

**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS A PARTIR DEL AJO  
MACHO (*Allium sativum*) UTILIZANDO TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN VERDES**



**YANETH CAMILA CEBALLOS GÜENGUE**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2022**

**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS A PARTIR DEL AJO  
MACHO (*Allium sativum*) UTILIZANDO TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN VERDES**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Química

**YANETH CAMILA CEBALLOS GÜENGUE**

Director

**FERNANDO JOSÉ HERNÁNDEZ BLANCO, Ph.D.**  
PROFESOR ASOCIADO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Asesor

**JUAN CARLOS ARGOTI BURBANO, Ph.D.**  
PROFESOR TITULAR DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2022**

## Nota de aceptación

---

---

---

---

Asesor: \_\_\_\_\_

Fernando José Hernández Blanco, Ph.D.

Jurado: \_\_\_\_\_

Danny Alejandro Arteaga Fuertes, Ph.D.

Jurado: \_\_\_\_\_

Clara Inés Hurtado Sánchez, MSc

Lugar y fecha de sustentación: Popayán, 20 de octubre de 2022

## Dedicatoria

A mi madre, Olga Lucía Güengue, quien ha sido mi mayor motivación para culminar mi trabajo de investigación; por enseñarme a enfrentar la vida y sus altibajos con determinación, por acompañarme con amor y paciencia durante este proceso y por los sacrificios que ha hecho para que yo pueda alcanzar hoy mi sueño de ser profesional.

*“La permanencia, perseverancia y persistencia a pesar de todos los obstáculos, desalientos e imposibilidades: es eso lo que distingue las almas fuertes de las débiles”.*

*Thomas Carlyle*

## **Agradecimientos**

A Dios, por darme vida y salud para poder terminar mi trabajo de investigación y poder estar hoy escribiendo estas palabras.

Al Doctor Fernando Hernández, mi director, por sus consejos y aportes en este trabajo de investigación. Le doy gracias por la confianza depositada en mí, por su dedicación y su apoyo.

Al Doctor Juan Carlos Argoti por su asesoría y sus enseñanzas a lo largo de mi proceso investigativo y por la motivación brindada.

Al grupo de investigación de Química de Compuestos Bioactivos QCB por abrirme sus puertas para llevar a cabo mi trabajo de investigación en su laboratorio, particularmente al Doctor Fabio Cabezas por invitarme a hacer parte del grupo y a mi compañero Sebastian López por su valiosa colaboración en la etapa experimental de este trabajo.

A la Unidad de Análisis Industriales por facilitarme los equipos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Al Doctor Danny Arteaga por el préstamo de material, equipos e instalaciones de los laboratorios de docencia.

Al grupo de investigación de Química de Productos Naturales y al de Agroquímica, por el préstamo de los equipos de microondas, espectrofotómetro UV-Vis y estufa.

A mi mamá, Lucía y a mis hermanas, Laura e Isabel, quienes han sido el motor de mi vida y mi motivación para terminar mi trabajo de investigación. Les doy los más especiales agradecimientos por su comprensión, por estar conmigo en cada momento, por respaldar mis decisiones y por su gran apoyo moral y económico.

A Cristhian Portela, por creer en mí todas las veces que yo no creí en mí misma. Por motivarme a conseguir lo mejor para mi futuro superando los obstáculos que me puso la vida en esta etapa decisiva de mi carrera y por ser para mí un ejemplo de perseverancia y superación.

A los amigos que me dejó la carrera, Diana, Pedro, Alejandra y Lorena, gracias por las risas y las locuras y también por animarme a seguir adelante en los momentos en que me sentí desalentada por las dificultades. Gracias por tantos años de amistad.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	XII
ABSTRACT .....	XIII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	2
2.1 Género <i>Allium</i> .....	2
2.1.1 <i>Allium sativum</i> .....	2
2.2 Técnicas de extracción de saponinas .....	8
2.2.1 Extracciones convencionales .....	9
2.2.2 Extracciones verdes .....	9
2.3 Identificación y cuantificación de saponinas .....	15
2.3.1 Identificación de saponinas .....	15
2.3.2 Cuantificación de saponinas .....	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	17
4. OBJETIVOS .....	18
4.1 Objetivo general .....	18
4.2 Objetivos específicos .....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
5.1 Material vegetal .....	19
5.2 Establecimiento de diseños experimentales .....	20
5.2.1 Diseño experimental factorial $2^3$ para extracción de saponinas mediante extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas .....	20
5.2.2 Diseño experimental $2^2$ para extracción de saponinas mediante dispersión de matriz en fase sólida .....	20
5.3 Extracción de saponinas asistida por ultrasonido (EAU) .....	21
5.4 Extracción de saponinas asistida por microondas (EAM) .....	21
5.5 Extracción de saponinas por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) .....	22
5.6 Fraccionamiento de extractos mediante extracción líquido-líquido (ELL) .....	22
5.7 Cuantificación de saponinas totales .....	23
5.8 Tamizaje fitoquímico .....	24
5.8.1 Determinación de alcaloides .....	24
5.8.2 Determinación de cardiotónicos .....	24

5.8.3 Determinación de cumarinas volátiles .....	25
5.8.4 Determinación de flavonoides.....	25
5.8.5 Determinación de taninos.....	25
5.8.6 Determinación de saponinas.....	26
5.8.7 Determinación de triterpenos y/o esteroides .....	26
5.8.8 Determinación de derivados antracénicos libres.....	26
5.9 Análisis estadístico .....	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
6.1 Determinación de contenido de humedad del ajo macho .....	27
6.2 Cuantificación de saponinas totales extraídas.....	27
6.3 Diseño experimental factorial $2^3$ .....	28
6.4 Diseño experimental factorial $2^2$ .....	33
6.5 Comparación de contenido de saponinas de ajo macho con otras variedades .....	36
6.6 Tamizaje fitoquímico.....	37
7. CONCLUSIONES.....	42
8. RECOMENDACIONES .....	43
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
10. ANEXOS .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>CL</b>	Cromatografía Líquida
<b>CLAR</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>DMFS</b>	Dispersión de Matriz en Fase Sólida
<b>EAM</b>	Extracción Asistida por Microondas
<b>EAU</b>	Extracción Asistida por Ultrasonido
<b>EET</b>	Extracto Etanólico Total
<b>ELL</b>	Extracción Líquido-Líquido
<b>EM</b>	Espectrometría de Masas
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>Exp</b>	Experimento
<b>IES</b>	Ionización por Electrospray
<b>g</b>	Gramo
<b>mg</b>	Miligramo
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>QCB</b>	Química de Compuestos Bioactivos
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
<b><sup>13</sup>C-RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visible
<b>W</b>	Watts



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Algunos compuestos organosulfurados presentes en el ajo .....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura química del oxidoescualeno, precursor de las agliconas de las saponinas .....	4
<b>Figura 3.</b> Estructura general de una saponina.....	5
<b>Figura 4.</b> Estructura química de agliconas: (a) aglicona de la dioscina, saponina esteroideal; (b) aglicona del ácido oleanólico, saponina triterpenoide. ....	5
<b>Figura 5.</b> Algunas posibles estructuras de agliconas de saponinas (Moghimipour & Handali, 2015) .....	6
<b>Figura 6.</b> Estructura de saponinas determinada por Ma y colaboradores. Glc: glucosa. Xyl: xilosa (Ma et al., 2011). ....	7
<b>Figura 7.</b> Algunas estructuras de sapogeninas y saponinas reportadas en <i>Allium sativum</i> . a: $\beta$ -clorogenina. b: erubósido B. c: sativósido R1. d: voghiosido D1.....	8
<b>Figura 8.</b> Formación de burbujas de cavitación en la EAU.....	10
<b>Figura 9.</b> Polarización y relajación de dipolos de acuerdo al campo eléctrico.....	13
<b>Figura 10.</b> Preparación de bulbos de ajo para secado. A. Bulbos con cáscara; B. Bulbos pelados; C. Bulbos preparados para secado en estufa. ....	19
<b>Figura 11.</b> Representaciones de los diseños experimentales, a: $2^3$ ; b: $2^2$ .....	21
<b>Figura 12.</b> Montajes de cada extracción, a: EAU; b: EAM; c: DMFS.....	23
<b>Figura 13.</b> Ajo seco para extracción de saponinas .....	27
<b>Figura 14.</b> Barrido para determinación de longitud de onda de máxima absorción.....	28
<b>Figura 15.</b> Curva de calibración para cuantificación de saponinas .....	28
<b>Figura 16.</b> Diagrama de Pareto para el diseño experimental factorial $2^3$ .....	30
<b>Figura 17.</b> Gráfica de efectos principales para el diseño experimental factorial $2^3$ .....	30
<b>Figura 18.</b> Gráfica normal de efectos estandarizados para el diseño experimental $2^3$ .....	32
<b>Figura 19.</b> Gráfica de interacciones entre las variables del diseño experimental $2^3$ .....	32
<b>Figura 20.</b> Diagrama de Pareto del diseño experimental factorial $2^2$ .....	34
<b>Figura 21.</b> Gráfica de efectos principales en el diseño experimental factorial $2^2$ .....	35
<b>Figura 22.</b> Gráfica normal de efectos estandarizados para diseño experimental $2^2$ .....	35
<b>Figura 23.</b> Gráfica de interacciones en el diseño experimental factorial $2^2$ .....	36
<b>Figura 24.</b> Resultados de las diferentes pruebas colorimétricas en el tamizaje fitoquímico de EET de bulbos de ajo macho. B: blanco. M: muestra.....	38

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación botánica del ajo (Alam et al., 2016) .....	3
<b>Tabla 2.</b> Variables y niveles a evaluar en EAU y EAM. ....	20
<b>Tabla 3.</b> Variables y niveles a evaluar en extracción por DMFS. ....	21
<b>Tabla 4.</b> Pruebas realizadas en el tamizaje fitoquímico del EET del bulbo de ajo.....	25
<b>Tabla 5.</b> Resultados del diseño experimental factorial $2^3$ para la extracción y cuantificación de saponinas totales de ajo macho.....	29
<b>Tabla 6.</b> ANOVA del diseño experimental factorial $2^3$ para extracción de saponinas.....	29
<b>Tabla 7.</b> Resultados de diseño experimental $2^2$ para extracción de saponinas .....	33
<b>Tabla 8.</b> ANOVA del diseño experimental factorial $2^2$ para extracción de saponinas.....	33
<b>Tabla 9.</b> Resultados del tamizaje fitoquímico preliminar del EET de bulbos de ajo macho .....	37

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Reactivos y materiales de laboratorio utilizados .....	50
<b>Anexo 2.</b> Equipos de laboratorio utilizados .....	50
<b>Anexo 3.</b> Masas de muestras utilizadas en cada uno de los experimentos (Exp) para las extracciones planteadas por los diseños experimentales .....	51
<b>Anexo 4.</b> Datos curva de calibración con reactivo de saponinas en espectrofotómetro UV-Vis.....	51
<b>Anexo 5.</b> Datos de absorbancias de muestras en extracciones de diseño experimental factorial $2^3$ .....	52
<b>Anexo 6.</b> Datos de absorbancias de muestras en extracciones de diseño experimental factorial $2^2$ para las muestras cuantificadas por curva de calibración .....	52
<b>Anexo 7.</b> Datos de absorbancias de muestras en extracciones de diseño experimental factorial $2^2$ para las muestras cuantificadas por adición estándar .....	53

## RESUMEN

El ajo (*Allium sativum*) es una de las especies vegetales más antiguas, a la que se han atribuido diversas propiedades medicinales, las cuales se deben a los nutrientes esenciales que posee, así como a su composición de metabolitos secundarios, entre los que se destacan los tiosulfatos, los compuestos más conocidos y estudiados en esta especie. Sin embargo, otros metabolitos como las saponinas también contribuyen a los efectos beneficiosos mostrados por el ajo y poseen una gran variedad de potenciales aplicaciones en la investigación y la industria; a pesar de ello, los estudios acerca de dichos compuestos en el ajo son escasos y mucho más en variedades como el ajo macho, un tipo de ajo muy popular en el departamento del Cauca, del cual no se ha reportado hasta el momento ninguna investigación.

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo la extracción de saponinas totales presentes en el bulbo de ajo macho mediante tres técnicas de extracción verdes, siendo estas la extracción asistida por ultrasonido (EAU), por microondas (EAM) y por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS), aplicando dos diseños experimentales factoriales que permitieron obtener contenidos de saponinas totales entre 6,292 – 102,4 mg/g al emplear la extracción asistida por ultrasonido; 5,818 – 76,97 mg/g al utilizar la extracción asistida por microondas y 0,7910 – 58,58 mg/g al utilizar la dispersión de matriz en fase sólida.

Mediante los diseños experimentales se evaluó el efecto de las variables de extracción y sus interacciones sobre el contenido de saponinas totales extraído, siendo las variables del primer diseño la relación de solvente etanol (50 % y 90 %) y el tiempo de extracción (12 min y 30 min) con las técnicas EAU y EAM; la técnica DMFS se empleó en el segundo diseño, evaluando en este las variables tipo de fase (sílica C<sub>18</sub> y sílica gel) y de solvente (diclorometano y metanol), encontrando que la variable con mayor efecto es el solvente de extracción; siendo más favorable el uso de solventes de carácter polar (etanol 50 % en lugar de etanol 90 % en el primer diseño experimental y metanol en lugar de diclorometano en el segundo diseño experimental). Además, se estableció que las mejores condiciones para obtener el mayor contenido de saponinas totales del ajo macho son la relación de solvente etanol 50 %, un tiempo de extracción de 30 minutos, usando la técnica de extracción asistida por ultrasonido.

También se realizó el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total del bulbo de ajo macho, estableciendo mediante pruebas colorimétricas cualitativas la presencia de saponinas, alcaloides y triterpenos o esteroides, metabolitos secundarios de gran importancia y con diversas aplicaciones.

**Palabras clave:** *Allium sativum*, ajo macho, saponinas, extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, dispersión de matriz en fase sólida, diseño experimental, tamizaje fitoquímico.

## ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum*) is one of the oldest plant species, to which various medicinal properties have been attributed, which are due to the essential nutrients it possesses, as well as to its composition of secondary metabolites, among which thiosulfates are the most known and studied compounds in this species. However, other metabolites such as saponins also contribute to the beneficial effects shown by garlic and have a great variety of potential applications in research and industry; in spite of this, studies on these compounds in garlic are scarce and even more so in varieties such as macho garlic, a very popular type of garlic in the department of Cauca, of which no research has been reported so far.

In the present research work, the extraction of total saponins present in the bulb of macho garlic was carried out by means of three green extraction techniques, namely ultrasound-assisted extraction (UAE), microwave assisted extraction (MAE) and matrix solid phase dispersion (MSPD), applying two factorial experimental designs that allowed obtaining total saponin contents between 6,292 – 102,4 mg/g when using the ultrasound-assisted extraction; 5,818 – 76,97 mg/g when using microwave-assisted extraction and 0,7910 – 58,58 mg/g when using solid-phase matrix dispersion.

The experimental designs were used to evaluate the effect of the extraction variables and their interactions on the total saponin content extracted, the first design variables being the ethanol solvent ratio (50 % and 90 %) and the extraction time (12 min and 30 min) with the UAE and MAE techniques; the MSPD technique was used in the second design, evaluating in this one the variables type of phase (C<sub>18</sub> silica and silica gel) and solvent (dichloromethane and methanol), showing that the variable with the highest effect is the extraction solvent; the use of polar solvents was more favorable (ethanol 50 % instead of ethanol 90 % in the first experimental design and methanol instead of dichloromethane in the second experimental design). In addition, it was established that the best conditions to obtain the highest content of total saponins from macho garlic are the solvent ratio ethanol 50 %, an extraction time of 30 minutes, using the ultrasound-assisted extraction technique.

The phytochemical screening of the total ethanolic extract of macho garlic bulb was also performed, establishing by means of qualitative colorimetric tests the presence of saponins, alkaloids and triterpenes or steroids, secondary metabolites of great importance and with diverse applications.

