horas	Butanol-etanol 30/70	14 (ml/g)
Bajo	1 horas	Butanol-etanol 50/50	7 (ml/g)

La descripción detallada de cada experimento se puede observar en el anexo III.

### Filtrado

Luego de la extracción, partículas de bagazo quedan suspendidas en el extracto por lo que es necesario retirarlas ya que se asume que las saponinas contenidas en el bagazo de fique fueron arrastradas en el proceso de extracción. La operación de filtrado se realizó en un equipo Buchner mediante vacío proporcionado por una bomba de extracción (Thomas modelo 1130). Los sólidos retenidos en el filtro fueron descartados y el filtrado se utilizó para la siguiente etapa.

## **Evaporación de solventes**

Los solventes utilizados para la extracción hacen complicado y riesgoso el procedimiento subsecuente para la obtención de saponinas por eso se purificaron los extractos evaporando los solventes en recipientes de vidrio con una estufa convencional (MEMMERT 2B30U) a una temperatura de 55° C y presión atmosférica, hasta sequedad total.

## **Dilución**

Para facilitar su manipulación, los extractos secos de saponinas libres de solvente se diluyeron agregando suficientes cantidades de agua destilada que disolvieran a temperatura ambiente las muestras secas adheridas a los recipientes de vidrio, a los extractos obtenidos con soxhlet se les adicionó 250 ml mientras que a los obtenidos con asistencia ultrasónica 100 ml.

## **Desengrase**

Para evitar la presencia de contenidos lipídicos que pudieron ser extraídos junto con las saponinas se desarrolló un proceso de desengrase. Se tomó una alícuota de 25 ml del extracto diluido y en un embudo de separación de 100 ml se procedió a desengrasar con n-hexano (escogido por sus características de solvente apolar) en proporción 1:1. La mezcla se agitó por 20 segundos, para una posterior purga de los gases formados, esta operación se repitió en tres ocasiones. Terminada la agitación se dejó la mezcla en reposo 2 horas permitiendo la separación de los compuestos en tres fases: lipídica, n-hexano en exceso, y extractos de saponinas libres de grasas. Las dos primeras fases nombradas anteriormente son desechadas, y los extractos son llevados a la fase siguiente.

## **Hidrólisis**

De acuerdo con la literatura, la conversión de saponinas a saponinas requiere un proceso de hidrólisis, que facilite el rompimiento del enlace glicosídico. Para

este trabajo se consideró una hidrólisis ácida como el método más conveniente, teniendo en cuenta aspectos económicos y técnicos. Este proceso se llevo a cabo en una campana de extracción, la muestra desengrasada se llevo a un balón de 250 ml con su respectivo condensador y se sometió a un reflujo con ácido clorhídrico 2.5 N a una temperatura de 90° C durante 4 horas. Después la muestra se enfrió hasta la temperatura ambiente. Luego de fría se observaron precipitados color marrón, los cuales indicaban la presencia de saponinas en la muestra hidrolizada.

### **Secado**

Las muestras de extractos de saponinas (hidrolizadas) se colocaron en cajas Petri, capacidad 60 ml, y se sometieron a secado en una estufa MEMMERT 2B30U a 60°C, durante un tiempo de 24 horas. Los extractos de saponinas libres de HCl se enfriaron a temperatura ambiente para ser posteriormente pesadas.

### **Cuantificación**

Las muestras de los extractos de saponinas secas fueron llevadas a un desecador, durante 20 minutos. A continuación se procedió a pesar las muestras y a tabular los datos obtenidos.

Teniendo en cuenta la ecuación 1, se calculó el porcentaje de rendimiento de la extracción.

$$\%Rendimiento = \frac{(P_f - P_i)}{A * B} * 100$$

*P<sub>f</sub>*: peso de caja petri con muestra seca.

*P<sub>i</sub>*: peso de caja petri vacía.

*A*: Fracción alícuota tomada para desengrase.

*B*: Cantidad de bagazo inicial.

**Ecuación 1.** Cálculo de porcentaje en peso de extracto de saponina

## **COMPROBACIÓN DE PRESENCIA DE SAPONINAS**

La presencia de saponinas en los extractos resultantes luego del proceso de dilución, se comprobó mediante las pruebas de a) Ensayo de espuma y b) Ensayo de Fragilidad Osmótica.

### **Ensayo de espuma**

En tubos de ensayo de 15 ml de capacidad se agregaron 5 ml de extracto diluido. Se agitó manualmente cada tubo durante 30 segundos. Se midió con una regla la altura de la espuma producida. Los datos recogidos fueron tabulados para su respectivo análisis.

### **Ensayo de Fragilidad Osmótica**

La hemólisis es el fenómeno de la desintegración de los glóbulos rojos. El ensayo de fragilidad osmótica analiza los efectos de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica.

Para el ensayo de Fragilidad Osmótica se colectaron glóbulos rojos con anti coagulante EDTA. Se tomaron alícuotas de 1 ml de glóbulos rojos y se lavaron con solución salina isotónica (10% p/v) para mantener las condiciones fisiológicas y se prepararon soluciones de glóbulos rojos al 5% en volumen.

Posteriormente se realizaron seis diluciones de los extractos de saponinas. Se agregaron 0,2 ml de solución de glóbulos rojos. Se centrifugó a 3000 gravedades/minuto durante 10 minutos y los sobrenadantes se analizaron a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (Henssell junior II) siguiendo el protocolo del anexo v.

## **ETAPA DE CARACTERIZACIÓN DE LOS CRUDOS DE SAPOGENINAS**

Para identificar los compuestos extraídos a algunas muestras de los crudos se les hicieron pruebas de a) Cromatografía de capa líquida y b) Espectroscopia infrarroja

## RESULTADOS Y ANALISIS

### Caracterización de los residuos del fique

Las muestras de bagazo presentan un Poder calórico Inferior de 3297,91 [Kcal/Kg], y las características que se especifican en la **tabla 3**.

**Tabla 3.** Resultados caracterización pulpa de fique.

Componente	Cantidad	Unidades	Método analítico
Humedad	84,81	% P/P	NTC 35 Gravimetría
Nitrógeno total	0,11	% P/P	Suma de Nitrógenos
Potasio total	0,003	% P/P	NTC 202 Emisión
Fosforo total	0,003	% P/P	NTC 234 Colorimetría
Azufre	0,006	% P/P	NTC 1154 Turbidimetría
Cobre	0,0001	% P/P	NTC 1369 Absorción atómica
Zinc	0,0001	% P/P	NTC 1369 Absorción atómica
Carbón orgánico total	6,93	% P/P	NTC 5167 Walkey Black
Sólidos totales	15,19	% P/P	NTC 35 Gravimetría
Materia orgánica	11,94	% P/P	Cálculo
Poder calorífico inferior	3297.91	Kcal/kg	LBC 224 Bomba Calorimétrica

La materia orgánica del fique está compuesta por sacarosa, proteínas, esteroides, y saponinas [1]. Los resultados de los análisis realizados al bagazo de fique indican que hay un 11.94 % en peso de materia orgánica lo que indica que las muestras utilizadas tienen saponinas y al extraerlas teniendo en cuenta el precio de las saponinas (saponinas hidrolizadas) oscila entre los seis y doscientos dólares por gramo. Industrializar la obtención de saponinas a partir de los residuos del fique es un prometedor proyecto con múltiples beneficios.

## Extracción y Cuantificación

Los datos mostrados en la Tabla 4 corresponden a los porcentajes en peso de los crudos de saponinas obtenidos en relación a la cantidad de residuos extraídos de cada experimento, a estos valores se les denominó porcentajes de rendimiento.