**Key words:** *Allium sativum*, macho garlic, saponins, ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction, solid-phase matrix dispersion, experimental design, phytochemical screening.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde siempre, el ser humano ha recurrido a la naturaleza para aprovechar sus recursos en diferentes ámbitos de la vida: fabricar su vivienda y vestido, obtener su alimentación y la de su grupo, buscar formas de tratar las dolencias que le aquejan; como prueba de esto, se ha encontrado que ya en la antigüedad se reportaba el uso de diversas especies vegetales en formulaciones terapéuticas para tratar enfermedades, de manera relativamente exitosa. Entre dichas especies se encuentra el ajo (*Allium sativum*), destacado ya en Egipto desde 1.550 A.C. por sus propiedades medicinales contra problemas cardíacos, dolores de cabeza y tumores (Alam et al., 2016); también, durante los antiguos juegos olímpicos en Grecia se administraba ajo a los atletas con el fin de aumentar su resistencia; en la antigua medicina china e india se recomendaba el ajo para ayudar a la respiración, la digestión y para curar parásitos y la lepra; de igual forma, en el periodo medieval era utilizado para tratar diversas enfermedades y sus propiedades benéficas tuvieron gran atención durante el Renacimiento en Europa (Ajami & Vazirijavid, 2019).

Más recientemente, se han realizado estudios e investigaciones enfocados hacia la caracterización de los compuestos presentes en distintas variedades del ajo y la evaluación de su actividad biológica potencial. Además de los compuestos azufrados, que son los metabolitos más estudiados en esta y otras especies pertenecientes al género *Allium*, se destacan las saponinas, a las que se les atribuyen muchos efectos beneficiosos, con potenciales aplicaciones en áreas como la medicina, con fines farmacológicos y farmacéuticos debido a sus propiedades anticancerígenas (Yu et al., 2015), antioxidantes (Kang et al., 2016), citotóxicas (Podolak et al., 2010), entre otras; también su propiedad insecticida hace posible su aplicación en control de plagas (Singh & Kaur, 2018); de igual forma, son utilizadas en la industria cosmética, por su propiedad de detergente (Chaieb, 2010).

En Colombia, uno de los países más biodiversos del mundo, se producen comercialmente algunas variedades de ajo; particularmente en algunas regiones del departamento del Cauca se cultiva y comercializa una variedad conocida popularmente como ajo macho, que se caracteriza porque su bulbo, la parte comestible de la planta, está compuesto por un solo diente grande, a diferencia del ajo que se consume comúnmente, cuyo bulbo está dividido en varios dientes. A pesar de la gran acogida que esta variedad tiene en la comunidad en general, no se han realizado investigaciones enfocadas en aspectos químicos y biológicos de la misma, por lo que se desconoce su composición de metabolitos secundarios como las saponinas, así como técnicas adecuadas para su extracción y posterior análisis.

Debido a la escasez de información sobre el ajo macho y al potencial que la planta tiene debido a sus compuestos bioactivos como las saponinas, por las interesantes aplicaciones que estos metabolitos tienen en la medicina y la industria, surge este trabajo de investigación en el que se va a llevar a cabo la aplicación de tres técnicas verdes tales como la extracción asistida por ultrasonido, la extracción asistida por microondas y la dispersión de matriz en fase sólida, para la extracción de las saponinas, y su cuantificación mediante espectrofotometría de ultravioleta-visible en bulbos de ajo (*Allium sativum*) cultivados en la región de Totoró, Cauca.

## 2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

A lo largo de esta sección se hará mención del contexto que enmarca esta investigación, iniciando con una breve descripción género *Allium*, se presenta la clasificación botánica del ajo y algunas de sus propiedades químicas y biológicas, relacionadas a los metabolitos secundarios que este posee; a continuación, se detallan las características estructurales de las saponinas, su presencia en diferentes especies y su actividad biológica y aplicaciones, pasando enseguida a describir las técnicas verdes a aplicar en la extracción de las saponinas de ajo macho y las variables a considerar en cada técnica, mencionando también los resultados de diferentes estudios donde se extrajeron las saponinas de diferentes fuentes vegetales o animales mediante dichas técnicas y finalmente se presentan algunas alternativas para la identificación y cuantificación de las saponinas.

### 2.1 Género *Allium*

Este género, perteneciente a la familia Amaryllidaceae, cuenta en Colombia con 18 géneros y 48 especies, de los cuales 11 géneros y 27 especies son nativos y de estas, 9 especies son endémicas (Alzate et al., 2019); la mayor diversidad de especies se puede encontrar en la cordillera Occidental y Oriental y en los departamentos de Cauca, Valle y Cundinamarca. Dichas especies comúnmente reciben usos alimenticios, medicinales y ornamentales (Alzate et al., 2019).

De todos los géneros pertenecientes a la familia Amaryllidaceae, el *Allium* es de los más fascinantes, con mayor diversidad e importancia por su antigüedad y por el gran número de estudios que se han llevado a cabo en las especies que lo conforman. Es también uno de los géneros con mayor número de especies vegetales comestibles y con propiedades medicinales determinadas en diferentes investigaciones; estas propiedades se atribuyen a los metabolitos secundarios que poseen dichas especies. Entre las más populares se encuentran *A. cepa*, *A. sativum*, *A. ascalonicum*, *A. porrum*, y *A. schoenoprasum* (Sabiú et al., 2019). Las especies del género *Allium* pueden variar en cuanto a su forma o su sabor, en el caso de las comestibles, pero se encuentran estrechamente relacionadas en cuanto a su contenido bioquímico y fitoquímico (Sabiú et al., 2019).

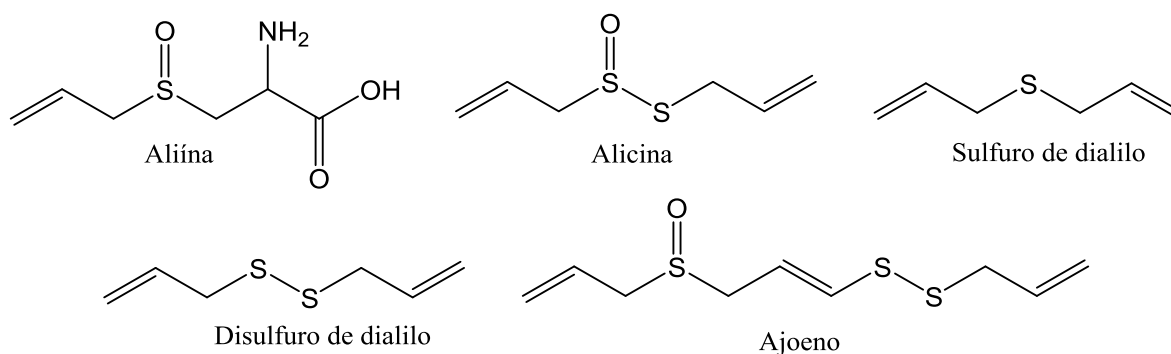
#### 2.1.1 *Allium sativum*

Es una de las especies más antiguas en ser cultivada; se cree que se cultivó por primera vez en Asia central y se extendió por el mundo, siendo usada histórica y tradicionalmente como condimento, alimento y medicina por más de 4000 años (Alam et al., 2016); a través de la historia, desde siglos antes de Cristo hasta tiempos modernos, el ajo ha sido recomendado para tratar diferentes enfermedades; se sabe que incluso ya era considerado medicinal en las civilizaciones Sumeria y Egipticia antigua (Ajami & Vazirijavid, 2019). Junto con la cebolla (*Allium cepa*) son las especies pertenecientes al género *Allium* más ampliamente utilizadas tradicionalmente como remedio para afecciones como resfriados, influenza, hipertensión, etc. (Batiha et al., 2020). En la Tabla 1 se consigna la clasificación botánica del ajo.

**Tabla 1.** Clasificación botánica del ajo (Alam et al., 2016)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Superorden	Lilianaes
Orden	Asparagales
Familia	Amaryllidaceae
Género	<i>Allium</i>
Especie	<i>sativum</i>

El ajo posee un alto valor nutricional, uno de sus principales nutrientes es la vitamina C, sin embargo también contiene otras vitaminas y minerales en cantidades pequeñas pero útiles, como es el caso del selenio, cuyo contenido es 9 ppm mayor que casi la mayoría de los vegetales (Suleria et al., 2015). En cuanto a sus metabolitos secundarios, el ajo se caracteriza por la presencia de compuestos organosulfurados tales como el tiosulfonato de dialilo (alicina), el sulfuro de dialilo, el disulfuro de dialilo, el sulfóxido de S-alilcisteína (aliína) y el ajoeno (Figura 1), que son los compuestos más reconocidos y estudiados en esta especie y son los responsables de su olor y sabor propios, pero también se ha encontrado la presencia de otros tipos de metabolitos tales como las saponinas que cumplen una función defensiva dentro de la planta y también hacen un aporte a las diferentes actividades biológicas reportadas en la literatura para esta especie, entre las que se encuentran su capacidad anticarcinogénica, antioxidante, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica y antihipertensiva (Batiha et al., 2020); asimismo, se afirma que el consumo de ajo tiene efectos en la salud como la reducción de colesterol y triglicéridos séricos, previene la aterosclerosis, aumenta la actividad fibrinolítica, además de numerosos estudios que prueban su efecto benéfico en enfermedades cardiovasculares (Ajami & Vazirijavid, 2019).



**Figura 1.** Algunos compuestos organosulfurados presentes en el ajo

El ajo puede encontrarse en diferentes presentaciones, tales como el ajo seco o en polvo, el aceite de ajo que se obtiene comúnmente por arrastre de vapor, pero en general se adquiere y consume el ajo fresco (crudo) como condimento en la preparación de alimentos. En Colombia se cultivan y comercializan diferentes tipos de ajo, tales como el ajo blanco o el ajo morado; el ajo macho se encuentra casi exclusivamente en la región Cauca, donde es comercializado normalmente en plazas de mercado en Popayán, por indígenas



pertenecientes a la comunidad de los Misak o guambianos, quienes habitan principalmente en los municipios de Silvia y Totoró. El ajo macho es muy popular en esta región, pues es utilizado con fines esotéricos, casi tan común como los fines culinarios. Pero, a pesar de ser tan conocido, no se han realizado investigaciones que permitan determinar las propiedades químicas y biológicas que puede poseer, ni su composición de nutrientes y de metabolitos secundarios como las saponinas.

### 2.1.1.1 Saponinas

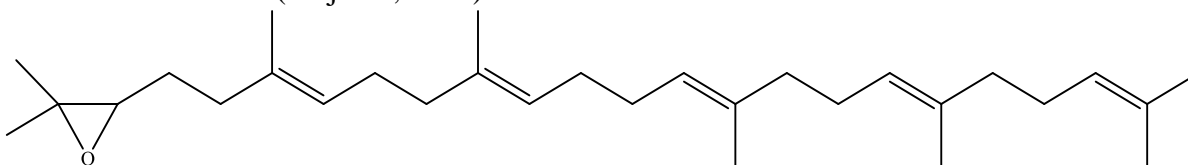
Dentro de la composición de metabolitos secundarios del ajo se pueden destacar las saponinas, compuestos escasamente estudiados en esta especie vegetal, los cuales poseen notables propiedades fisicoquímicas y biológicas que son de gran utilidad en diferentes áreas de la ciencia, la investigación y la industria.

Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, principalmente pero no exclusivamente en plantas; son importantes compuestos bioactivos considerados como los responsables de actividades observadas en las especies *Allium*, tales como antifúngica, citotóxica, inhibitoria de enzimas, entre otras (Sobolewska et al., 2016). En las plantas, estos compuestos actúan como una barrera química de defensa contra patógenos y herbívoros.

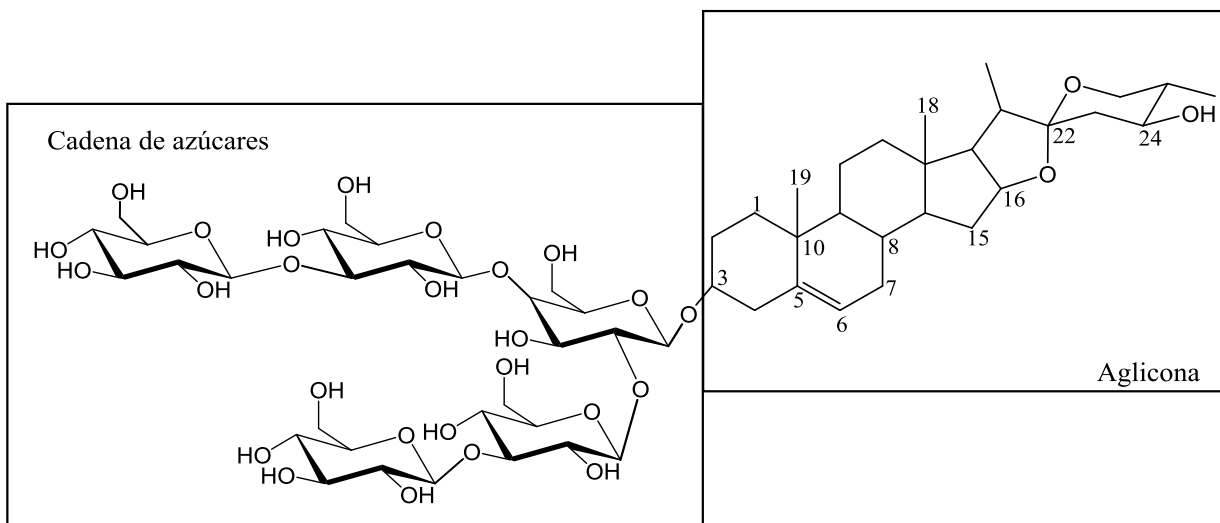
- 2.1.1.1.1 Estructura y clasificación

El nombre saponina proviene del latín “*sapo*” que significa “jabón”; al ser agitadas, las soluciones acuosas de saponinas generan espuma. Esta propiedad se la otorga su estructura anfipática, conformada por una parte apolar denominada aglicona, un esqueleto derivado del precursor de 30 carbonos denominado oxidoescualeno (Figura 2), el cual sufre una serie de reacciones de ciclación, aperturas de anillos epóxido y migraciones de hidruro y de grupos metilo hasta llegar a las estructuras policíclicas características de las agliconas, a las que se enlaza una parte polar correspondiente a uno o más monosacáridos, siendo los más comunes la D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-fucosa (Guclu-Ustundag & Mazza, 2007). En la Figura 3 se presenta la estructura general de una saponina.

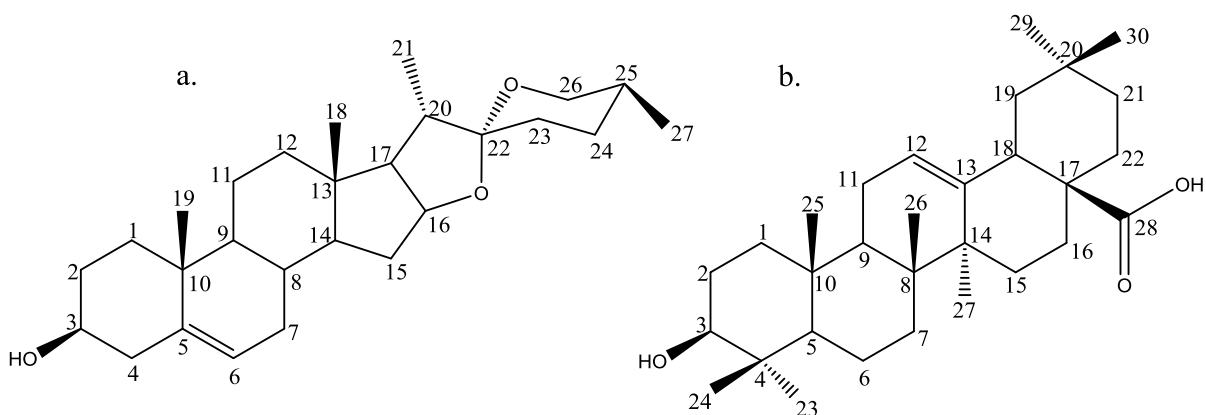
Las saponinas son moléculas con una gran diversidad estructural y comúnmente se clasifican como saponinas triterpenoides, las cuales conservan los 30 carbonos en su aglicona; y saponinas esteroidales, las cuales contienen 27 átomos de carbono en su aglicona, ya que han perdido tres grupos metilo (Figura 4) (Vincken et al., 2007). Por lo general, las saponinas presentan una alta polaridad, son no volátiles y son química y térmicamente lábiles (Majinda, 2012).



**Figura 2.** Estructura química del oxidoescualeno, precursor de las agliconas de las saponinas



**Figura 3.** Estructura general de una saponina.

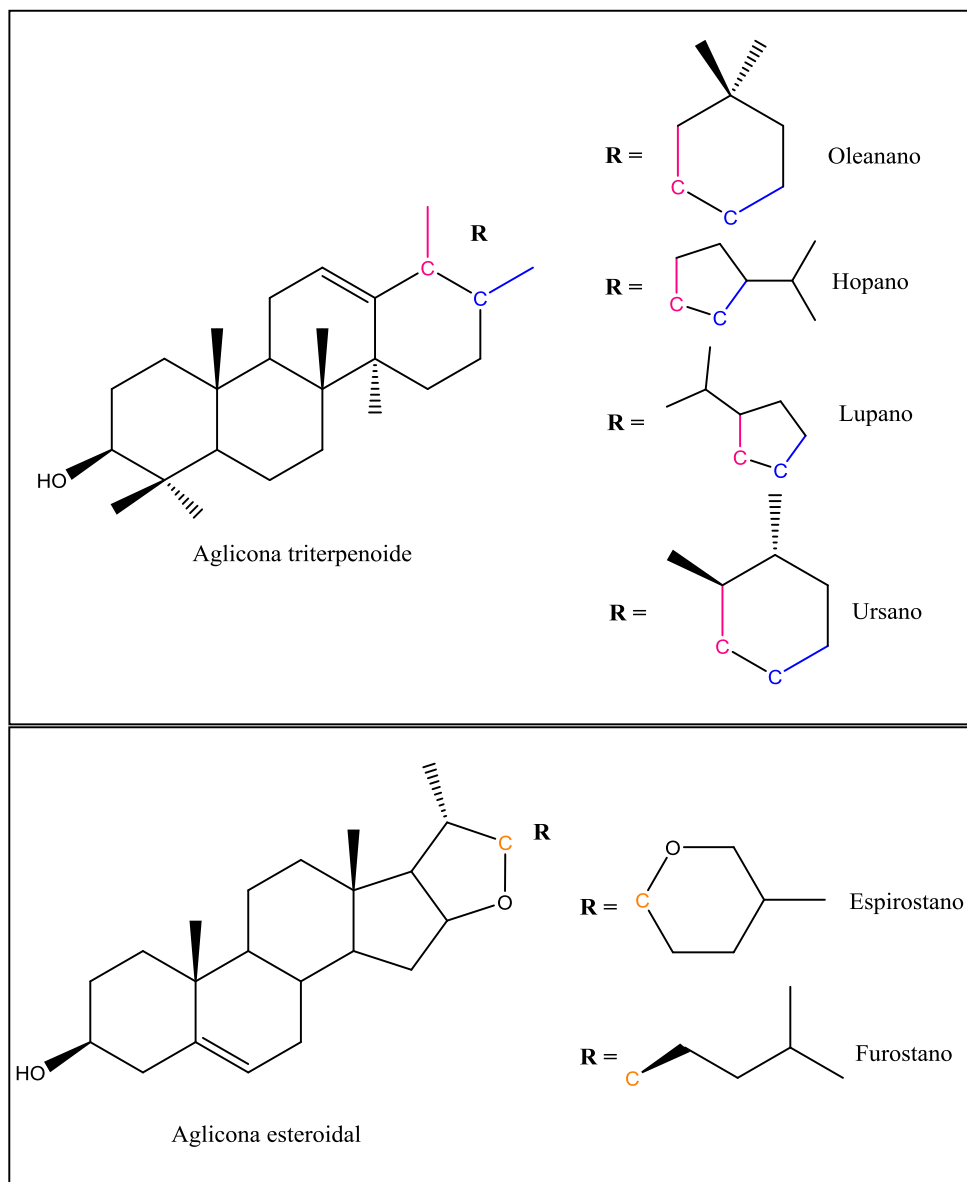


**Figura 4.** Estructura química de agliconas: (a) aglicona de la dioscina, saponina esteroidal; (b) aglicona del ácido oleanólico, saponina triterpenoide.

La estructura de las saponinas varía según el tipo y cantidad de residuos de glúcidos, que pueden enlazarse en una, dos o hasta tres posiciones diferentes, siendo esta última menos común. Cuando el enlace glicosídico se da en la posición C<sub>3</sub> de la aglicona, la molécula de saponina es llamada monodesmosídica. Cuando se presenta un enlace glicosídico adicional en la posición C<sub>26</sub> (en las saponinas esteroidales) o C<sub>28</sub> (en las saponinas triterpenoides), la molécula se conoce como bidesmosídica. Además, el esqueleto carbonado de la aglicona puede variar debido a la posibilidad de diferentes formas de ciclación, dando lugar a diferentes estructuras (Moghimpour & Handali, 2015). En la Figura 5 pueden observarse algunas de las más destacadas, así como los nombres con los que son conocidas.

- 2.1.1.1.2 Saponinas en *Allium sativum*

En estudios previos se ha reportado que las especies vegetales pertenecientes al género *Allium* son fuente de saponinas esteroidales, un ejemplo de esto es la  $\beta$  – clorogenina, que es una saponina esteroidal característica del ajo (Terry, 2011). Su estructura puede observarse en la Figura 7.



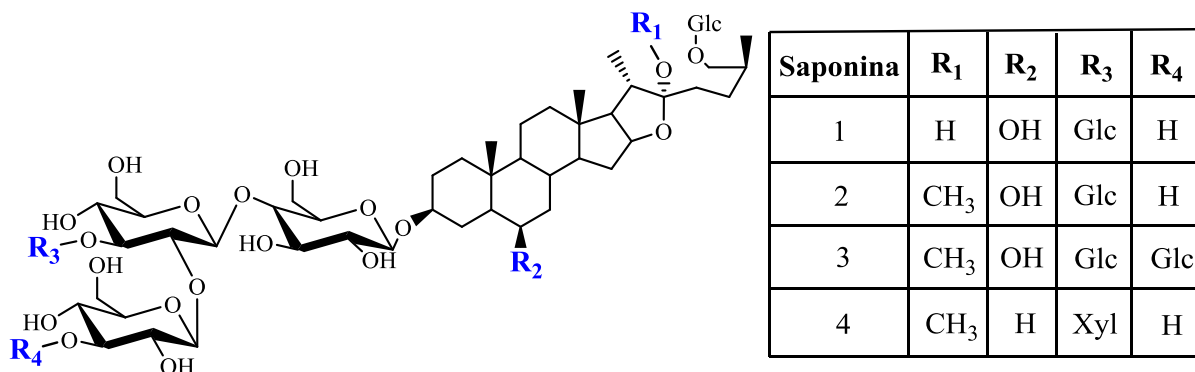
**Figura 5.** Algunas posibles estructuras de agliconas de saponinas (Moghimpour & Handali, 2015)

Son escasas las investigaciones realizadas sobre las saponinas en esta especie vegetal; Diretto (Diretto et al., 2017) realizó la determinación de saponinas de acuerdo al tejido en ajo blanco y morado, para lo cual partió de 10 mg de ajo en polvo, usando 0,75 mL de metanol 75% con 0,1% de ácido fórmico dopado con 10  $\mu$ g/mL de formononetina como

estándar interno. La extracción de las saponinas se realizó mediante agitación en un mezclador eléctrico durante 40 min. Utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución, lograron identificar 17 saponinas en total, siendo estas agapantagenina,  $\beta$ -clorogenina, desgalactotigonina, desgalactotigonina-ramnosa, diosgenina, erubósido B, erubósido B-ramnosa, gitogenina, proto-desgalactotigonina, proto-desgalactotigonina-ramnosa, proto-erubósido B, sativósido B1-ramnosa, sativósido R1, sativósido R2, sativósido R2-ramnosa, voghierósido D1 y voghierósido E1. Algunas de estas estructuras se observan en la Figura 7. Los autores de esta investigación encontraron que el ajo morado posee 40 veces más saponinas que el ajo blanco, localizadas principalmente en la túnica y en la cáscara de los dientes.

Las saponinas voghierósido D1 y voghierósido E1 también fueron encontradas por Lanzotti (Lanzotti et al., 2012), junto con los voghierósidos A1, A2, B1, B2, C1, C2, D2, E2, así como las saponinas agigenina 3-O-trisacárido y la gitogenina 3-O-tetrasacárido.

Además, se reportó la investigación de Ma y colaboradores (Ma et al., 2011), quienes utilizaron cromatografía en contracorriente de alta velocidad acoplado a detector evaporativo de dispersión de luz para separar y purificar cuatro saponinas esteroideas presentes en extractos de ajo obtenidos mediante tres extracciones sucesivas por reflujo durante 9 horas en total, usando etanol 90% como solvente; posteriormente identificaron las estructuras de las saponinas mediante EM-IES,  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$  (Figura 6).

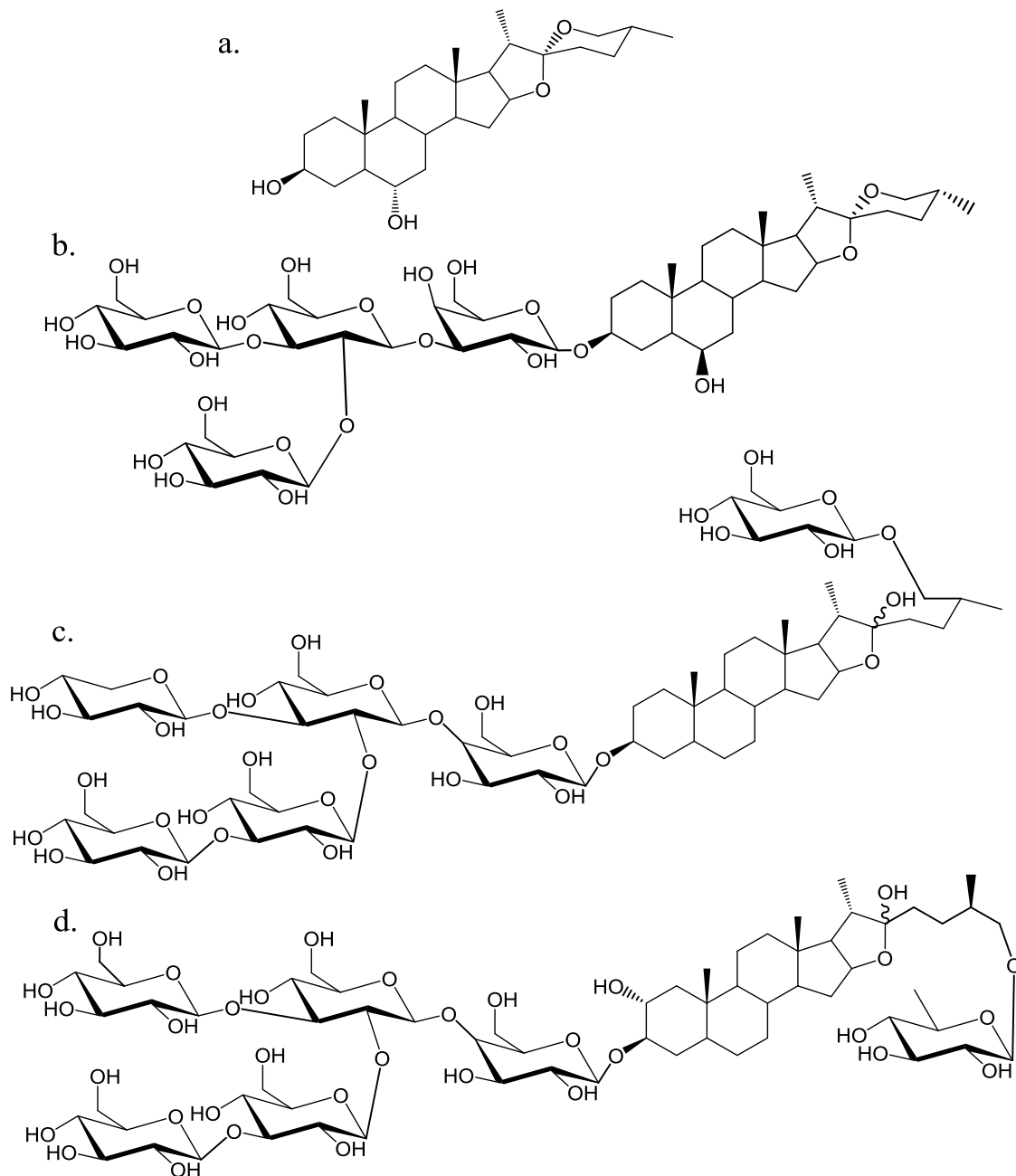


**Figura 6.** Estructura de saponinas determinada por Ma y colaboradores. Glc: glucosa. Xyl: xilosa (Ma et al., 2011).

- 2.1.1.1.3 Actividad biológica y aplicaciones

Entre las propiedades de actividad biológica encontradas para las saponinas en diversas investigaciones se han reportado la antiinflamatoria, antiviral, antitumoral (Sharma et al., 2021), antifúngica, antiparasitaria (Podolak et al., 2010), antibacterial, antioxidante, hemolítica (Sharma et al., 2021) y como adyuvante inmunológico (Cheok et al., 2014). Este conjunto de propiedades ha permitido la aplicación de estos metabolitos en campos como la farmacéutica, donde son utilizados también como precursores para la síntesis de hormonas como la progesterona (Guclu-Ustundag & Mazza, 2007); en la industria alimentaria

cumplen el papel de preservantes, como agentes antimicrobianos y antifúngicos y además se utilizan en bebidas y confitería (Moghimi-pour & Handali, 2015); en la industria cosmética son aprovechadas sus propiedades de surfactante, espumante, emulsificante y detergente (Cheek et al., 2014).



**Figura 7.** Algunas estructuras de sapogeninas y saponinas reportadas en *Allium sativum*. a:  $\beta$ -clorogenina. b: erubósido B. c: sativósido R1. d: voghiosido D1.

## 2.2 Técnicas de extracción de saponinas

La amplia variedad estructural de las saponinas convierte en un gran reto la implementación de métodos para la extracción de dichos metabolitos con técnicas apropiadas, incluso mayor que su posterior aislamiento e identificación; sin embargo, el creciente interés de investigadores por las potenciales aplicaciones de las saponinas en diferentes procesos científicos e industriales, además de la evidencia de los beneficios que este tipo de compuestos puede traer a la salud, ha impulsado la búsqueda y el desarrollo de diferentes metodologías y técnicas de extracción de las saponinas provenientes de especies vegetales, con las que se logre maximizar el rendimiento con el fin de adaptarse a la actual demanda (Cheok et al., 2014).

Las técnicas de extracción aplicadas pueden clasificarse como convencionales y verdes; estas se diferencian principalmente en aspectos como el tipo y cantidad de solventes utilizados, el consumo energético o los residuos generados; se ha observado que los investigadores se pueden inclinar por una u otra clase de acuerdo al enfoque o al objetivo del estudio a realizar (Cheok et al., 2014). Además, es común el pretratamiento de la muestra, que incluye el secado y la reducción del tamaño de partícula mediante macerado, sin importar la técnica de extracción escogida.

### **2.2.1 Extracciones convencionales**

Este tipo de técnicas dependen principalmente de la solubilidad del o los compuestos de interés en el solvente de extracción; es por esto que usualmente se utilizan grandes cantidades de solvente en el proceso, pues generalmente un alto volumen de este incrementará el recobro (Li et al., 2010). Además, en ocasiones suelen utilizarse temperaturas elevadas y agitación mecánica. Entre las técnicas más comúnmente empleadas se encuentran la maceración, la percolación, el Soxhlet y el reflujo, que se escogen por los investigadores por lo general para aislar nuevas saponinas y llevar a cabo estudios de sus propiedades farmacéuticas (Cheok et al., 2014).