**Tabla 4.** Rendimiento de extracción de sapogeninas - métodos Soxhlet y Ultrasonido

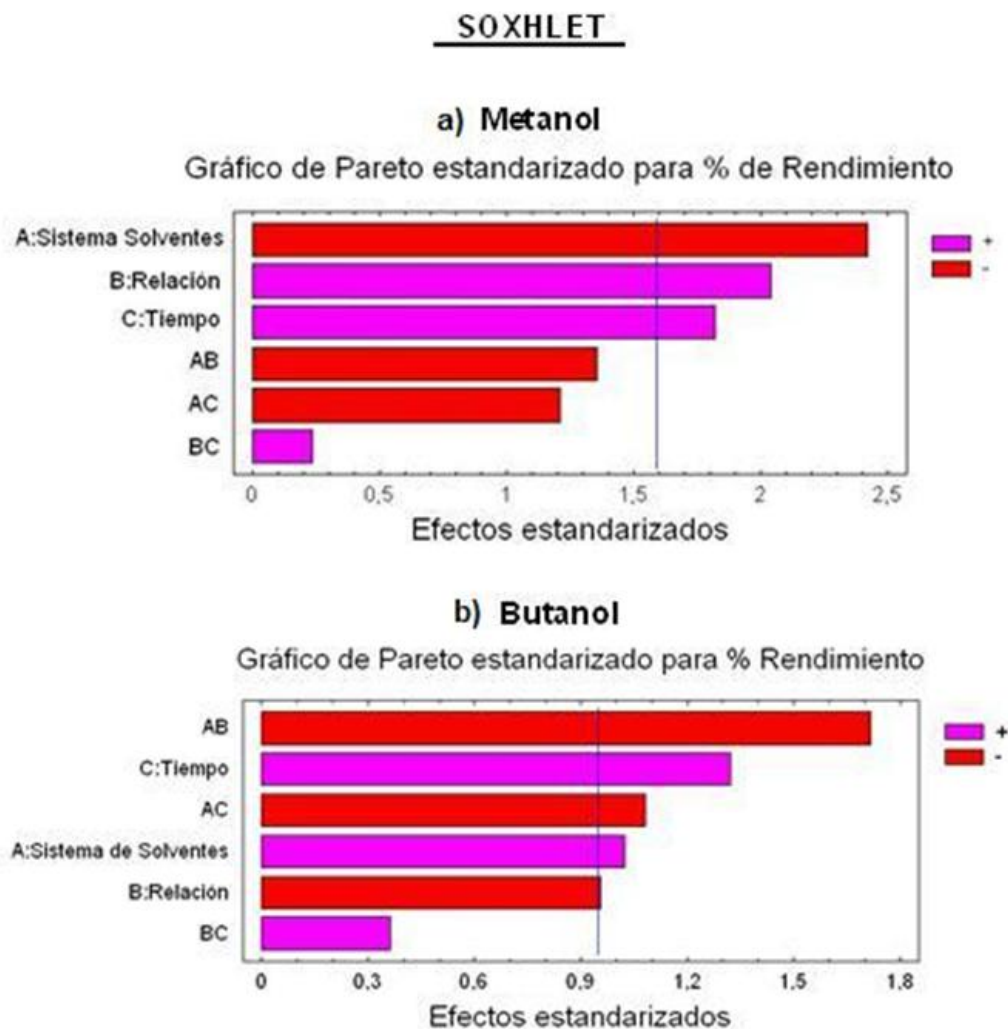
Solvente	[g bagazo/ml solvente]	Nivel de Tiempo	Rendimiento [% peso]	
			Soxhlet	Ultrasonido
Metanol-agua (35 – 65)	14	Bajo	1,794	5,232
Metanol-agua (60 – 40)	14	Bajo	2,352	3,520
Metanol-agua (35 – 65)	14	Alto	3,020	6,016
Metanol-agua (60 – 40)	14	Alto	1,482	5,536
Metanol-agua (35 – 65)	7	Bajo	1,546	2,348
Metanol-agua (60 – 40)	7	Bajo	0,944	1,512
Metanol-agua (35 – 65)	7	Alto	1,877	2,352
Metanol-agua (60 – 40)	7	Alto	1,683	2,504
Butanol-etanol(30 – 70)	14	Bajo	1,755	3,168
Butanol-etanol(50 – 50)	14	Bajo	2,213	3,751
Butanol-etanol(30 – 70)	14	Alto	2,162	2,405
Butanol-etanol(50 – 50)	14	Alto	1,657	2,080
Butanol-etanol(30 – 70)	7	Bajo	0,951	1,728
Butanol-etanol(50 – 50)	7	Bajo	2,287	1,760
Butanol-etanol(30 – 70)	7	Alto	1,431	1,749
Butanol-etanol(50 – 50)	7	Alto	1,090	2,293

Las filas sombreadas corresponden a los experimentos de mayor y menor porcentaje de rendimiento

En la tabla anterior se observa que el mejor rendimiento de extracción se obtiene con el método EAU, debido a que tiene los mayores resultados de porcentaje en peso de rendimiento además de necesitar menores tiempos de extracción lo que hace a este método más eficiente en cuanto a rendimiento y economía

## Influencia de las variables en el porcentaje de rendimiento

La figura 5 muestra los gráficos de Pareto para cada diseño experimental, obtenidos con el software STATGRAPHICS Plus 5.1, en donde se puede observar que la variable que produce el mayor efecto es el tiempo de extracción ya que es la constante en todos los diseños.



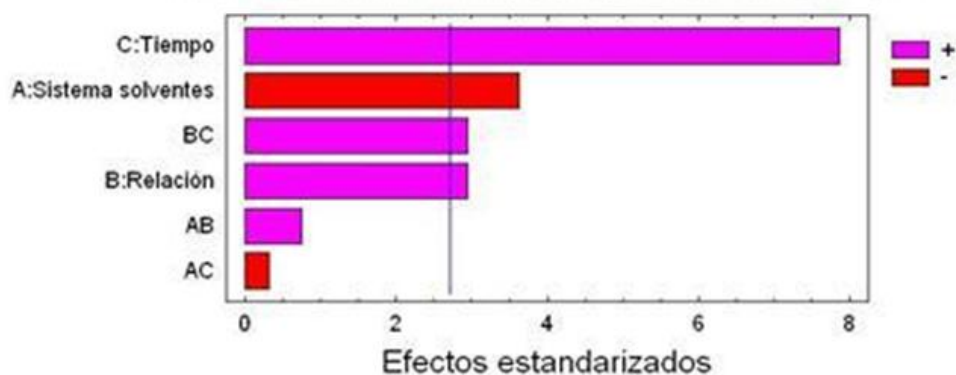
**Figura 5.a.** Gráfico de Pareto para extracciones soxhlet con mezclas de metanol-H<sub>2</sub>O como solventes