Estas técnicas presentan desventajas como lo son las ya mencionadas, grandes cantidades de solvente, largos tiempos de extracción requeridos que van desde horas hasta incluso días, y muchas veces la baja eficiencia de extracción; por otro lado, muchos compuestos térmicamente inestables pueden degradarse por las altas temperaturas aplicadas, cambiando sus propiedades biológicas, nutricionales y terapéuticas, sin mencionar el alto consumo energético (da Silva et al., 2018).

### **2.2.2 Extracciones verdes**

Las tecnologías de extracción verdes son consideradas eficientes, simples, fácil implementación y económicamente rentables (Majinda, 2012); frente a las técnicas convencionales, estas presentan ventajas como tiempos más cortos de extracción, menor contaminación, uso de menor cantidad de solventes y de menor peligrosidad, también denominados “solventes verdes” tales como el agua o el etanol; de igual forma, al prescindir del uso de altas temperaturas de extracción se promueve la eficiencia energética. Cabe resaltar que estos parámetros deben tenerse siempre en cuenta cuando se quieren diseñar y aplicar metodologías de este tipo. En general, se ha observado que las

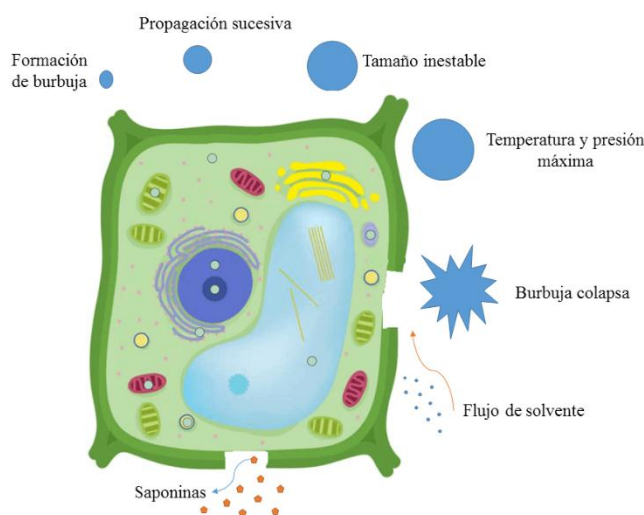
extracciones verdes son utilizadas en estudios de cuantificación y optimización (Cheok et al., 2014).

Algunas metodologías pertenecientes a esta categoría incluyen la extracción por líquidos presurizados, por fluidos supercríticos, asistida por ultrasonido, asistida por microondas, asistida por solventes eutécticos profundos, asistida por plasma frío, asistida por enzimas (Picot-Allain et al., 2021), además de la dispersión de matriz en fase sólida. Una breve descripción de las técnicas empleadas en este trabajo de investigación se presenta a continuación.

### 2.2.2.1 Extracción de saponinas asistida por ultrasonido (EAU)

El ultrasonido es una forma de energía asociada al sonido, cuyas frecuencias son superiores a las detectables por el oído humano. Este ocurre en ondas de compresión y expansión, también denominada rarefacción, las cuales se dispersan a través de las moléculas del medio. Durante la extracción de material vegetal, cuando los ciclos de rarefacción superan las fuerzas de atracción de las moléculas del medio, se forman burbujas de cavitación, que al colapsar, forman chorros a alta velocidad que causan disrupción de las paredes celulares, facilitando la penetración del solvente (Figura 8) (Picot-Allain et al., 2021).

Algunos de los efectos físicos del ultrasonido en material vegetal incluyen la fragmentación, correspondiente a la reducción del tamaño de partícula; la sonocapilaridad, o incremento de la penetración del solvente en los canales y poros del material vegetal; la sonoporación, donde la membrana celular libera el contenido de la célula al extractante, entre otros (Lavilla & Bendicho, 2017). Son estos efectos los que promueven la disrupción de la pared celular y aumentan la transferencia de masa, mejorando así la extracción de los compuestos de interés.



**Figura 8.** Formación de burbujas de cavitación en la EAU

En las extracciones asistidas por esta técnica, es importante controlar variables como la potencia, la temperatura o el tipo de solvente, ya que pueden generar reacciones indeseadas como la oxidación debido a especies radicalarias. Por lo general, la presencia de etanol

como solvente de extracción evita estas reacciones, además de que vuelve más eficiente la EAU, sobretodo en soluciones acuosas, en comparación con técnicas convencionales de extracción (Lavilla & Bendicho, 2017).

La EAU se ha aplicado para la extracción de diversos metabolitos secundarios, con el objetivo de cuantificar, aislar o caracterizar estos compuestos. En cuanto a saponinas, se han llevado a cabo diversos estudios, entre los que se destacan el de Arya y Kumar (Arya & Kumar, 2021), quienes realizaron la extracción de diosgenina de la semilla de fenogreco (*Trigonella foenum-graecum*), mediante la variación del tipo de solvente, su concentración y el tiempo de extracción, encontrando que el rendimiento de extracción del compuesto aumenta significativamente con el tiempo de extracción, de igual manera una concentración de etanol de 80 % produce el mayor rendimiento de extracción, obteniendo en general contenidos de diosgenina de 15,78 a 40,37 mg/100 g de polvo de semilla.

Hadidi (Hadidi et al., 2020) realizó la optimización de la EAU mediante metodología de superficie de respuesta, para mejorar el rendimiento de extracción y la bioaccesibilidad de las saponinas presentes en hojas de alfalfa (*Medicago sativa*). El proceso de extracción lo realizó con sonicación en baño ultrasónico. Las condiciones de extracción optimizadas incluyen una relación solvente/muestra de 11,4 mL/g; tiempo de extracción de 2,84 h; temperatura de extracción de 76,8 °C; potencia de ultrasonido de 112 W y concentración de solvente etanol 78,2 %, obteniendo un rendimiento de extracción de 1,61 %. De igual forma encontraron que la constante de la tasa de rendimiento para EAU fue casi dos veces mayor que la de la extracción convencional Soxhlet, con lo que catalogan a la EAU como una buena alternativa para mejorar el rendimiento y la bioaccesibilidad de saponinas.

También se destaca el estudio realizado por Navarro del Hierro (Navarro del Hierro et al., 2018), en el que se determinó, entre otros, el contenido de saponinas totales en semillas comestibles como la quinua, lenteja, fenogreco, soja y lupino, además estudiaron la bioaccesibilidad de las saponinas después de la digestión gastrointestinal *in vitro* de los extractos. La sonicación la realizaron por sonda, utilizando diferentes solventes de extracción, siendo estos etanol, agua o etanol:agua en relación 1:1. Estos autores encontraron que los extractos más ricos en saponinas se obtuvieron al realizar la EAU con etanol como solvente y los contenidos de saponinas totales se encuentran entre 4,08 – 12,90 g saponinas/100 g muestra. Las semillas con mayor contenido de saponinas fueron el fenogreco y la lenteja. Los autores afirman que EAU es un método eficiente para obtener extractos ricos en saponinas a partir de semillas comestibles.

Por otra parte, Borges y colaboradores (Borges et al., 2013) aislaron cinco saponinas triterpenoides de la raíz de *Chiococca alba*, una especie vegetal tropical a la que se le atribuyen propiedades antireumáticas, diuréticas, antiinflamatorias, antivirales y con actividad contra mordeduras de serpiente. La EAU con hexano y cloruro de metileno en un baño ultrasónico permitió la extracción de cinco saponinas, dos de ellas nuevas, las cuales fueron caracterizadas estructuralmente mediante la aplicación de técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas por electrospray de alta resolución. Además, encontraron que algunas de las fracciones de saponinas obtenidas poseen propiedades antiinflamatorias contra inflamación inducida por lipopolisacáridos *in vitro*.



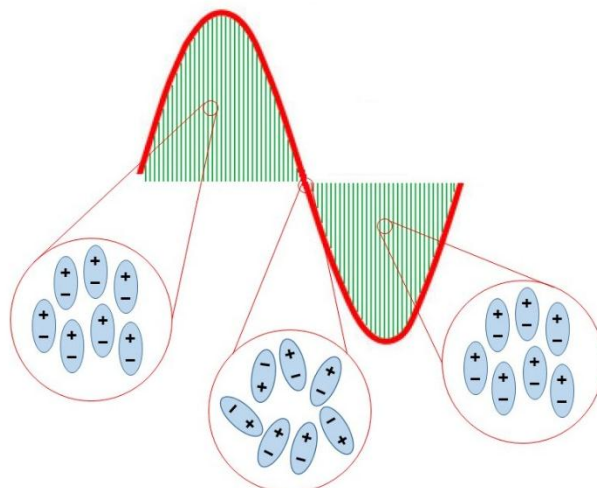
En cuanto al género *Allium*, se ha reportado la investigación de Mostafa y colaboradores (Mostafa et al., 2013), en la que evalúan el contenido de saponinas totales, entre otros, en bulbos, raíces y hojas de la especie *Allium nigrum*, utilizada sobretodo con fines ornamentales. La EAU se llevó a cabo con los solventes n-hexano y metanol 70 %, repitiéndose por tres veces durante 30 min. Los autores encontraron que el mayor contenido de saponinas se encuentra en la raíz (19,38 mg/g). También lograron aislar una saponina de tipo aginósido, elucidando posteriormente su estructura por análisis de RMN 2D, espectrometría de masas por electrospray de alta resolución, entre otros. De igual forma evaluaron por primera vez su actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra fitopatógenos, encontrando una actividad antifúngica significativa y dependiente de la concentración de la saponina.

Recientemente, Abdelrahman y colaboradores (Abdelrahman et al., 2021) realizaron la cuantificación de saponinas en raíces de *Allium sativum* procedentes de diferentes regiones geográficas de Asia. Los autores extrajeron las saponinas de las raíces secas de ajo mediante sonicación por 30 min, utilizando metanol 80% como solvente de extracción. El contenido de saponinas que encontraron varió entre 3,36 y 32,18 mg/g y el promedio fue de 14,49 mg/g de muestra seca. Sin embargo, para los términos del presente trabajo de investigación, este resultado no es relevante teniendo en cuenta que la parte utilizada comúnmente con fines culinarios y medicinales es el bulbo del ajo, no la raíz.

#### **2.2.2.2 Extracción de saponinas asistida por microondas (EAM)**

Esta es una técnica que combina el uso de la energía de microondas con la extracción sólido-líquido tradicional. Esta energía aplicada calienta el solvente, logrando la partición de los compuestos de interés desde la muestra, generalmente sólida, hacia él.

La energía de microondas es radiación electromagnética no ionizante que causa movimiento molecular y, por tanto, calentamiento de las moléculas en la solución, mediante dos mecanismos: el primero de ellos es la migración de iones, donde se genera calor debido a la resistencia de la solución al flujo de iones, lo que deriva en fricción entre las moléculas y por tanto hay un aumento en la temperatura. El segundo mecanismo, que es el más significativo, es la rotación de dipolos que consiste en el movimiento de las moléculas polares en un intento por alinearse con el campo eléctrico (Figura 9), lo que lleva a vibraciones, colisiones debido a la agitación de las moléculas que al final se traduce en un incremento en la temperatura (Llompart et al., 2018).



**Figura 9.** Polarización y relajación de dipolos de acuerdo al campo eléctrico

En cuanto a los sistemas diseñados para realizar extracciones asistidas por esta técnica, se encuentran EAM en recipiente cerrado o en recipiente abierto. En la primera, la extracción se realiza bajo una presión y una temperatura rigurosamente controladas; estas pueden alcanzar los 30 bar y 300°C, mientras que en la segunda la extracción se realiza a presión atmosférica y la temperatura máxima de extracción está limitada por el punto de ebullición del solvente. Además, EAM ofrece la opción de realizar extracciones sin añadir solventes, en este caso la muestra es irradiada y el agua contenida en la muestra actúa como solvente de extracción. Esta opción se utiliza especialmente para obtención de aceites esenciales (Lopez-Avila & Luque de Castro, 2014).

En esta técnica es importante tener en cuenta factores como la naturaleza de la muestra, sobretodo por su contenido de agua, debido a que es el alto momento dipolar del agua lo que permite un calentamiento eficiente; el solvente de extracción debe ser seleccionado teniendo en cuenta no solo la solubilidad de los compuestos de interés en él, sino también sus propiedades de absorción de microondas, en otras palabras, su constante dieléctrica; de igual forma, el volumen empleado puede repercutir en el rendimiento de extracción, ya que si se usan cantidades muy elevadas, se puede presentar una mezcla inadecuada del solvente con la matriz por las microondas. Por lo general se usan relaciones muestra:solvente en rangos desde 1:10 a 1:50. Otros factores como tiempos de extracción, potencia y temperatura deben ser controlados ya que pueden ocasionar degradación de compuestos térmicamente inestables, si se utilizan magnitudes muy elevadas de los mismos (Llompart et al., 2018), produciendo bajos rendimientos de extracción o reacciones indeseadas en los compuestos de interés.

Entre algunas investigaciones recientes donde se emplea la EAM para la extracción de saponinas de diferentes fuentes se encuentra la realizada por Choudhary y colaboradores (Choudhary et al., 2021), quienes evaluaron el efecto de esta técnica y de la técnica convencional Soxhlet en la extracción de fitoconstituyentes de *Chenopodium album*, entre ellos las saponinas. Para ello, establecieron una potencia de 200 W, 50 °C de temperatura, un tiempo de extracción de 18 min y usaron éter de petróleo, acetato de etilo, metanol, alcohol acuoso 70 % y agua como solventes de extracción. Los autores encontraron que el

mayor contenido de saponinas se logró utilizando alcohol acuoso como solvente, con una concentración de  $3,22 \pm 0,061$  mg diosgenina/g, mientras que con la extracción convencional lograron extraer solo  $1,84 \pm 0,061$  mg diosgenina/g. Según esto, los autores afirman que EAM es una mejor técnica de extracción para esta especie vegetal, en comparación a la convencional.

Se destaca la extracción de saponinas totales a partir de la estrella de mar *Echinaster sepositus* realizada por Dahmoune y colaboradores (Dahmoune et al., 2021), quienes buscaron optimizar la EAM y determinar la influencia de la concentración de solvente, tiempo de irradiación y la potencia en el rendimiento de extracción mediante la metodología de superficie de respuesta acoplada con un diseño Box-Behnken. El rendimiento que obtuvieron fue de  $60,3 \pm 0,6$  mg/g con las condiciones optimizadas, siendo estas metanol 58,7 % como solvente, potencia de 177 W, 3 min de irradiación y una relación solvente:muestra de 43,6 mL/g. Además, realizaron ensayos hemolíticos *in vitro* en los que encontraron que el extracto de saponinas obtenido por EAM era más activo que otros obtenidos por EAU y por extracción convencional.

También se encontró la investigación de Ren y colaboradores (Ren et al., 2015), en la que aplicaron EAM para extraer las saponinas totales presentes en *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright, utilizando las siguientes condiciones: etanol 75 % como solvente, una relación muestra:solvente 1:20, temperatura de 75 °C, potencia de 600 W y tres ciclos de extracción de 6 min cada uno. Utilizaron microscopía electrónica de barrido para evidenciar la disrupción producida en la muestra por las microondas. Los autores calcularon por primera vez el rendimiento de saponinas esteroidales con la determinación de la diosgenina en ellas mediante CLAR y cromatografía líquida acoplada a EM-IES, concluyendo que la metodología aplicada es conveniente para determinar el rendimiento de extracción de las saponinas esteroidales totales en esta y posiblemente en otras especies vegetales.

Con respecto al género *Allium*, se encontró que EAM ha sido utilizada para extraer compuestos fenólicos en *Allium cepa*, sin embargo, en la literatura consultada no se ha reportado el uso de esta técnica para la extracción de saponinas en otras especies pertenecientes a este género, como tampoco en *Allium sativum* específicamente.

### **2.2.2.3 Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) para la extracción de saponinas**

Es considerada una técnica rápida y efectiva para realizar no solamente la extracción sino también la limpieza de una muestra en un solo paso. Presenta similitudes con la extracción en fase sólida en cuanto al empaquetamiento de la fase en una columna para la posterior elución de los compuestos de interés por un solvente adecuado, también llamado eluyente. La DMFS está basada en principios de la química y física que involucran fuerzas aplicadas a la muestra por maceración mecánica, produciendo la disrupción de la misma, así como interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas entre los componentes de la muestra y la fase (Barker, 2007).