**Figura 5.b.** Gráfico de Pareto para extracciones soxhlet con mezclas de Butanol-Etanol como solventes

## EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EAU)

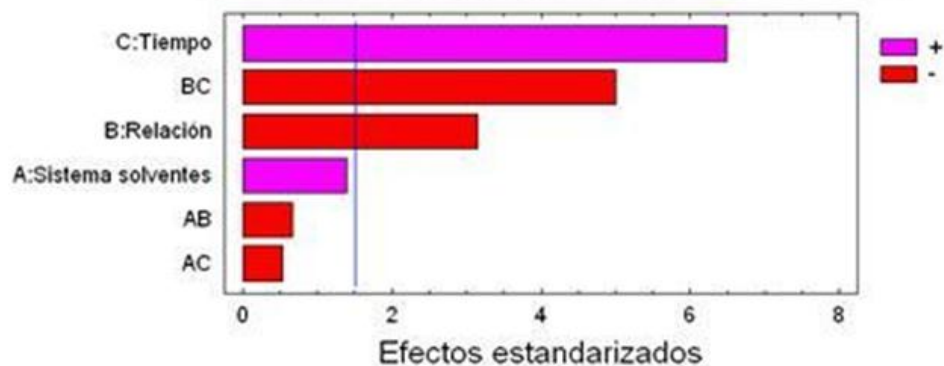
### c) Metanol

Gráfico de Pareto estandarizado para % Rendimiento



### d) Butanol

Gráfico de Pareto estandarizado para % Rendimiento



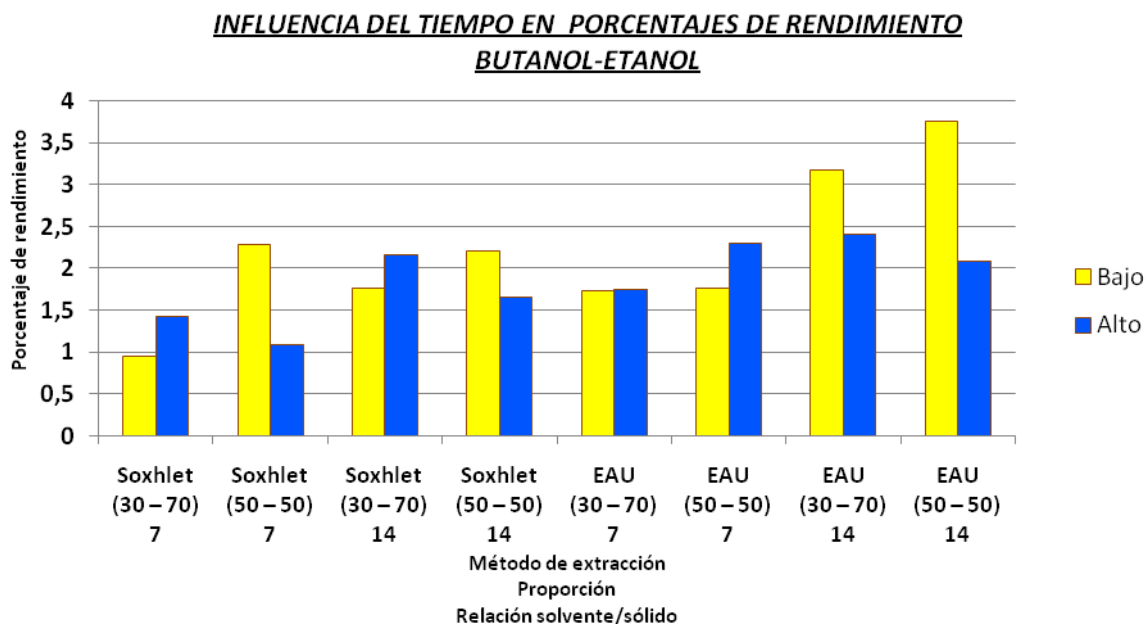
**Figura 5.c.** Gráfico de Pareto para EAU con mezclas de metanol-H<sub>2</sub>O como solventes  
**Figura 5.d.** Gráfico de Pareto para EAU con mezclas de Butanol-Etanol como solventes

La influencia de las variables de los diseños experimentales en el porcentaje de rendimiento presenta un comportamiento diferente para todos los diseños, esto es debido a que los métodos de extracción interactúan de manera diferente con los solventes por su naturaleza físico-química como se verá en los apartes posteriores.

En la EAU la viscosidad es un factor determinante ya que influye en la velocidad de transferencia de masa. Para cada sistema de solvente en la extracción Soxhlet la temperatura de ebullición de la mezcla de solventes y la capacidad calorífica afectan la velocidad de cada ciclo.

### Influencia del tiempo de extracción

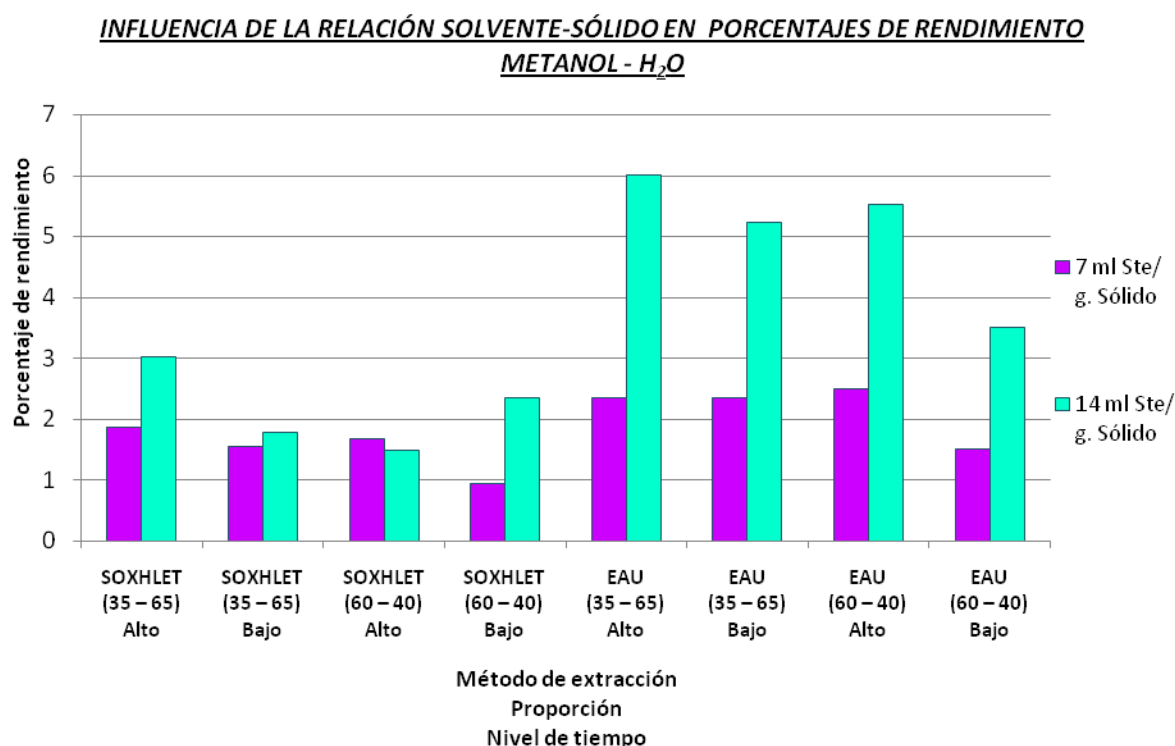
La figura 6 refleja los efectos del nivel de tiempo en los diseños experimentales correspondientes a los sistemas de solvente butanol-etanol, se observa que tanto para la extracción Soxhlet como para la EAU el efecto del tiempo es diferente para cada proporción de solventes siendo superior el porcentaje de rendimiento para los niveles de tiempo bajos en la proporción 50–50, esto puede deberse a que luego de cierto tiempo el solvente se satura y para llegar a un equilibrio las saponinas se reincorporan al material sólido. Para la relación de butanol-etanol 30–70 el nivel de tiempo alto produce un mayor porcentaje de rendimiento pero la diferencia entre los niveles bajo y alto no es muy grande.



**Figura 6.** Influencia del tiempo en el porcentaje de rendimiento de extracción de saponinas.

## Influencia de la relación Solvente–Sólido

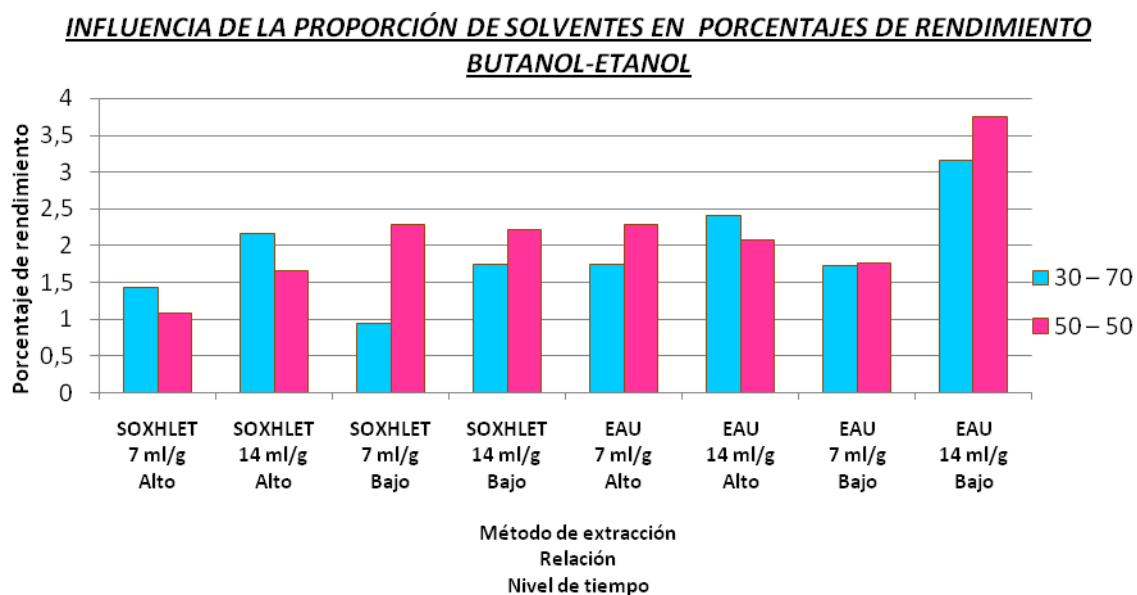
La figura 7 muestra la influencia de la relación Solvente–Sólido para el sistema de solvente Metanol–H<sub>2</sub>O. En la extracción Soxhlet los porcentajes de rendimiento en su mayoría son mejores para la relación de catorce mililitros de solvente por gramo de sólido aunque los rendimientos no son muy altos. Para la EAU es drásticamente notable la influencia de la relación Solvente–Sólido en donde los porcentajes de rendimiento para la relación catorce llegan a superar el doble de los porcentajes de la relación siete, esto se debe a que la irradiación ultrasónica aumenta la transferencia de masa sin saturar el solvente.



**Figura 7.** Influencia de la relación Solvente–Sólido en el porcentaje de rendimiento de extracción de saponinas

Esta grafica tiene consistencia con las Figuras 5.a y 5.c en las que la relación Solvente–Sólido es una variable que influye en el porcentaje de rendimiento.

## Influencia de la concentración de solventes



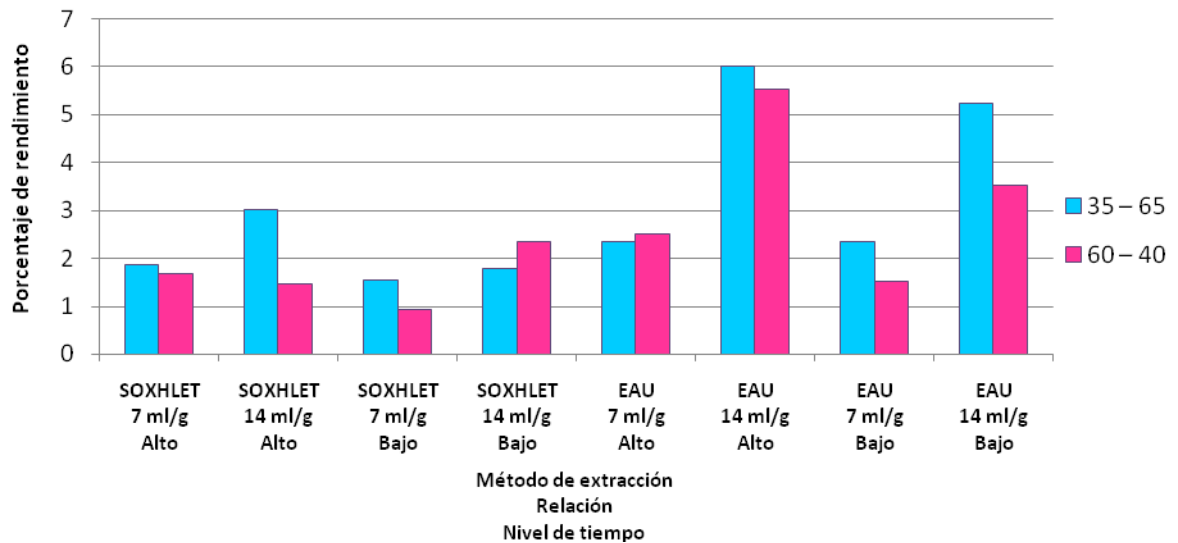
**Figura 8.** Influencia de concentración de butanol en el sistema de solventes en el porcentaje de rendimiento de extracción de saponinas.

Para los sistemas de solventes Butanol–Etanol la proporción no es una variable que cause mayor efecto en el porcentaje de rendimiento, como se puede ver en la figura 8, aunque en la mayoría de los casos el sistema de solventes EAU con menor cantidad de Butanol es superior, la diferencia entre las proporciones 30-70 y 50-50 no es relevante. Esto se debe a que la polaridad relativa y la densidad de estos dos tipos de solventes es muy similar, como se observa en la tabla 5, por lo que variar las proporciones no afecta las propiedades que influyen en la transferencia de masa.

**Tabla 5.** Propiedades de solventes utilizados

Propiedad Solvente	Polaridad	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Viscosidad (cp.)
n-Butanol	5.3	0.8095	1.5
Etanol	5.2	0.7890	1.2
Metanol	5.1	0.7918	0.6
Agua	9	1	0.89

**INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SOLVENTES EN PORCENTAJES DE RENDIMIENTO**  
**METANOL-H<sub>2</sub>O**



**Figura 9.** Influencia de la concentración de Metanol en el sistema de solventes en el porcentaje de rendimiento de extracción de saponinas.

El porcentaje del extracto recuperado se incrementa con el aumento del porcentaje de agua de 40% a 65%. Esto es probable que se deba a la polaridad relativa y al incremento de la dilatación efectiva del sólido extraído por el agua. Esto ayuda a que la superficie de contacto de la pulpa de fique-solvente se incremente. Además, la presencia de agua hace que disminuya la viscosidad de la mezcla, así la transferencia de masa aumenta.

El software STATGRAPHICS Plus 5.1 permite relacionar las variables del proceso mediante modelos matemáticos. Estas ecuaciones, mediante un ajuste de regresión lineal, describen la relación entre % de Rendimiento y las 3 variables independientes (tiempo de extracción, sistema de solventes y relación solvente-sólido). La tabla 6 presenta dichos modelos.

**Tabla 6.** Modelos matemáticos para la extracción de saponinas, obtenidos con el programa STATGRAPHICS Plus 5.1.

<b>MODELOS MATEMATICOS</b>					
Método de Extracción	Sistema DE Solventes	Nivel de Confianza	% de Variabilidad	Error Estándar	Error Absoluto Medio (MAE)
Soxhlet	Metanol-agua	95 %	53,7019	0,448798	0,333094
$\% \text{ Rendimiento} = 1.50875 + (0.104375 \times \text{tiempo}) + (0.0667857 \times \text{Relación}) - (0.0222 \times \text{Sistema de Solvente})$					
Soxhlet	Butanol-etanol	90 % o mas	16,3687	0,786187	0,553294
$\% \text{ Rendimiento} = 0.8886 + (0.127394 \times \text{tiempo}) - (0.03055 \times \text{Relación}) + (0.007995 \times \text{Sistema de Solvente})$					
EAU	Metanol-agua	99%	77,7723	0,986756	0,66559
$\% \text{ Rendimiento} = -0.42695 + (3.14958 \times \text{tiempo}) - (0.100226 \times \text{Relación}) - (0.0388633 \times \text{Sistema de Solvente})$					
EAU	Butanol-etanol	99 %	54,1976	0,552021	0,408208
$\% \text{ Rendimiento} = 1.30625 + (0.968417 \times \text{tiempo}) - (0.0671071 \times \text{Relación}) + (0.00694722 \times \text{Sistema de Solvente})$					

*Tiempo:* tiempo de extracción [horas]

*Relación:* cantidad de solvente extractor por sólido extraído  
[ml de solvente/g de pulpa fique]

*Sistema de solvente:* porcentaje de Butanol o Metanol en la mezcla [%]

Estos modelos presentan niveles de confianza estadístico superior al 90%. El modelo explica un % de la variabilidad en % de Rendimiento. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos. El error absoluto medio (MAE) es el valor medio de los residuos.

## **COMPROBACIÓN DE PRESENCIA DE SAPONINAS**

### **Ensayo de espuma**

En la tabla 7 se presenta los promedios de producción de espuma en centímetros, de acuerdo al protocolo (anexo v) el cual establece que al agitar una solución

acuosa de saponinas se forma espuma estable, como la formada al agitar una solución acuosa de jabón.