Algunos de los aspectos más llamativos de esta técnica son que no necesita equipos especializados, además de que combina la disrupción, extracción y purificación de la muestra en un solo paso, reduciendo así su tiempo de preparación (Wianowska & Gil,

2019). Además, el consumo de solvente es mínimo, teniendo en cuenta que generalmente los analitos son eluidos en los primeros mililitros de extracto. Cabe resaltar que se deben considerar factores como el tamaño de partícula y polaridad de la fase, la relación muestra:fase que habitualmente es 1:4, pero varía según la aplicación; el tiempo de maceración, también el tipo de solvente o solventes y la secuencia de elución adecuada de acuerdo al compuesto de interés, así como el volumen de elución (Barker, 2007).

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la extracción de drogas, pesticidas, fitoquímicos de una gran variedad de matrices de diferentes grados de complejidad (Barker, 2007), un ejemplo de ello es la investigación realizada por Albero y colaboradores (Albero et al., 2017), en la que determinaron la presencia de 17 contaminantes emergentes en vegetales como *Allium cepa*, haciendo uso de DMFS acoplado con EAU. Sin embargo, su aplicación en la extracción de saponinas es muy escasa; se ha utilizado en diferentes variedades de ginseng (*Panax ginseng*), cuyas saponinas se conocen como ginsenosidos. No obstante, no se ha reportado su uso en la extracción de saponinas u otros metabolitos secundarios presentes en especies de *Allium*, ni tampoco en *Allium sativum*.

### **2.3 Identificación y cuantificación de saponinas**

Existen varias pruebas que permiten la identificación y cuantificación de las saponinas, a continuación se describen algunas de las pruebas más relevantes.

#### **2.3.1 Identificación de saponinas**

La propiedad de las saponinas de formar espuma permite verificar su presencia en un extracto, mediante la aplicación de pruebas cualitativas como la prueba de la espuma, una prueba simple y efectiva en la que se confirma la presencia de saponinas en el extracto por la formación de espuma estable por mínimo 15 min al agitarlo con agua (Domínguez, 1988). Esta prueba hace parte del tamizaje fitoquímico que se aplica a un extracto con el fin de identificar los metabolitos secundarios que se encuentran presentes en el mismo.

#### **2.3.2 Cuantificación de saponinas**

El proceso de cuantificación de saponinas puede llevarse a cabo mediante diferentes metodologías, en las que las técnicas aplicadas dependen principalmente del objetivo de cada investigación, ya sea cuantificación de saponinas totales, aislamiento y cuantificación de una saponina específica, que generalmente se lleva a cabo mediante CLAR utilizando detectores de arreglo de diodos (DAD) o espectrometría de masas. De igual forma, si la finalidad es la elucidación estructural de saponinas, se recurre a técnicas de RMN mono y bidimensionales y espectrometría de masas (EM), tal como se llevó a cabo en investigaciones mencionadas anteriormente, como la de Diretto y colaboradores (Diretto et al., 2017) en la que utilizaron CL-EM para determinar la estructura de 17 saponinas, algunas observadas en la Figura 7, o la investigación de Ma y colaboradores (Ma et al., 2011), quienes hicieron uso de EM y RMN para elucidar las estructuras de las saponinas observadas en la Figura 6.

Una técnica muy utilizada para la cuantificación de saponinas totales es la espectrofotometría, en la que se cuantifican las saponinas mediante su reacción con ácido, seguida de una reacción con un agente cromogénico, midiendo posteriormente en un espectrofotómetro UV-Vis la absorbancia del cromóforo formado (Le Bot et al., 2022). Comúnmente se utiliza el ácido sulfúrico como agente oxidante de las saponinas, las cuales a continuación reaccionan con vainillina como agente cromogénico. Esta metodología ha sido usada recientemente por autores como Hsu y colaboradores (Hsu et al. 2022) para cuantificar saponinas en subproductos de semillas de soja y camelia para ser utilizadas posteriormente en la eliminación de pesticidas en frutas y verduras. De igual forma, investigaciones como las de Hadidi (Hadidi et al., 2020), Navarro del Hierro (Navarro del Hierro et al., 2018) y también Choudhary (Choudhary et al., 2021) mencionadas anteriormente utilizaron esta metodología de cuantificación. Es común encontrar el uso de *p*-anisaldehído como agente cromogénico, sobretodo cuando se desean cuantificar saponinas esteroidales, como es el caso de Lebot y colaboradores (Lebot et al., 2019) quienes buscaron cuantificar las saponinas esteroidales presentes en el polvo de ñame (*Dioscorea spp.*), o Ramli y colaboradores (Ramli et al., 2019), quienes cuantificaron las saponinas extraídas para posteriormente utilizarlas como biopesticida en la eliminación de plagas en cultivos de arroz.

En esta metodología es importante considerar factores como el estándar a usar, la longitud de onda de medición, y condiciones para el desarrollo completo del color; sin embargo, es un método popular en la cuantificación de saponinas ya que es simple, rápido y económico de operar (Cheok et al., 2014).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ajo (*Allium sativum*) es una planta reconocida alrededor del mundo, utilizada desde la antigüedad, particularmente el bulbo, con propósitos culinarios y medicinales (Meriga et al., 2012). Son muchas las propiedades biológicas que presenta el ajo, dentro de las cuales se puede destacar las antioxidantes, anticoagulantes, antibacterianas, antimicrobianas e insecticidas, así como propiedades antiproliferativas, antiespasmódicas, antifúngicas y citotóxicas (Lanzotti et al., 2012); estas actividades se atribuyen a la amplia variedad de metabolitos secundarios que posee el bulbo de ajo como: alcaloides, esteroides, taninos y saponinas. Particularmente, las saponinas son tóxicas para insectos y microorganismos que pueden atacar a la planta, cumpliendo de esta forma un papel defensivo dentro de la misma; estos metabolitos debido a su variedad estructural se destacan por sus potenciales aplicaciones en la industria como precursores farmacéuticos, pesticidas, insecticidas y antifúngicos, entre otros.

Existe gran cantidad de variedades de ajo, las cuales varían considerablemente en su composición y diversidad de metabolitos presentes. En la región centro-sur del departamento del Cauca se cultiva y comercializa en gran cantidad la variedad conocida popularmente como ajo macho, cuya composición de saponinas hasta ahora es desconocida. Teniendo en cuenta la potencialidad de este tipo de metabolitos y la escasa investigación acerca de esta variedad de ajo, surge este proyecto de investigación en el que se propone la aplicación de tres técnicas verdes de extracción: asistida por ultrasonido, asistida por microondas y por dispersión de matriz en fase sólida, para la obtención de las saponinas presentes en bulbos de ajo macho (*Allium sativum*) cultivados en la región de Totoró, departamento del Cauca, y su cuantificación mediante espectrofotometría de ultravioleta-visible, así como la evaluación de la influencia de las variables de extracción seleccionadas para cada técnica extractiva, sobre el rendimiento de extracción; se propone también la aplicación del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total (EET) para la identificación de otros metabolitos secundarios presentes en el bulbo de ajo macho.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Cuantificar el contenido de saponinas presentes en el extracto del bulbo de ajo macho (*Allium sativum*) cultivado en el departamento del Cauca obtenido mediante diferentes técnicas de extracción con un enfoque verde.

### 4.2 Objetivos específicos

- Identificar cualitativamente los tipos de metabolitos secundarios presentes en bulbo de ajo (*Allium sativum*) por tamizaje fitoquímico del extracto total.
- Evaluar la influencia de las variables: relación de solvente y tiempo de la extracción asistida por ultrasonido y por microondas, y el tipo de fase y solventes de elución en la extracción por dispersión de matriz en fase sólida, en la obtención del extracto mediante el diseño experimental apropiado.
- Cuantificar el contenido total de saponinas extraídas mediante espectrofotometría de ultravioleta-visible.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se utilizó una serie de reactivos y materiales (Anexo 1) y varios equipos (Anexo 2) provenientes de diferentes casas comerciales.

### 5.1 Material vegetal

La muestra de bulbos de ajo macho (*Allium sativum*) utilizada para esta investigación fue adquirida en agosto del 2021 en la plaza de mercado del Barrio Bolívar, en la ciudad de Popayán. Dicha muestra era procedente del municipio de Totoró, ubicado a aproximadamente 45 minutos de Popayán, en la zona oriental del Departamento del Cauca (coordenadas 2°30' N, 76°24' W, altitud de 2750 m.s.n.m., temperatura promedio 14 °C, precipitación promedio 2000 mm).

Los bulbos de ajo se llevaron al laboratorio del grupo de investigación de Química de Compuestos Bioactivos (QCB), para su preparación se pelaron y se cortaron en rebanadas finas de  $1,53 \pm 0,22$  mm, las cuales se dispusieron en un recipiente de vidrio pyrex (Figura 10). A continuación, se llevó la muestra a secado en estufa a 40 °C hasta peso constante. El contenido de humedad de la muestra fue determinado por triplicado. Una vez seca, la muestra se almacenó en un frasco de vidrio para posteriormente realizar las extracciones correspondientes.



**Figura 10.** Preparación de bulbos de ajo para secado. A. Bulbos con cáscara; B. Bulbos pelados; C. Bulbos preparados para secado en estufa.



## 5.2 Establecimiento de diseños experimentales

En este trabajo de investigación se plantearon dos diseños experimentales, tomando en consideración las variables concernientes a cada tipo de técnica de extracción a emplear, siendo estas variables similares en la EAU y en la EAM, por lo que estas dos técnicas se incluyeron en un mismo diseño experimental que consistió en un diseño factorial  $2^3$  para la evaluación de dos niveles (alto y bajo) de cada uno de tres factores de extracción (técnica de extracción, relación de solvente y tiempo). El segundo diseño experimental, en el que se utilizó la tercera técnica de extracción (DMFS), consistió en un diseño factorial  $2^2$  evaluando dos niveles (alto y bajo) para cada uno de dos factores de extracción (tipo de fase y de solvente).

### 5.2.1 Diseño experimental factorial $2^3$ para extracción de saponinas mediante extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas

Para las técnicas de extracción asistida por ultrasonido y asistida por microondas, los factores y sus correspondientes niveles a evaluar dentro del diseño factorial  $2^3$  se encuentran en la Tabla 2. Se trata de enfocar la investigación a la química verde con variables como la temperatura, pero usando condiciones tradicionales de extracción como el solvente etanol. Se conservaron como factores fijos la relación muestra:solvente (1:10), el solvente (etanol), la temperatura de extracción (temperatura ambiente), la potencia (100 W para EAU y 280 W para EAM) y el número de extracciones sucesivas se estableció teniendo en cuenta que, generalmente tres extracciones se consideran efectivas para obtener buenas eficiencias de extracción y que a partir de cinco extracciones sucesivas la eficiencia permanece prácticamente igual (Skoog & West, 2015).

**Tabla 2.** Variables y niveles a evaluar en EAU y EAM.

Variable	Niveles	
	Bajo	Alto
Técnica de extracción	EAM	EAU
Tiempo de extracción (min)	12 (3×4 min)	30 (3×10 min)
Relación de solvente (%) EtOH/H <sub>2</sub> O	50/50	90/10

El diseño experimental planteado arrojó un total de 8 tratamientos, y cada uno de ellos se realizó por duplicado, para un total de 16 experimentos. En la Figura 11.a se observa la representación cúbica del diseño experimental, con los 8 tratamientos posibles.

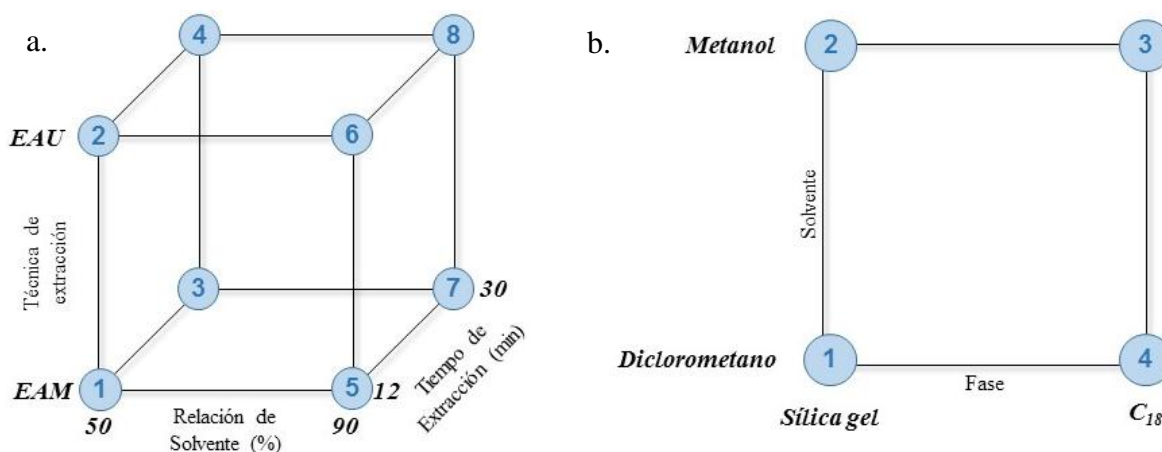
### 5.2.2 Diseño experimental $2^2$ para extracción de saponinas mediante dispersión de matriz en fase sólida

Por otra parte, los factores y niveles a evaluar en la extracción por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) se observan en la Tabla 3. En este caso se trabajaron como factores fijos la relación muestra:fase sólida (1:3), el tiempo de maceración (1 min) y el volumen de elución (5 mL). Este diseño experimental arrojó un total de 8 experimentos, los cuales

consisten en 4 tratamientos realizados por duplicado. En la Figura 11.b se encuentra una representación del diseño.

**Tabla 3.** Variables y niveles a evaluar en extracción por DMFS.

Variable	Niveles	
	Bajo	Alto
Tipo de fase	Sílica gel	Sílica C <sub>18</sub>
Solvente	Diclorometano	Metanol



**Figura 11.** Representaciones de los diseños experimentales, a:  $2^3$ ; b:  $2^2$

### 5.3 Extracción de saponinas asistida por ultrasonido (EAU)

Para cada uno de los ocho experimentos a realizar con esta técnica de extracción se tomó una cantidad de ajo seco, se maceró en un mortero de porcelana con pistilo hasta obtener un polvo fino, del que se pesó aproximadamente 0,3000 g (las masas de cada muestra se encuentran en el Anexo 3), se dispuso en un tubo de centrífuga de polipropileno, se adicionó 1,00 mL de solución etanólica a diferentes concentraciones, según la relación indicada en el diseño, y se introdujo el tubo en un baño ultrasónico a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en el diseño (Figura 12.a). Entre cada extracción sucesiva se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm, el sobrenadante (extracto etanólico) se trasvasó a un vial limpio y seco y se agregó 1,00 mL de solvente fresco al tubo para la siguiente extracción sucesiva. Los tres volúmenes de extracto obtenidos de las tres extracciones sucesivas se juntaron en uno solo (3,00 mL) y el solvente se evaporó a presión reducida a 40 °C y 85 rpm. Los ocho extractos secos se almacenaron para posterior fraccionamiento mediante extracción líquido-líquido (ELL).

### 5.4 Extracción de saponinas asistida por microondas (EAM)

Para cada uno de los ocho experimentos a realizar con esta técnica de extracción se tomó una cantidad de ajo seco, se maceró en mortero y se pesó aproximadamente 0,9000 g del

polvo fino obtenido (las masas de cada muestra se encuentran en el Anexo 3); este se dispuso en un tubo de centrífuga de polipropileno, se adicionaron 3,00 mL de etanol acuoso con la relación indicada en el diseño experimental. El tubo se introdujo en un vaso de 250 mL lleno de agua, este sistema se introdujo en el microondas para la extracción (Figura 12.b). Se estableció tiempo de irradiación de 10 segundos y tiempo de descanso de 30 segundos, durante los cuales el sistema de vaso y tubo se sacó del microondas, el tubo se introdujo en un baño de hielo, se cambió el agua del vaso y nuevamente se introdujo el tubo en el vaso con agua para continuar con la irradiación de 10 segundos en el microondas, hasta completar el tiempo de extracción establecido por el diseño. Este proceso se realizó con el fin de mantener la temperatura ambiente dentro del sistema de extracción.