**Tabla 7.** Ensayo de espuma.

Sistema solventes	Relación solventes (ml ste/g bag)	Nivel de tiempo	Promedio Producción de espuma (cm)	
			Soxhlet	Ultrasonido
Met-H <sub>2</sub> O 35-65	14	Bajo	1,25	2,50
Met-H <sub>2</sub> O 35-65	14	Alto	1,95	2,70
Met-H <sub>2</sub> O 35-65	7	Bajo	1,25	1,40
Met-H <sub>2</sub> O 35-65	7	Alto	1,30	1,60
Met-H <sub>2</sub> O 60-40	14	Bajo	0,60	1,47
Met-H <sub>2</sub> O 60-40	14	Alto	1,25	1,37
Met-H <sub>2</sub> O 60-40	7	Bajo	1,67	0,90
Met-H <sub>2</sub> O 60-40	7	Alto	1,50	2,50
But-et 30-70	14	Bajo	1,25	2,53
But-et 30-70	14	Alto	1,95	3,55
But-et 30-70	7	Bajo	1,25	2,80
But-et 30-70	7	Alto	2,60	3,33
But-et 50-50	14	Bajo	0,60	2,70
But-et 50-50	14	Alto	1,25	2,53
But-et 50-50	7	Bajo	1,67	4,00
But-et 50-50	7	Alto	1,50	4,33

Met-H<sub>2</sub>O: sistema Metanol – Agua

But-et: sistema Butanol – Etanol

El ensayo de espuma arrojó altos índices de espumosis. Lo que indica un buen contenido de saponinas en los desechos del bagazo de fique, debido a que las saponinas, como el jabón son elementos tenso-activos los cuales tienen una alta formación de espuma en dependencia a su concentración.

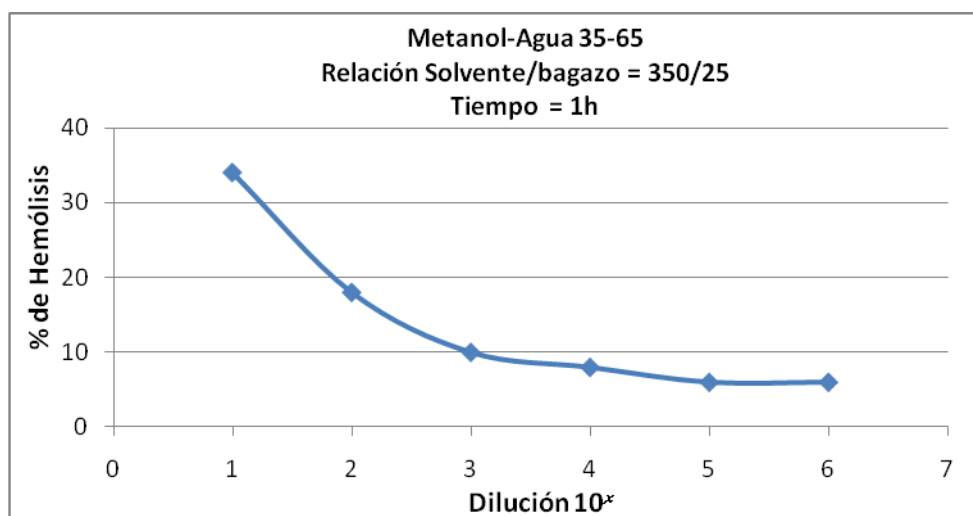
### **Ensayo de hemólisis**

En la tabla 8 se presentan los resultados de ensayo de Hemólisis o fragilidad osmótica, que se hizo a ocho muestras de saponinas extraídas.

**Tabla 8.** Ensayo de hemólisis.

Método de extracción	Sistema solventes	Relación solvente/bagazo (ml ste/g bag)	Tiempo (Horas)	Espuma Producida (cm)	% Hemólisis	% de Rendimiento
SOXHLET	Met 60	14	4	0,7	15	1,800
SOXHLET	But 50	14	4	0,8	18	2,137
EAU	But 30	14	1	2,5	19	3,200
EAU	Met 60	7	2	2,7	24	2,836
EAU	Met 35	14	1	2,7	34	4,336
SOXHLET	But 30	7	8	2.9	56	1,421
EAU	But 50	7	2	4,5	61	2,064

Los resultados de los efectos hemolíticos en el total de las muestras a las que se le realizó la prueba fueron positivos. Se observa, en la sexta columna de la tabla 8 altos porcentajes de hemólisis en cada muestra, que además son consistentes con los resultados obtenidos con los ensayos de espuma presentados en la quinta columna de la misma tabla, en donde los resultados con mayor producción de espuma son los resultados con mayor porcentaje de hemólisis. con lo anterior, se confirma la presencia de saponinas en todos los extractos por su relación directamente proporcional entre los resultados de las pruebas de espuma y hemólisis.



**Figura 10.** Fragilidad osmótica

Del mismo modo la Figura 10 enseña la curva de fragilidad osmótica de una de las muestras, en la que se observa una tendencia típica del efecto de la concentración de las saponinas en el rompimiento de los glóbulos rojos, donde la preparación mas concentrada causa el mayor porcentaje de hemólisis y la más diluída el menor porcentaje. Sin embargo el comportamiento de las curvas es diferente para cada muestra, como se puede ver en el anexo vii. , lo que puede ser consecuencia del método de extracción.

Comparando los métodos para la obtención de las saponinas se observa en la Tabla 8 que los porcentajes de hemólisis más altos corresponden en su mayoría a los conseguidos con el método de extracción asistido por ultrasonido mientras que los más bajos son los extraídos con el Método Soxhlet, resultados que ratifican al método EAU como el más eficiente.

## **CARACTERIZACIÓN DE LOS CRUDOS OBTENIDOS**

Los crudos obtenidos están compuestos por una mezcla de sapogeninas. Por medio de cromatografía de capa fina se detectó una mezcla de tres compuestos. La figura 11 y 12 corresponden a los espectros infrarrojos de uno de los crudos y de hecogenina pura respectivamente, se pueden observar los grupos funcionales característicos de la hecogenina que a su vez son similares para todas las sapogeninas. Además de la hecogenina, la tigogenina es otra sapogenina conocida proveniente de la planta de fique, el tercer compuesto es una sapogenina aún no identificada.

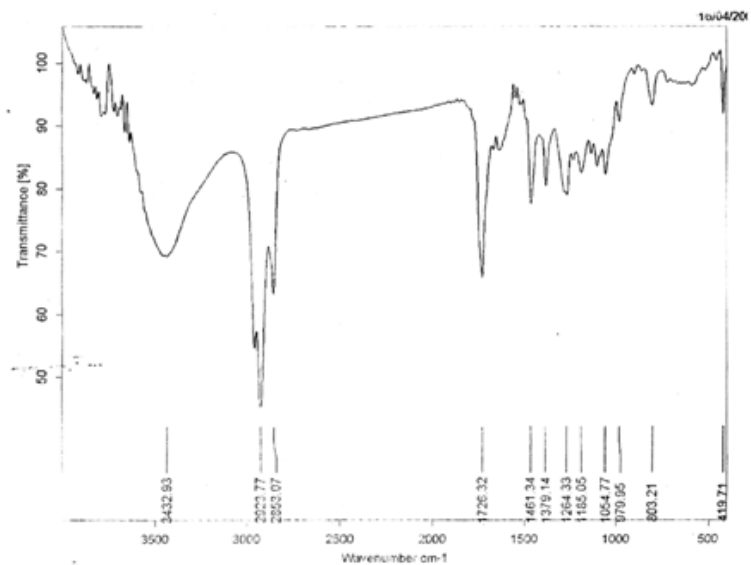


Figura 5. Espectro infrarrojo de crudo obtenido

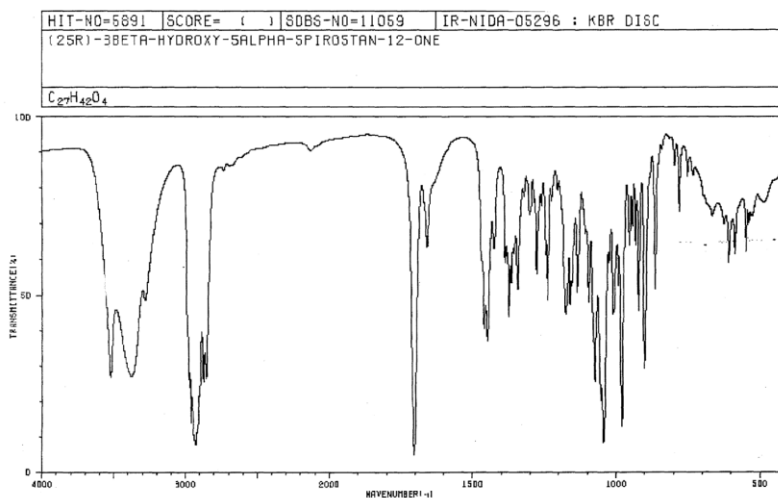


Figura 12. Espectro infrarrojo de Hecogenina.