Una vez terminada la extracción sucesiva, se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm, el sobrenadante (extracto etanólico) se trasvasó a un vial limpio y seco, se agregaron 3,00 mL de solvente fresco al tubo y se continuó con la siguiente extracción sucesiva, repitiendo el proceso ya descrito. Los tres volúmenes de extracto obtenidos de las tres extracciones sucesivas se reunieron en uno solo (9,00 mL), para evaporar el solvente a presión reducida a 40 °C y 85 rpm. Los ocho extractos obtenidos se almacenaron para posterior fraccionamiento por ELL.

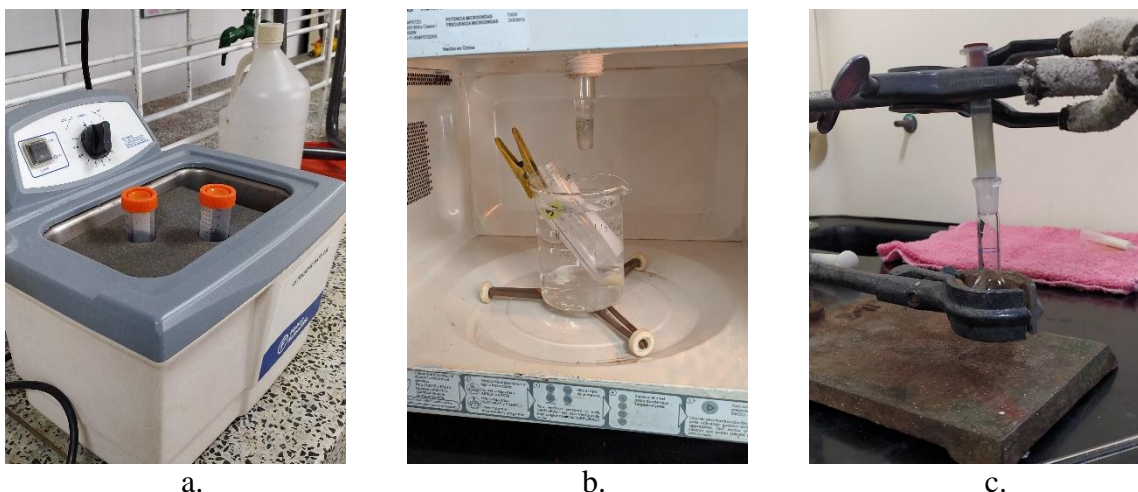
### **5.5 Extracción de saponinas por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)**

Para los ocho experimentos a realizar con esta técnica de extracción, se maceró una cantidad de ajo seco para obtener un polvo fino y se pesaron aproximadamente 0,2500 g del mismo; enseguida se pesaron aproximadamente 0,7500 g de fase sílica gel o C<sub>18</sub> de acuerdo al diseño (las masas de cada muestra y fase se encuentran en el Anexo 3), se mezcló con la muestra de ajo y se maceró suavemente durante 1 min. La mezcla obtenida se empacó en un cartucho para extracción en fase sólida de 3 mL con un frit en el fondo, y se agregó continuamente el solvente de elución indicado por el diseño, asegurándose de no dejar secar la fase sólida. El eluido se colectó en un balón hasta completar su aforo de 5,00 mL (Figura 12.c).

El extracto se trasvasó a un vial limpio y seco para evaporarlo a presión reducida a 30 °C y 60 rpm. Los ocho extractos obtenidos se almacenaron para posterior fraccionamiento por ELL.

### **5.6 Fraccionamiento de extractos mediante extracción líquido-líquido (ELL)**

Una vez evaporado el solvente, los 24 extractos obtenidos mediante los diferentes tratamientos indicados por los diseños experimentales se disolvieron completamente en un volumen de agua y se agregó un volumen equivalente de n-butanol. La mezcla se agitó y se adicionó en un embudo de separación, se dejó reposar observándose enseguida la separación de dos fases. La fase orgánica se separó y se almacenó en un vial limpio y seco. Este procedimiento se repitió dos veces más para un total de tres extracciones sucesivas. El volumen final de fase orgánica se evaporó a presión reducida a 45 °C y 60 rpm. Los 24 extractos se almacenaron para su posterior cuantificación.



**Figura 12.** Montajes de cada extracción, a: EAU; b: EAM; c: DMFS.

### 5.7 Cuantificación de saponinas totales

Para el proceso de cuantificación, los 24 extractos obtenidos en el fraccionamiento mediante extracción líquido-líquido se disolvieron y aforaron con agua tipo I, los 16 extractos obtenidos por EAU y EAM se aforaron a 10,00 mL, y a 5,00 mL los extractos obtenidos por DMFS. A continuación, se tomaron 0,25 mL de la solución acuosa de extracto preparada y se agregaron a un vial limpio y seco, colocado en un baño de hielo. Enseguida, se agregaron lentamente al vial 2,5 mL de ácido sulfúrico 72 % y 0,25 mL de vainillina 8 % en etanol. El vial se agitó en un vortex durante 30 segundos y se introdujo en un baño María a 60 °C durante 10 min. Pasado este tiempo, el vial se introdujo en un baño de hielo durante 5 min. Finalmente, la absorbancia de la muestra se midió en espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 454 nm, la cual se estableció mediante barrido previo en el rango del visible (400 a 700 nm).

Se usó como estándar un reactivo de saponinas de quillaja (*Quillaja saponaria*), con el cual se preparó una curva de calibración con soluciones de seis diferentes concentraciones en un rango de 20 a 150 mg/L, a partir de una solución madre con una concentración de 5000 mg/L. Con las soluciones estándar se siguió el mismo procedimiento de preparación y lectura en espectrofotómetro UV-Vis, que con las soluciones de extracto.

El contenido de saponinas en cada muestra se calculó mediante la Ecuación 1, teniendo en cuenta las diluciones efectuadas.

$$C = \frac{c \times f_d}{m_{seca}} \quad \text{Ecuación 1}$$

#### **Ecuación 1.** Cuantificación de saponinas totales

Donde c es la concentración (mg/L) de saponinas en la muestra medida, establecida por regresión lineal con la curva de calibración;  $f_d$  corresponde a los factores de dilución

aplicados a cada muestra y  $m_{seca}$  corresponde a la masa (g) de la muestra seca de ajo empleada para cada extracción.

Para las muestras cuya absorbancia resultó por debajo del límite inferior de la curva de calibración se realizó un proceso de adición estándar en el que el contenido de saponinas se calculó mediante la Ecuación 2.

$$c = \frac{A_M \times [E]}{A_{M+E} - A_M} \quad \text{Ecuación 2}$$

### **Ecuación 2.** Cuantificación de saponinas totales por adición estándar

Donde  $c$  es la concentración (mg/L) de saponinas en la muestra medida,  $A_M$  es la absorbancia de la muestra,  $A_{M+E}$  es la absorbancia de la muestra a la que se le adicionó un volumen de concentración conocida de estándar [E]. Posteriormente se aplica la Ecuación 1 para calcular el contenido de saponinas en la muestra inicial.

Los resultados se expresan como miligramos de saponinas totales por gramo de muestra seca.

## **5.8 Tamizaje fitoquímico**

Se determinó de manera cualitativa la presencia de algunos tipos de metabolitos secundarios en el extracto etanólico total del bulbo de ajo macho, obtenido por extracción asistida por ultrasonido; los metabolitos analizados y las pruebas aplicadas se pueden encontrar en la Tabla 4. Dichas pruebas se establecieron de acuerdo a metodologías descritas en la literatura (Domínguez, 1988). Se empleó como control negativo el etanol utilizado en la obtención del extracto etanólico total, en los volúmenes requeridos de acuerdo a lo indicado en cada prueba realizada.

A continuación, se describen las metodologías aplicadas para el desarrollo de las pruebas cualitativas del tamizaje fitoquímico.

### **5.8.1 Determinación de alcaloides**

1,50 mL del extracto etanólico fueron llevados a sequedad, se adicionó 0,25 mL de HCl 10 % y se calentó por 10 min. Enseguida se enfrió, se filtró y se dividió el filtrado en tres tubos de ensayo, a los que se agregó unas gotas de los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner.

### **5.8.2 Determinación de cardiotónicos**

1,25 mL de acetato de plomo 10 % y 1,00 mL de agua destilada se agregaron a un tubo con 2,50 mL de extracto etanólico. La mezcla se calentó a baño María durante 10 min, se filtró

y el filtrado se agitó con 5,00 mL de cloroformo, separando a continuación la fase orgánica en 4 tubos de ensayo que finalmente se llevaron a sequedad.

En los tubos 1 a 3 se agregó 1,00 mL de los reactivos de Baljet, Kedde y Raymond-Marthoud, respectivamente y en el tubo 4 se agregaron 2,00 mL del reactivo de Keller-Killiani que contiene ácido acético glacial, una gota de cloruro férrico 5 % y ácido sulfúrico concentrado.

**Tabla 4.** Pruebas realizadas en el tamizaje fitoquímico del EET del bulbo de ajo

Tipo de metabolito	Ensayo en tubo	Observación que indica resultado positivo
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado rojo a naranja
	Mayer	Precipitado blanco a crema
	Wagner	Precipitado marrón
Cardiotónicos	Baljet	Coloración roja, naranja-rojiza
	Kedde	Coloración roja a azul-violeta
	Raymond-Marthoud	Coloración roja, naranja-rojiza
	Keller-Killiani	Coloraciones intensas
Cumarinas volátiles	Papel impregnado con NaOH	Fluorescencia amarilla bajo luz UV
Flavonoides	Reacción de Shinoda	Coloración naranja, rojo-púrpura
Saponinas	Formación de espuma	Espuma estable por 15 min
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	Coloración verde, azul verdoso, vía rojo al azul
	Salkowski	Coloración amarilla-rojo
Taninos	Reacción con cloruro férrico	Coloración azul o verde
	Reactivo de gelatina, gelatina+sal, sal	Precipitado blanco solo en tubos con gelatina y gelatina+sal
Derivados antracénicos libres	Reacción de Bornträger	Coloración rojiza en fase acuosa
	Reacción con acetato de magnesio	Coloración roja

### 5.8.3 Determinación de cumarinas volátiles

En un tubo de ensayo se adicionaron 2,00 mL del extracto etanólico, se tapó con un papel filtro previamente impregnado en una solución diluida de NaOH y se llevó a baño de agua a 100 °C por algunos minutos. Seguidamente el papel filtro se examinó bajo luz ultravioleta.

### 5.8.4 Determinación de flavonoides

1,00 mL de extracto etanólico se adicionó en un tubo de ensayo, a continuación, se agregaron algunos fragmentos de magnesio y por las paredes del tubo se adicionaron gotas de HCl diluido.

### 5.8.5 Determinación de taninos

Se evaporaron 1,25 mL del extracto etanólico y el residuo se disolvió en 2,50 mL de agua destilada. Esta solución se dividió en 4 tubos de ensayo en los cuales se agregaron 3 gotas de cloruro férrico 10 %, 5 gotas de solución de gelatina, 5 gotas de solución de gelatina+sal y 5 gotas de solución salina, respectivamente.

#### **5.8.6 Determinación de saponinas**

En un tubo de ensayo se evaporaron 2,50 mL de extracto etanólico y a continuación se agregó agua hirviendo. Se dejó enfriar, se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 15 minutos.

#### **5.8.7 Determinación de triterpenos y/o esteroides**

Se llevaron a sequedad 1,25 mL de extracto etanólico, se adicionó el mismo volumen de cloroformo y esta solución se dividió en dos porciones, en las que se realizaron las reacciones de Liebermann-Burchard y Salkowski, respectivamente. Para la reacción de Liebermann-Buchard se agregaron algunas gotas de anhídrido acético y 3,00 mL de ácido sulfúrico concentrado y la prueba de Salkowski se realizó adicionando 0,30 mL de ácido sulfúrico concentrado.

#### **5.8.8 Determinación de derivados antracénicos libres**

En un tubo de ensayo se colocaron 0,20 g de ajo seco, se adicionaron 5,00 mL de cloroformo, se agitó y se dejó en reposo por 15 min. A continuación, la fase clorofórmica se separó y se dividió en dos tubos de ensayo, realizando en el primero la reacción de Bornträger y en el segundo se adicionó 1,00 mL de acetato de magnesio 0,5 %.

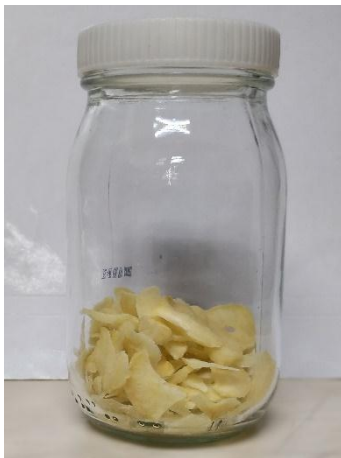
### **5.9 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de los diseños experimentales se analizaron mediante la versión de prueba gratuita de 30 días del software Minitab 18, calculando para cada uno de ellos análisis de varianza (ANOVA), interacciones entre factores y efectos principales. Las pruebas se realizaron con un nivel de confianza del 95 %.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Determinación de contenido de humedad del ajo macho

Tras aproximadamente 24,5 horas que tomó la muestra de ajo en llegar a peso constante en la estufa a 40 °C, esta se almacenó en un frasco de vidrio en desecador (Figura 13), para protegerla de humedad y contaminantes que la pudieran deteriorar. El porcentaje de humedad obtenido fue de 68,83 %.

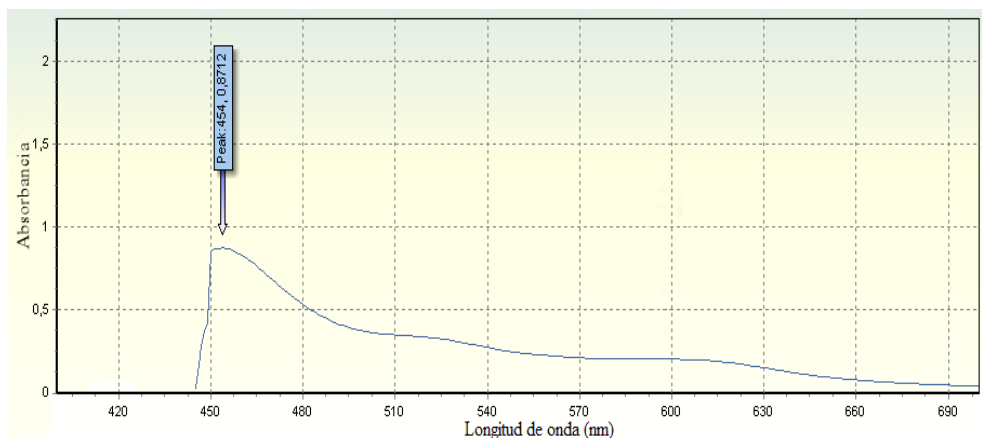


**Figura 13.** Ajo seco para extracción de saponinas

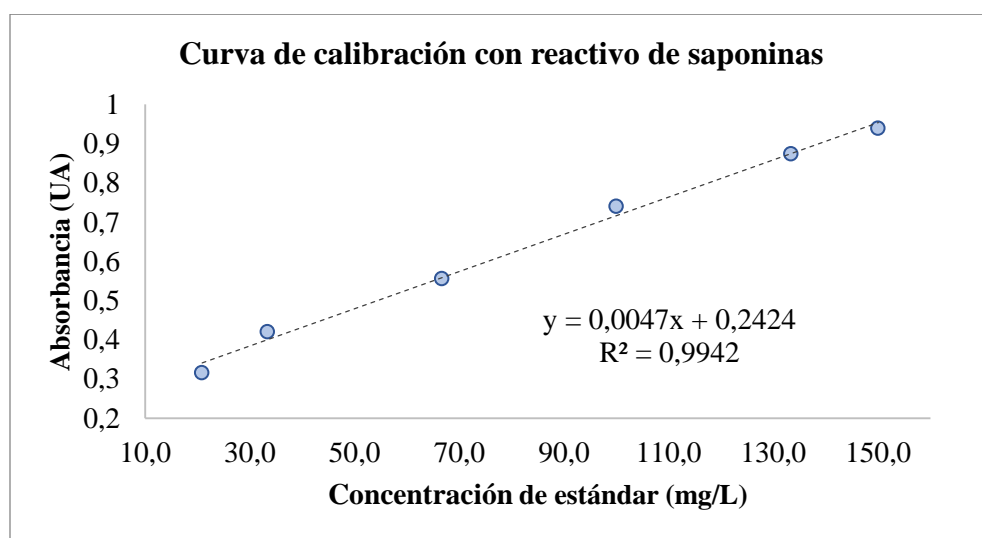
### 6.2 Cuantificación de saponinas totales extraídas

Una vez realizadas las extracciones con las condiciones establecidas en los diseños experimentales se procedió a cuantificar el contenido de saponinas extraídas; inicialmente fue necesario identificar la longitud de onda de mayor absorción a partir de un barrido en el espectrofotómetro UV-Vis, obteniendo 454 nm como longitud de onda de máxima absorción (Figura 14). Enseguida se midió la absorbancia de cada uno de los seis estándares de la curva de calibración (Figura 15), obteniendo la ecuación  $y = 0,0047x + 0,2424$ , mediante la cual se calculó la concentración de las saponinas extraídas en cada una de las muestras. El proceso de cuantificación de las muestras puede realizarse utilizando los extractos totales obtenidos tras cada extracción, sin embargo se realiza el paso adicional del fraccionamiento con n-butanol en un intento por purificar las saponinas extraídas, eliminando fracciones que pueden provocar interferencias en el momento de la cuantificación, obteniéndose así sobreestimaciones en el contenido de saponinas totales (Makkar et al., 2007). A pesar de que hay autores que afirman que esta metodología es imprecisa ya que algunos compuestos como los polifenoles pueden quedar en la fase butanólica y que incluso las saponinas más polares no tienen la suficiente afinidad para ser extraídas por el butanol (Tenon et al., 2017), la mayoría de investigaciones de extracción y cuantificación de todo tipo de saponinas de diversas fuentes vegetales han utilizado este sencillo paso de purificación con buenos resultados, por lo que se optó por incluir dicho paso en el presente trabajo.