## CONCLUSIONES

1. Mediante pruebas de fragilidad osmótica y de espuma se comprobó la presencia de saponinas en el bagazo de fique. Utilizando la técnica de Cromatografía de capa fina se midió la existencia de tres saponinas: la hecogenina y la tigogenina y una tercera no identificada.
2. Es viable extraer las saponinas en el bagazo de fique, hasta porcentajes de 6% en peso. Los mejores rendimientos de extracción de las saponinas, se consiguen realizando un proceso asistido por ultrasonido con una mezcla metanol-agua al 35%, como extractante, y un tiempo de operación de dos horas.
3. Se comprobó que la extracción asistida por ultrasonido es una muy buena alternativa ya que es eficiente en cuanto a rendimiento y tiempo de extracción sin embargo presenta limitantes para el escalado.

## BIBLIOGRAFÍA

1. CADEFIQUE, M.D.A.Y.D.R., COMPAÑIA DE EMPAQUES, CORPOICA, *Guía ambiental del subsector fiquero*. 2006 Caldas.
2. Barbosa, E., *Obtención de sapogeninas crudas y carbohidratos a partir del jugo de fique a nivel de planta piloto. Contenido de hecogenina y tigogenina en el jugo de las variedades cenizo y tunoso común*, in *Facultad de Ciencias*. 2006, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
3. ACEVEDO J. F, S.E.Y., *Optimización del proceso de extracción de material orgánico procedente de Fique (Furcraea sp.) Y observación del efecto biofungicida.*, in *Facultad de Ingeniería Química e Ingeniería Agroindustrial*. 2004, Universidad Pontificia Bolivariana de: Medellín.
4. GÓMEZ, N.L., Villa. A. H., (1993) *Bagazo del fique (Furcraea spp.), Ensilado para nutrición de rumiantes*. . 1993, Universidad Nacional de Colombia,: Palmira - Valle del Cauca.
5. GÓMEZ J., M.S., OCHOA M, *Aprovechamiento de la biomasa desecho en la obtención de las fibras de fique, bajo filosofía cero emisiones*, in *Departamento de Ingeniería de Producción*. 1998, Universidad EAFIT: Medellín.
6. ARIAS G., C.D., *Evaluación de propiedades insecticidas del jugo de fique.*, in *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 1996, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellin: Medellín.

7. MUÑOZ L., L.O.G.L., BUSTAMANTE H., P. , *Producción de cortisona a partir del jugo de fique*, in *Facultad de Ingeniería Química*. 1988, Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín: Medellín.
8. BARRERA Y, S.M., *Estudio preliminar de la bioproducción de metano a partir de los residuos del proceso de beneficio del fique.*, in *Escuela de Ingeniería Química*. 2008, Universidad Industrial de Santander.: Bucaramanga.
9. ARROYAVE P, V.D., Proyecto de grado. . , *Aprovechamiento integral de furcraea marophylla baker.*, in *Departamento de ingeniería de procesos*. 2001, Universidad EAFIT. : Medellín.
10. MARTINEZ A., N.C., . Universidad de La Habana. , *Contenido de saponinas esteroideas en agaves de ciclo corto: Manfreda brachystachis (cav.) Rose (rizosomas)"*, in *Facultad de Química*. 1993, Universidad de La Habana. : La Habana.
11. MARTÍNEZ A, *Saponinas Esteroides.*, in *Facultad de química Farmacéutica*. 2001, Universidad de Antioquia.: Antioquia.
12. GÓMEZ M., V.E., . , *Evaluación de la producción de esteroides a partir del jugo de fique con Cunninghamella spp*, in *Facultad de Ingeniería Química*. 2001, Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín. : Medellín.
13. HU Y., W.T., WANG M., HAN S., WAN P., FAN M.. *Extraction of isoflavonoids from pirttos by cobining ultrasound with microwave vacuum*. *Chemical Engineering and Processing Process Intensification*, 2008. **47**: p. 2256-226.

14. KAO T.H, H.S.C., STEPHEN INBARAJ B, CHEN. B.H, pag 200-211., *Determination of flavonoids and saponins in gynostemma pentaphilum (thunb.) Makino by liquid chromatography-mass spectrometry*. Analytica Chimica, 2008. **626**: p. 200-211.
15. CHEN Y., X.Y.-M., GONG X-F., *Microwave assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from ganoderma atrum*. Journal of Food Engineering, 2007. **81**: p. 162-170.
16. ZHAO J., L.S.P., YANG F.Q., LI P., WANG Y.T., *Simultaneous determination of saponins and fatty acids in ziziphus jujuba (Suanzaoren) by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction*. Journal of Chromatography, 2006. **1108**: p. 188-194.
17. LURSSSEN L., *Cuantificación de saponinas esteroideas en yucca elephantipes (flor de izote)*. In *facultad de ciencias y químicas farmacéuticas*. 2001, Universidad de san carlos de guatemala, : guatemala.
18. FERNANDEZ H., B.M., SARDUY R., *Tamizaje de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en cuba*, in *Instituto de ecología y sistemática*. 1993, Academia de Ciencias de Cuba.: Cuba.
19. AGUILAR M., V.O., *Diseño de una planta a escala semiindustrial para producción de hecogenina a partir de los jugos de la hoja de furcraea macrophylla (fique)*, in *Escuela de Ingeniería Química*. 2006, Universidad Industrial de Santander. : Bucaramanga.
20. AZUOLA R., V.P.E.d.s.a.p.u.E., *Extracción de sustancias asistidas por ultrasonidos EAU*. Tecnología en marcha. , 2007. **20**(4): p. 30-40.

21. KWON J., B.J., PARÉ J., YAYLAYAN A., , *Application of the microwave-assisted process (MAPTMTM) to the fast extraction of ginseng saponins.* . Food research international, 2003. **36**: p. 491-498.
22. LAMARQUE A., M.D., P 51., *Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica*, ed. G.E. ENCUESTRO. 2008, Argentina.
23. HEMWIMOL S., P.P., SHOTIPRUK A., *Ultrasound-assisted extraction of antraquinones from roots of morinda citrifolia.* Ultrasonics sonochemistry., 2006. **12**: p. 543-548.

## ANEXOS

### ANEXO I PROTOCOLO TOMA DE MUESTRA DE BAGAZO

**Objetivo:** Recoger muestra de bagazo húmedo generado durante el beneficio del fique.

#### MATERIALES

- Nevera de icopor
- Hielo
- Alcohol al 70%
- Tiras reactivas de pH
- Guantes de látex
- Bolsa plástica con cierre
- Cinta de enmascarar
- Marcadores permanentes

#### PROCEDIMIENTO

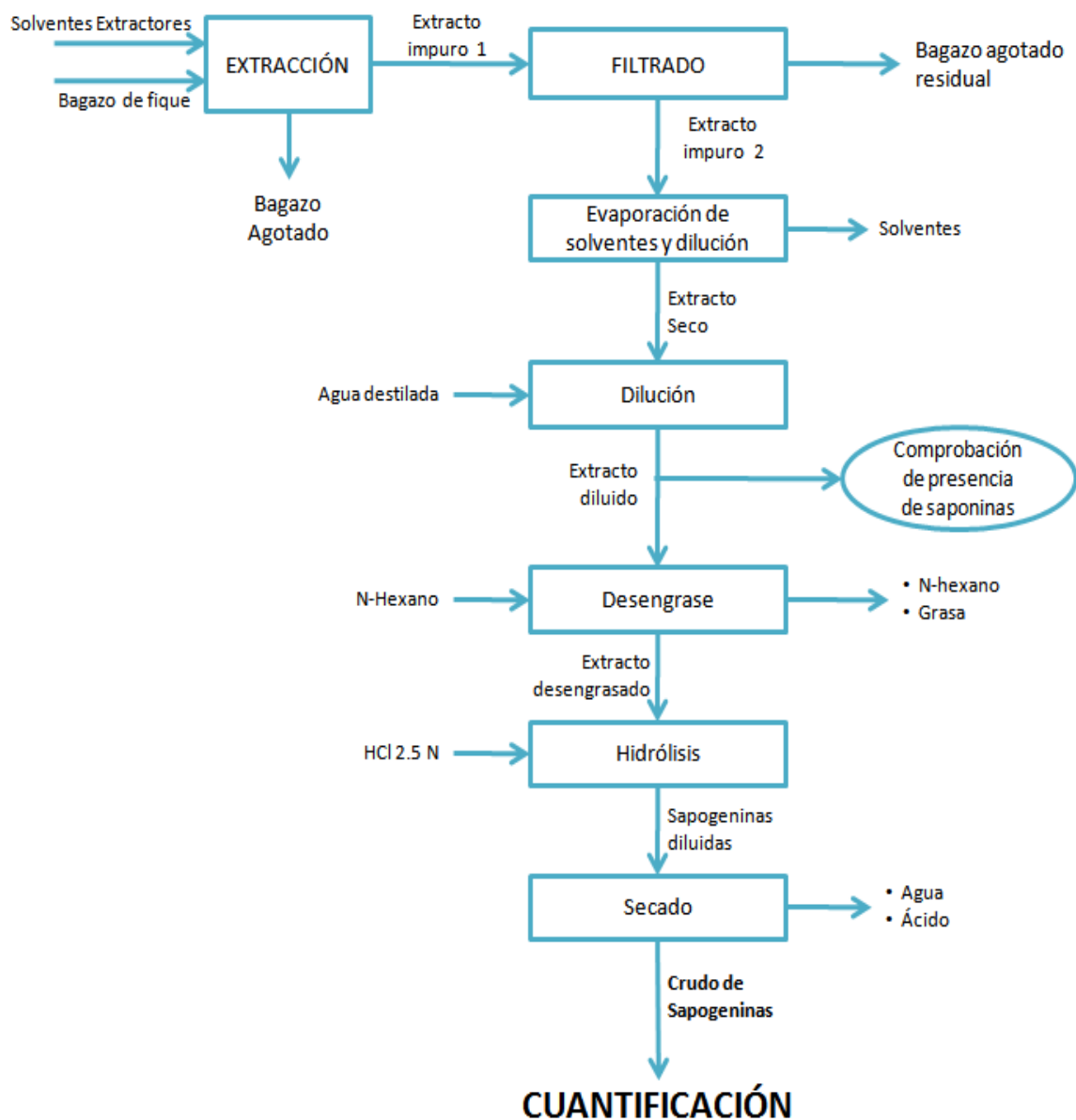
Escoger hojas de fique en las que no se observen daños ocasionados por alguna clase de microorganismo o este lacerada.

1. Limpiar la máquina desfibradora de hojas de fique, con alcohol al 70% antes de proceder a tomar la muestra del bagazo.
2. Solicitar al manipulador de la máquina que comience la operación del desfibrado de la hoja de fique. Descartar la primera fracción expulsada del bagazo, tomar la fracción del medio igualmente descartar la última parte.
3. Llenar la totalidad de las bolsas de la toma muestra, sin dejar espacios de aire, medir pH y cerrar inmediatamente.
4. Llevar la nevera de icopor con hielo, las bolsas con las muestras, debidamente cerrados y rotulados.
5. Conservar refrigerado hasta su uso.

**Nota:** Rotular todas las muestras con nombre del lugar y fecha de la toma de muestra.

## ANEXO II DIAGRAMA DE PROCESO

El siguiente diagrama corresponde al proceso que se desarrolló en el laboratorio para obtener el crudo de saponinas.



### ANEXO III MATRIZ DE EXPERIMENTOS REALIZADOS

La siguiente tabla corresponde a la descripción del total de los experimento que se realizaron en el laboratorio para las extracciones ejecutadas con el método soxhlet.

Id.		Sistema de solventes	Relación solvente-sólido	Tiempo (h)
1	1	Metanol/Agua 35-65	14	8
	2			
2	1	Metanol/Agua 35-65	14	4
	2			
3	1	Metanol/Agua 35-65	7	8
	2			
4	1	Metanol/Agua 35-65	7	4
	2			
5	1	Metanol/Agua 60-40	14	8
	2			
6	1	Metanol/Agua 60-40	7	8
	2			
7	1	Metanol/Agua 60-40	14	4
	2			
8	1	Metanol/Agua 60-40	7	4
	2			
9	1	Butanol/Etanol 30-70	7	8
	2			
10	1	Butanol/Etanol 30-70	14	8
	2			
11	1	Butanol/Etanol 30-70	7	4
	2			
12	1	Butanol/Etanol 30-70	14	4
	2			
13	1	Butanol/Etanol 50-50	7	8
	2			
14	1	Butanol/Etanol 50-50	14	8
	2			
15	1	Butanol/Etanol 50-50	7	4
	2			
16	1	Butanol/Etanol 50-50	14	4
	2			

La tabla posterior muestra la descripción del total de los experimentos desarrollados por el método EAU (extracción asistida por ultrasonido).

<b>Id.</b>	<b>Sistema de solventes</b>	<b>Relación solvente-sólido</b>	<b>Tiempo (h)</b>	
1	Metanol/Agua 35-65	7	1	
				1
				2
2	Metanol/Agua 60-40	7	1	
				1
				2
3	Metanol/Agua 35-65	14	1	
				1
				2
4	Metanol/Agua 60-40	14	1	
				1
				2
5	Metanol/Agua 35-65	7	2	
				1
				2
6	Metanol/Agua 60-40	7	2	
				1
				2
7	Metanol/Agua 35-65	14	2	
				1
				2
8	Metanol/Agua 60-40	14	2	
				1
				2
9	Butanol/Etanol 50-50	14	1	
				1
				2
10	Butanol/Etanol 30-70	14	1	
				1
				2
11	Butanol/Etanol 50-50	7	1	
				1
				2
12	Butanol/Etanol 30-70	7	1	
				1
				2
13	Butanol/Etanol 50-50	14	2	
				1
				2
14	Butanol/Etanol 30-70	14	2	
				1
				2
15	Butanol/Etanol 50-50	7	2	
				1
				2
16	Butanol/Etanol 30-70	7	2	
				1
				2

## ANEXO IV PROTOCOLOS DE METODOLOGÍA

### EXTRACCION DE SAPONINAS ASISITIDA POR ULTRASONIDO

**Objetivo:** Extraer la mayor cantidad de saponinas presentes en los desechos del beneficio del fique.

#### **Materiales y Reactivos:**

- Baño de ultrasonido ELMASONIC E30H.
- Balanza analítica Precisa XB220A.
- Tubos FALCON de 50 ml.
- Metanol grado analítico.
- Etanol grado analítico.
- N-butanol grado analítico.
- Agua destilada.
- Termómetro.

#### **Procedimiento**

1. Se pesa la muestra de bagazo de fique a trabajar (2,5 o 5 gramos).
2. Se mezcla la proporciones de disolvente según disponga el experimento(metanol-agua, etanol-n-butanol).
3. Se mezcla en un tubo Falcón la muestra con la cantidad disolvente según la relación (7, 14 ml/g) especificada para el experimento.
4. Se sumergen los tubos FALCON en el baño de ultrasonido.
5. Se inicia la irradiación ultrasónica a 37 KHz y 250 W.
6. Se mantiene la irradiación según los tiempos determinados (1 o 2 horas) controlando que la temperatura no exceda los 50 °C.
7. Terminada la irradiación Se procede a filtrar al vacío.