**Figura 14.** Barrido para determinación de longitud de onda de máxima absorción



**Figura 15.** Curva de calibración para cuantificación de saponinas

### 6.3 Diseño experimental factorial $2^3$

Una vez establecidas las condiciones de extracción para este diseño experimental, se realizaron las extracciones de acuerdo a las condiciones de cada tratamiento y la posterior cuantificación de las saponinas, obteniendo los resultados consignados en la Tabla 5.

A partir de estos resultados se realizó el análisis de varianza (ANOVA) que se observa en la Tabla 6. En este se encuentra que los efectos de tres variables analizadas en el diseño son estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ). De igual forma, el efecto de la interacción entre el tiempo de extracción y la relación de solvente es estadísticamente significativo. Esto se puede apreciar de mejor forma en el diagrama de Pareto obtenido para este diseño (Figura 16), donde las variables cuyo efecto es significativo estadísticamente hablando, son las que cruzan la línea de referencia. Además, se observa que el mayor efecto corresponde a la relación de solvente, seguido por el tiempo de extracción y el tipo de extracción, y

finalmente la interacción entre el tiempo y la relación de solvente. Las otras interacciones presentadas no tienen un efecto significativo sobre el contenido de saponinas totales.

**Tabla 5.** Resultados del diseño experimental factorial  $2^3$  para la extracción y cuantificación de saponinas totales de ajo macho

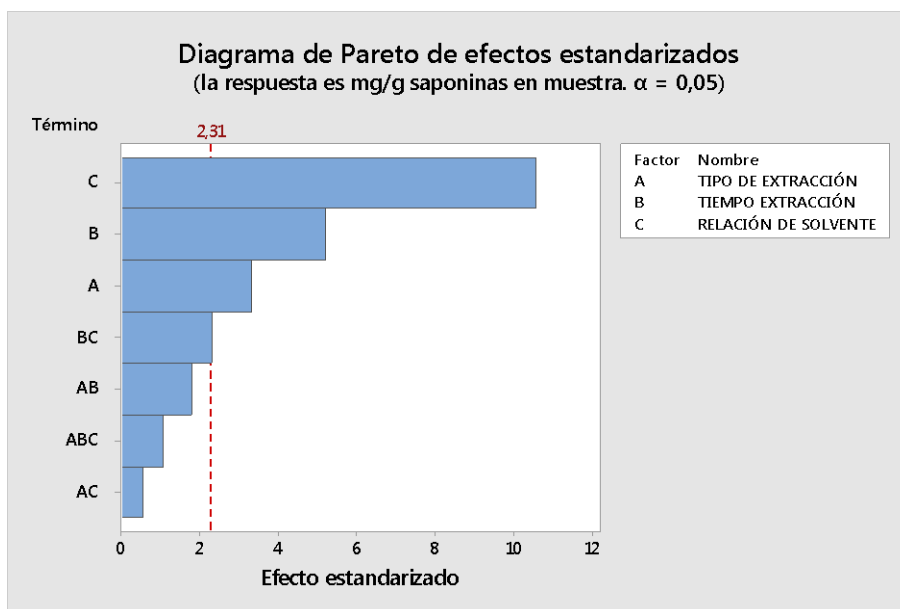
Tratamiento	Técnica de extracción	Tiempo de extracción (min)	Relación de solvente (%)	Saponinas totales (mg/g)	
				R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1	EAM	12	50	34,22	41,37
2	EAU	12	50	56,00	47,28
3	EAM	30	50	76,97	59,04
4	EAU	30	50	74,70	102,4
5	EAM	12	90	7,806	8,246
6	EAU	12	90	6,292	8,783
7	EAM	30	90	5,818	10,64
8	EAU	30	90	35,98	30,60

**Tabla 6.** ANOVA del diseño experimental factorial  $2^3$  para extracción de saponinas

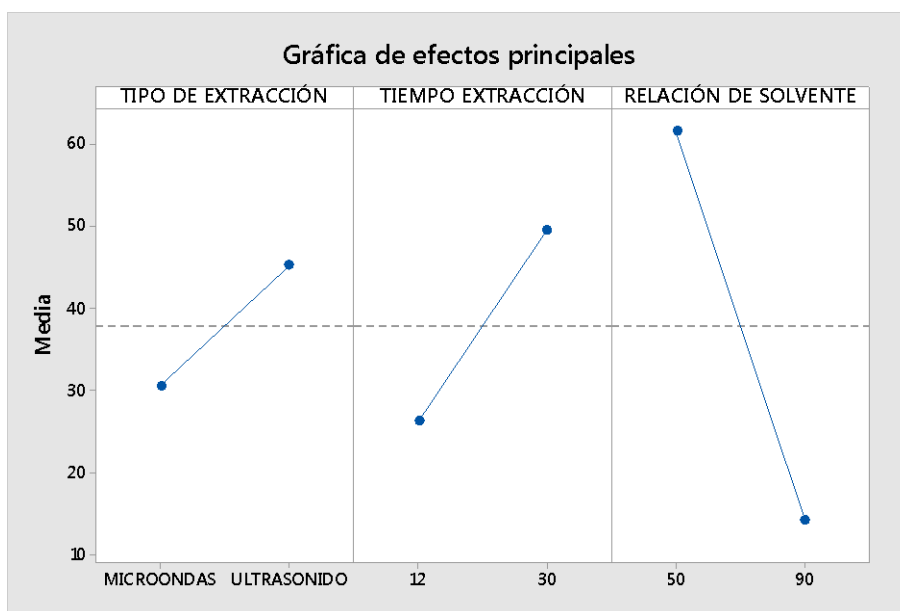
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	12747,6	1821,09	22,91	0,000
Lineal	3	11951,8	3983,94	50,11	0,000
Tipo de extracción	1	868,3	868,28	10,92	0,011
Tiempo extracción	1	2164,6	2164,57	27,23	0,001
Relación de solvente	1	8919,0	8918,96	112,19	0,000
Interacciones de 2 términos	3	706,8	235,60	2,96	0,097
tipo de extracción*tiempo extracción	1	259,6	259,61	3,27	0,108
tipo de extracción*relación de solvente	1	24,0	23,97	0,30	0,598
tiempo extracción*relación de solvente	1	423,2	423,21	5,32	0,050
Error	8	636,0	79,50		
Total	15	13383,6			

De igual manera se obtuvo la gráfica de efectos principales para evaluar el efecto que cada factor tiene sobre el contenido de saponinas totales extraído (Figura 17). Se observa que la EAU favorece la extracción de las saponinas sobre la EAM, esto es debido posiblemente a que los efectos asociados a la EAU son más eficientes en la disrupción del material vegetal, haciendo más efectivo el contacto del solvente con la muestra y mejorando así la transferencia de las saponinas al solvente; además, debe tenerse en cuenta que la extracción se realizó a temperatura ambiente y que el principio de la EAM es la capacidad de la muestra y el solvente de absorber energía para precisamente aumentar su temperatura y de esta manera aumentar la solubilidad de las saponinas en el solvente, así como también disminuir la viscosidad del solvente y mejorar su penetración en la matriz, lo que

posiblemente no se produjo o se produjo de manera deficiente debido al estricto control de la temperatura que se realizó en las extracciones, al no permitir que esta se elevara por encima de los 25 °C, además de que la muestra se usó en estado seco. Autores como Arya y Kumar (Arya & Kumar, 2021) encontraron esta misma tendencia al comparar estas dos técnicas en la extracción de diosgenina de semillas de fenogreco.



**Figura 16.** Diagrama de Pareto para el diseño experimental factorial  $2^3$



**Figura 17.** Gráfica de efectos principales para el diseño experimental factorial  $2^3$

En cuanto al tiempo de extracción, los resultados muestran que los tiempos de extracción escogidos proporcionan contenidos de saponinas extraídas significativamente diferentes, sin embargo, es importante resaltar que, aún con tiempos menores se logra alcanzar la

extracción de saponinas. Se observa que el mayor tiempo evaluado en el diseño (30 min) es el que favorece la mayor extracción de saponinas. De hecho, se ha observado que los tiempos de extracción escogidos en estudios de optimización son generalmente iguales o mayores a los 20 min, llegando algunos incluso a más de 120 min, sobretodo en EAU, como es el caso de Hadidi y colaboradores (Hadidi et al., 2020). Para EAM se utilizan tiempos más cortos de extracción debido a que un largo tiempo de irradiación puede producir la degradación de las saponinas, como lo afirma Ren y colaboradores (Ren et al., 2015).

Por otra parte, como ya se mencionó, la relación de solvente es el factor cuyo efecto sobre el contenido de saponinas totales es de mayor magnitud, esto se evidencia en la inclinación de la pendiente de la gráfica (Figura 17). La extracción de saponinas se ve favorecida con la menor relación de solvente evaluada en este diseño (50 %). Posiblemente la polaridad de una solución de etanol con baja proporción de agua no es suficiente para extraer en su totalidad, compuestos con una polaridad alta como la de las saponinas, otorgada por sus cadenas de azúcares, las cuales pueden llegar a contener dos o más residuos; esto basado en las características estructurales observadas en las saponinas de ajo extraídas por Diretto y colaboradores (Diretto et al., 2017) que se mencionaron anteriormente y se muestran en la Figura 7. Según lo anterior, se necesita la adición de un solvente más polar como el agua para mejorar el rendimiento de la extracción de estos compuestos, tal como afirman Akbari y colaboradores (Akbari et al., 2019; Akbari et al., 2021) quienes observaron que utilizar etanol con relaciones por encima del 60 %, es decir, con baja proporción de agua, provoca la disminución significativa del rendimiento de extracción de saponinas en dos investigaciones diferentes. Así mismo, autores como Hu y colaboradores (Hu et al., 2008) establecieron la concentración de etanol entre 47-50 % como variable optimizada para la extracción de saponinas de la especie *Radix bupleuri*.

La gráfica normal de efectos estandarizados (Figura 18) permite apreciar de mejor manera la dirección de los efectos de cada una de las variables analizadas. Al observar en la gráfica las representaciones de las variables tipo y tiempo de extracción, las cuales se ubican a la derecha de la línea normal de distribución indicando que sus efectos son positivos en la extracción, se confirma que las dos variables aumentan el contenido de saponinas totales extraídas cuando se pasa del valor bajo al valor alto de dichas variables, es decir de EAM (considerada como valor bajo en el diseño) a EAU (considerada valor alto) y de 12 min de extracción a 30 min. Por el contrario, la relación del solvente se encuentra a la izquierda de la línea normal de distribución, por lo que su efecto es negativo en la extracción y disminuye el contenido de saponinas extraído al pasar de 50 % a 90 %. Además, la interacción tiempo de extracción\*relación de solvente, ubicada a la izquierda de la línea, indica que tiene un efecto sinérgico negativo y disminuye el contenido de saponinas extraído.

Para este diseño experimental se realizaron también gráficas de interacciones (Figura 19), que muestran la media ajustada del contenido de saponinas totales en función de las combinaciones de tipo de extracción, tiempo de extracción y la relación de solvente. En la gráfica de interacción tipo de extracción\*tiempo de extracción se observa que el efecto del tiempo de extracción sobre el contenido de saponinas totales es mayor cuando la extracción se realiza por EAU, que cuando se realiza por EAM; sin embargo, este efecto no es

significativo, como ya se mencionó. Por otro lado, en la gráfica de interacción tipo de extracción\*relación de solvente se observa que el efecto de la relación de solvente sobre el contenido de saponinas totales es prácticamente el mismo tanto en la EAM como en la EAU. Finalmente, en la gráfica de interacción entre el tiempo de extracción\*relación de solvente, cuyo efecto sí es significativo estadísticamente, la relación de solvente ejerce un efecto mayor al realizar la extracción durante 30 min; además, la relación 50 % de etanol y 30 min de extracción están asociados a un mayor contenido de saponinas totales extraídas.

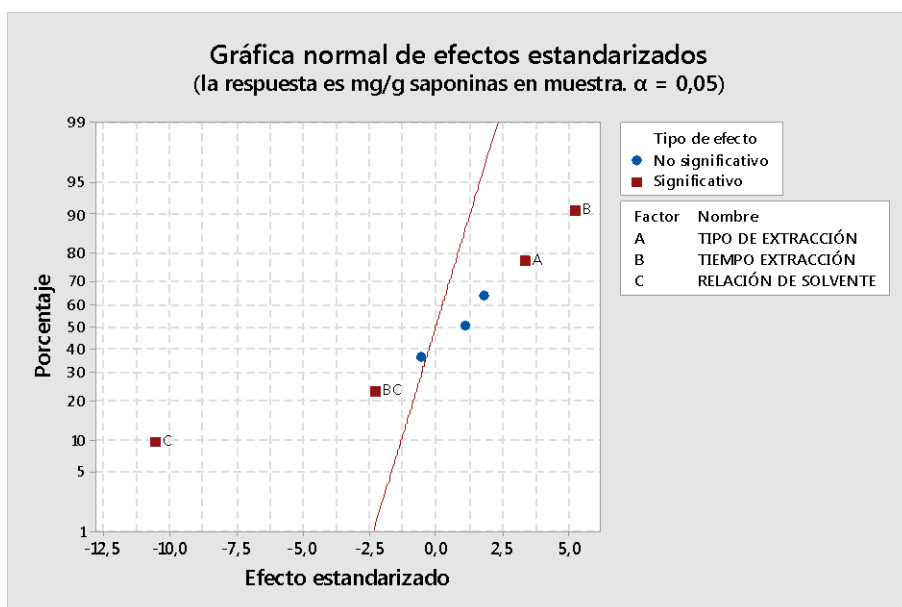


Figura 18. Gráfica normal de efectos estandarizados para el diseño experimental  $2^3$

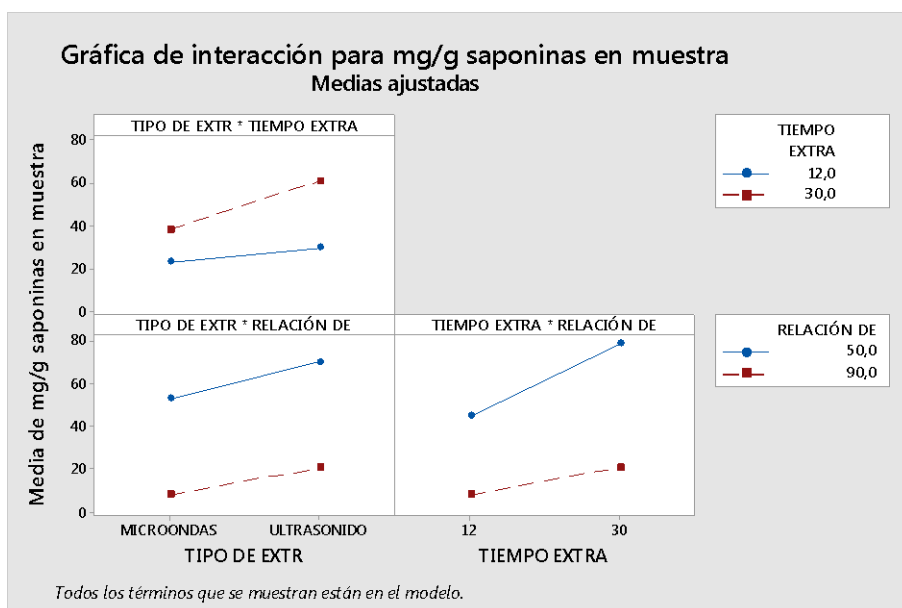


Figura 19. Gráfica de interacciones entre las variables del diseño experimental  $2^3$

## 6.4 Diseño experimental factorial 2<sup>2</sup>

Tras realizar las extracciones de acuerdo a los tratamientos establecidos para este diseño, en el que se plantea la DMFS como técnica de extracción, y la posterior cuantificación, se obtuvieron los siguientes resultados para el contenido de saponinas totales en el ajo macho (Tabla 7).