## FILTRADO AL VACÍO

**Objetivo:** Retirar la materia sólida contenida en los extractos.

### **Materiales y Reactivos:**

- Bomba de vacío Thomas modelo 1130.
- Papel de filtro cuantitativo franja negra.
- Erlenmeyer con salida lateral para vacío.
- Agua destilada o solución de etanol-H<sub>2</sub>O.
- Embudo Buchner.
- Varilla de vidrio

### **Procedimiento**

1. Se ensambla el embudo Buchner con el papel de filtro en el Erlenmeyer y se le conecta la bomba de vacío.
2. Se enciende la bomba.
3. Con la ayuda de una varilla sobre la boca del recipiente contenedor de la muestra se sirve lentamente sobre el embudo.
4. Se lava 4 veces o más con agua destilada o solución de etanol según los solventes.

## EVAPORACIÓN DE SOLVENTES Y DILUCIÓN

**Objetivo:** Retirar los solventes de los extractos para obtener soluciones de saponinas diluidas en agua.

### **Materiales y Reactivos:**

- Estufa convencional.
- Recipientes de vidrio resistentes al calor.

- Probeta.
- Agua destilada.
- Varilla de vidrio.

### **Procedimiento**

5. Los extractos filtrados se colocan en los frascos de vidrio.
6. Se llevan a la estufa a una temperatura no superior a 60 °C hasta sequedad.
7. Luego de secos se agregan 250 ml de agua destilada para los extractos soxhlet y 100 ml para los extractos de ultrasonido con el fin de diluir las saponinas secas que quedan adheridas en los recipientes de vidrio.
8. Agitar vigorosamente con una varilla de vidrio hasta diluir por completo.

### **ELIMINACION DE CONTENIDOS LIPIDICOS (DESENGRASE)**

**Objetivo:** Retirar Los extractos lipídicos presentes en las extracciones de los desechos del beneficio del fique.

#### **Materiales y Reactivos:**

- Embudo de decantación de 100 ml con tapa.
- Soporte universal.
- Recipientes de vidrio de 50 ml con tapa.
- Nuez.
- pinza.
- Hexano grado analítico.
- Contenedor de residuos.

## **Procedimiento**

8. Se procede a hacer el montaje del soporte universal con la nuez y la pinza donde se ensamblara el embudo de decantación.
9. Se miden 25 ml del extracto diluído.
10. Se mezclan el compuesto con igual cantidad de n-hexano en el embudo de decantación.
11. En el embudo se agita y se expulsan los gases producidos.
12. Posteriormente se deja en reposo por un tiempo de media hora.
13. Pasado este tiempo se observar tres fases, la fase inferior que es libre de grasas es transferida a los recipientes de vidrio de 50 ml.
14. Las dos fases superiores que se asumen como desechos se transfieren al contenedor de residuos.
15. Los recipientes de vidrio con muestra libre de grasa son rotulados y almacenados para su posterior hidrólisis.

## **HIDROLISIS**

**Objetivo:** mediante la hidrólisis acida romper los enlaces glicosídicos de las saponinas para obtener sapogeninas.

### **Materiales y Reactivos:**

- Balón aforado de fondo plano de 100 ml.
- Condensador.
- Soporte universal.
- Plancha de calentamiento con agitación.
- Agitador magnético.
- Recipientes de vidrio de 100 ml con tapa.

- Nuez.
- pinza.
- HCl al 2.5 N.

### **Procedimiento**

1. Se procede a hacer el montaje del soporte universal con la nuez y la pinza donde se ensamblara el balón con la muestra.
2. Se pasa la muestra desengrasada al balón aforado de 100 ml.
3. Se mezclan cantidades iguales de solución ácida y muestra desengrasada.
4. Se introduce el agitador y se procede a adaptar el condensador.
5. Se ensambla sobre el montaje del paso uno con la plancha de calentamiento.
6. Se mantiene calentando y agitando por un tiempo de 4 horas.
7. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente, se debe observar un precipitado color marrón correspondiente a las sapogeninas.
8. Se prosigue a transferir el resultado a los recipientes de vidrio de 100 ml.
9. Los recipientes se rotulan y almacenan.

## ANEXO V PROTOCOLO COMPROBACIÓN DE PRESENCIA DE SAPONINAS

### Prueba De Fragilidad Osmótica

#### Reactivos:

Preparar las Soluciones de trabajo, Diluyendo la cantidad necesaria de la solución madre de saponinas en 100 ml, con agua destilada de acuerdo con la siguiente tabla:

1:10	1:40
1:20	1:50
1:30	1:60

#### Procedimiento:

- Colocar 5 ml de cada una de las concentraciones anteriores en tubos de ensayo, adicionar 0.02 ml de sangre anticoagulada (EDTA, heparina, defibrinada) y mezclar.
- Dejar en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Mezclar y centrifugar a 3000 gravedades por 10 minutos.
- Leer la absorbancia de cada uno de los sobrenadantes a 540 nm, utilizando como blanco el sobrenadante del tubo el sobrenadante de un tubo con solución salina 0.85% y glóbulos rojos, y como 100% el sobrenadante de un tubo con una solución de NaCl 0.10% y glóbulos rojos.

Patrón: Absorbancia tubo de 0.10 de NaCl (100% hemólisis)

Blanco: Absorbancia tubo de 0.85 de NaCl (0% hemólisis)

#### Cálculos:

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{\text{Ab sobrenadante de cada tubo} \times 100}{\text{Ab sobrenadante del tubo 100\% (0.10)}}$$

### **Resultados:**

Elaborar una curva de fragilidad osmótica completa con los resultados obtenidos de la muestra procesada en el laboratorio. Analice los resultados y compárelos.

### **Bibliografía:**

- Angulo Ugalde, Y. Bioquímica Manual de Laboratorio. Universidad de Costa Rica. 1999
- Nelson D.L y Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman and Company, NY. Cuarta edición, 2005

### **Ensayo de Espuma**

Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Es una prueba presuntiva de la presencia de saponinas esteroides.

### **Materiales**

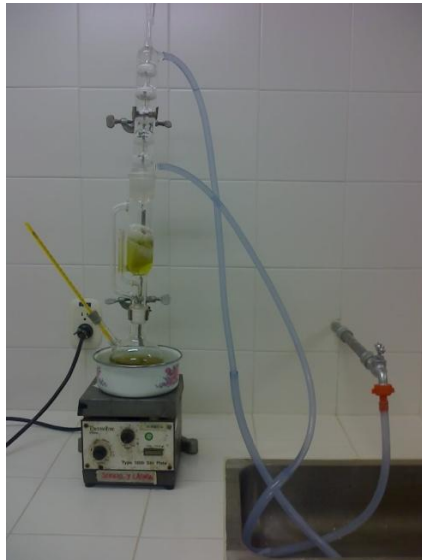
- Tubos de ensayo
- Pipeta
- Pipeteador
- Regla
- Cronometro

### **Procedimiento**

- Medir con la pipeta cinco (5) mililitros del extracto.
- Depositar los 5 ml de extracto en un tubo de ensayo.
- Agitar manualmente durante treinta (30) segundos el tubo de ensayo.
- Medir con la regla la longitud de espuma producida.

**Bibliografía:** MARTÍNEZ A, (2001) Saponinas Esteroides. Universidad de Antioquia. Facultad de química Farmacéutica.

## ANEXO VI FOTOGRAFÍAS DEL PROCESO



Extracción Soxhlet



Extracción asistida por ultrasonido



Filtración al vacío



Evaporación de solventes



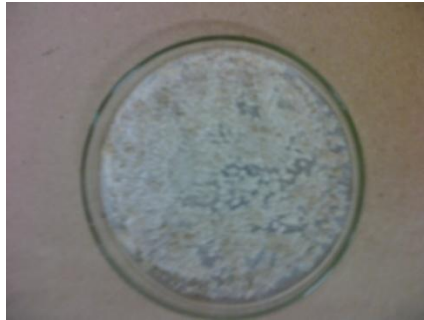
Dilució

n



Desengras

e



Secado

## ANEXO VII GRAFICAS DE CURVAS DE FRAGILIDAD OSMÓTICA

Las figuras presentadas a continuación corresponden a las curvas de fragilidad osmótica que se realizaron a algunos de los extractos diluïdos.