**Tabla 7.** Resultados de diseño experimental 2<sup>2</sup> para extracción de saponinas

Tratamiento	Fase	Solvente	Saponinas totales (mg/g)	
			R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1	Sílica	Diclorometano	2,325	1,486
2	C <sub>18</sub>	Diclorometano	0,7910	1,133
3	Sílica	Metanol	49,14	58,58
4	C <sub>18</sub>	Metanol	26,49	36,83

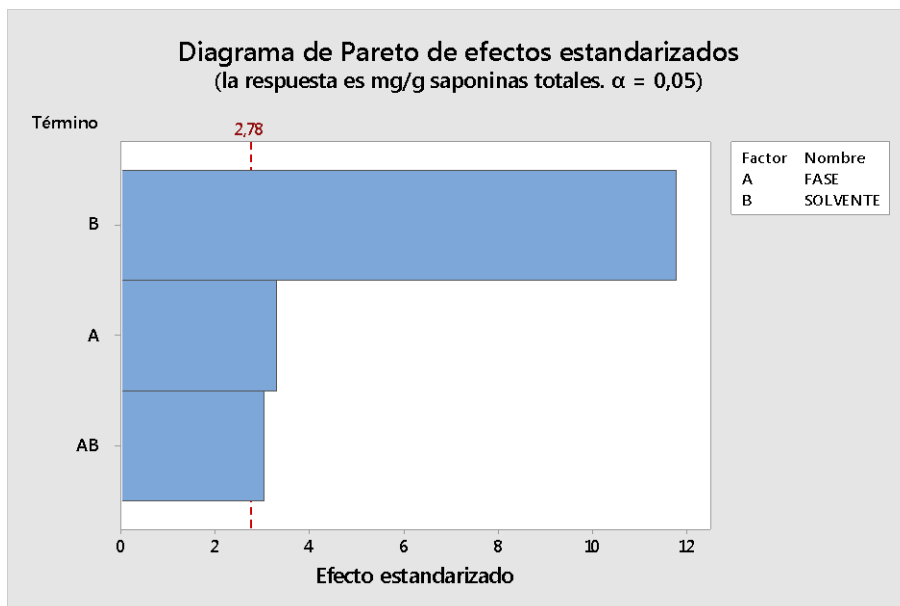
Con base en estos resultados se desarrolló el análisis estadístico de los mismos, obteniendo en primer lugar el ANOVA consignado en la Tabla 8. En este caso se observa que las dos variables evaluadas, el tipo de fase y de solvente, son estadísticamente significativas en la extracción de saponinas, así como su interacción ( $p < 0,05$ ). Una representación de esto se puede visualizar en el diagrama de Pareto de este diseño experimental (Figura 20), ya que las barras de las dos variables como su interacción superan la línea de referencia. En este diseño la variable que presenta el mayor efecto en el contenido de saponinas totales extraídas es el solvente utilizado, seguida del tipo de fase y el menor efecto lo presenta la interacción de las variables.

**Tabla 8.** ANOVA del diseño experimental factorial 2<sup>2</sup> para extracción de saponinas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	3909,01	1303	52,97	0,001
Lineal	2	3683,15	1841,57	74,86	0,001
Fase	1	267,74	267,74	10,88	0,030
Solvente	1	3415,40	3415,40	138,84	0,000
Interacciones de 2 términos	1	225,86	225,86	9,18	0,039
Fase*Solvente	1	225,86	225,86	9,18	0,039
Error	4	98,40	24,60		
Total	7	4007,40			

Los efectos de las variables en la extracción de saponinas totales mediante la técnica de DMFS se pueden observar mediante la gráfica de efectos principales (Figura 21). Esta muestra que el tipo de fase influye en el contenido de saponinas extraídas, siendo este mayor cuando se utiliza la sílica gel. Esto puede estar relacionado con la polaridad de las saponinas extraídas, que como ya se mencionó anteriormente, probablemente es alta; al

tener la sílica gel una polaridad mayor que la C<sub>18</sub>, la interacción de las saponinas con la sílica es mejor. Aunque en general son muy escasas las investigaciones donde se evalúe el efecto de la fase en la extracción de saponinas, Shi y colaboradores (Shi et al., 2011) encontraron la misma tendencia en la extracción de ginsenósidos mediante esta técnica.

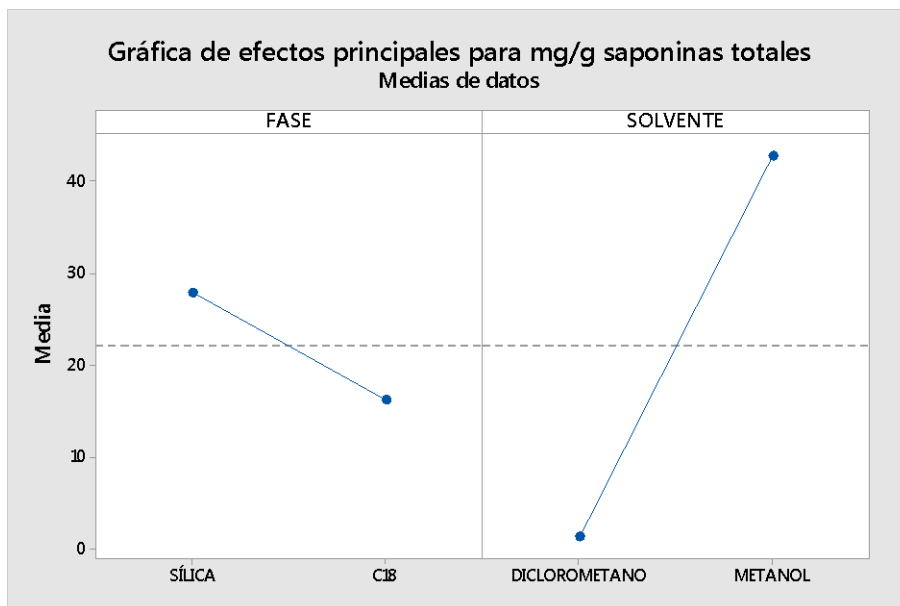


**Figura 20.** Diagrama de Pareto del diseño experimental factorial 2<sup>2</sup>

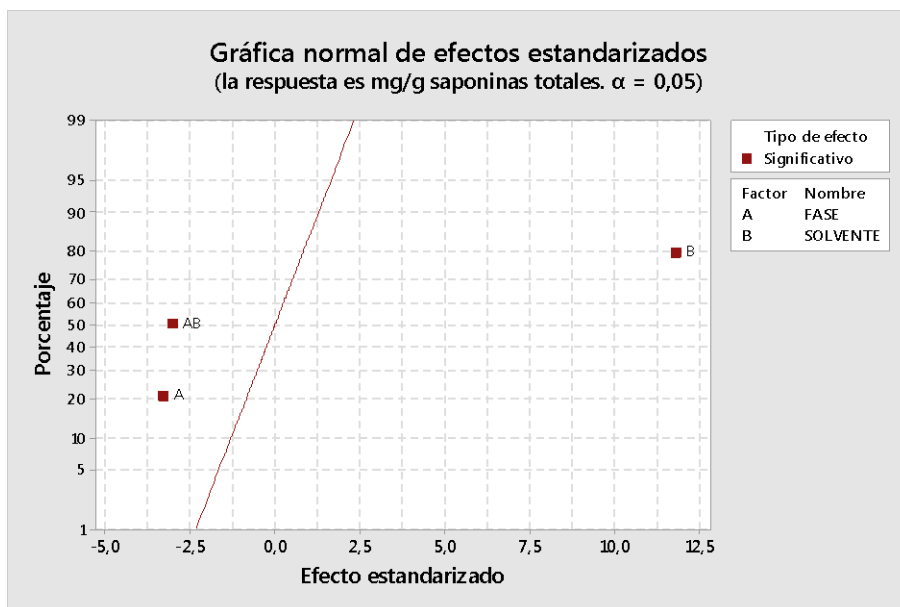
El solvente es la variable con el mayor efecto sobre la extracción de las saponinas mediante DMFS en el diseño experimental planteado, como se observa en la Figura 21; la extracción se ve favorecida por el uso de metanol como solvente de elución, pues el diclorometano disminuye significativamente el contenido de saponinas totales extraídas. En este caso, la polaridad del solvente juega un papel importante en la extracción, teniendo en cuenta que, aunque los dos solventes utilizados son polares, la polaridad del metanol es mayor, por lo que puede romper más fácilmente las interacciones entre las saponinas y la fase. En un estudio realizado por Tapera y Machacha (Tapera & Machacha, 2017), tras evaluar la presencia de saponinas extraídas por DMFS en tres solventes de elución de diferentes polaridades, siendo el metanol el más polar, encontraron que solo el extracto metanólico mostró presencia de saponinas.

Mediante la gráfica de efectos estandarizados presentada en la Figura 22 se aprecia la dirección de los efectos del tipo de fase y tipo de solvente empleados en la extracción; la primera variable se encuentra a la izquierda de la línea normal de distribución, es decir que tiene un efecto negativo en la extracción pues disminuye el contenido de saponinas extraídas si en la extracción se cambia la sílica por la C<sub>18</sub>; mientras que al cambiar el diclorometano por el metanol como solvente de elución, se aumenta el contenido de saponinas totales extraídas, de acuerdo al diseño experimental planteado con DMFS, ya que el solvente se encuentra a la derecha de la línea normal de distribución, indicando un efecto positivo de esta variable en la extracción. También se observa que la interacción de estas dos variables tiene un efecto negativo, es decir, disminuye el contenido de saponinas extraído. Además, aunque los dos efectos son significativos, se observa que el efecto de la

interacción de las variables es más parecido al efecto del tipo de fase, por lo cual la interacción reduce el contenido de saponinas extraídas.



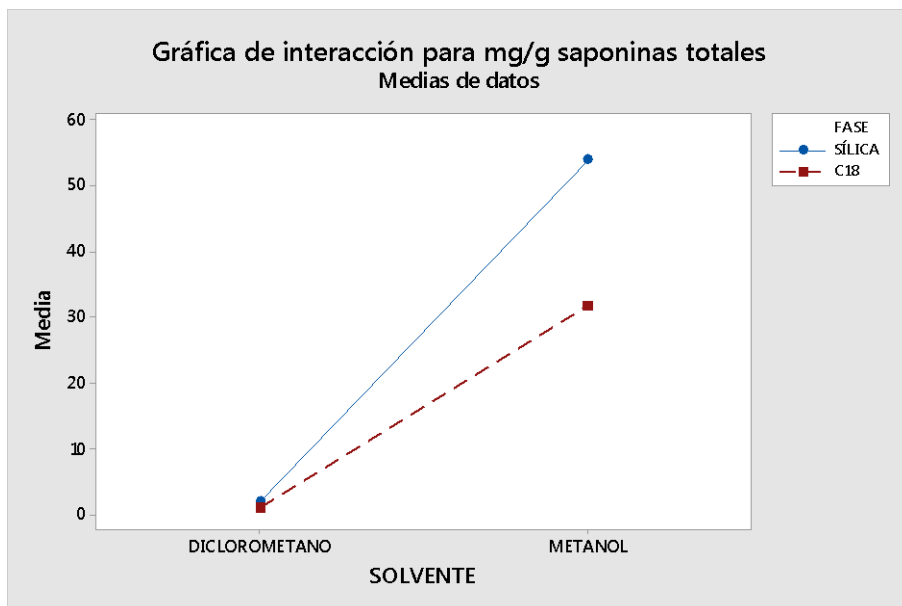
**Figura 21.** Gráfica de efectos principales en el diseño experimental factorial  $2^2$



**Figura 22.** Gráfica normal de efectos estandarizados para diseño experimental  $2^2$

La gráfica de interacciones (Figura 23) muestra que cuando la extracción se realiza con diclorometano como solvente de elución, el contenido de saponinas extraído es prácticamente el mismo para los dos tipos de fase utilizada; pero cuando se utiliza metanol, el contenido de saponinas totales extraído es significativamente diferente con una fase u otra. Además, el uso de metanol y sílica para la extracción de saponinas se asocia con los contenidos más altos de saponinas totales.





**Figura 23.** Gráfica de interacciones en el diseño experimental factorial 2<sup>2</sup>

### 6.5 Comparación de contenido de saponinas de ajo macho con otras variedades

Tomando en consideración los contenidos de saponinas totales obtenidos mediante las diferentes técnicas de extracción, que varían entre 6,292 – 102,4 mg/g al utilizar EAU, 5,818 – 76,97 mg/g al utilizar EAM y 0,7910 – 58,58 mg/g al utilizar DMFS, es evidente que las condiciones que ofrecen los mejores rendimientos de extracción de saponinas totales del ajo macho son la extracción asistida por ultrasonido, con etanol 50% como solvente y un tiempo de extracción de 30 min, dividido en tres extracciones sucesivas de 10 min cada una.

Las condiciones de extracción aplicadas en este trabajo proporcionan mejores rendimientos que los de otras investigaciones que reportan el contenido de saponinas en bulbos de ajo, sin embargo, es necesario mencionar que el objetivo general de la mayoría de dichos estudios no es cuantificar las saponinas, sino evaluar algunas características de los extractos totales o las propiedades biológicas de las saponinas en estos. Una de estas investigaciones es la de Farid y colaboradores (Farid et al., 2022), en la que se determinó un contenido de saponinas de 4,9 % (49 mg/g) en bulbos de ajo, siguiendo una metodología de extracción por triturado mediante licuadora, con agua como solvente. También Bravo-Núñez y colaboradores (Bravo-Núñez et al., 2019), quienes obtuvieron el extracto de ajo al someter el ajo macerado con agua como solvente a un calentamiento de dos horas a 50 °C. Los investigadores reportaron contenidos de saponinas totales extraídas entre 0,06 – 0,9 % (0,6 mg/g – 9,0 mg/g).

Asimismo, como ya se mencionó anteriormente, Lanzotti y colaboradores (Lanzotti et al., 2012) realizaron la extracción de saponinas del ajo variedad Voghiera, una variedad típica italiana. Aunque no especificaron la metodología de extracción, reportaron el uso de

acetona como solvente de extracción y una posterior partición con agua y butanol. A partir de esto lograron extraer y elucidar la estructura de diez saponinas de tipo furostanol y dos saponinas de tipo espirostanol, para un contenido de saponinas totales de 40 mg/kg (0,04 mg/g), un rendimiento considerablemente bajo en comparación con los obtenidos en el presente trabajo.

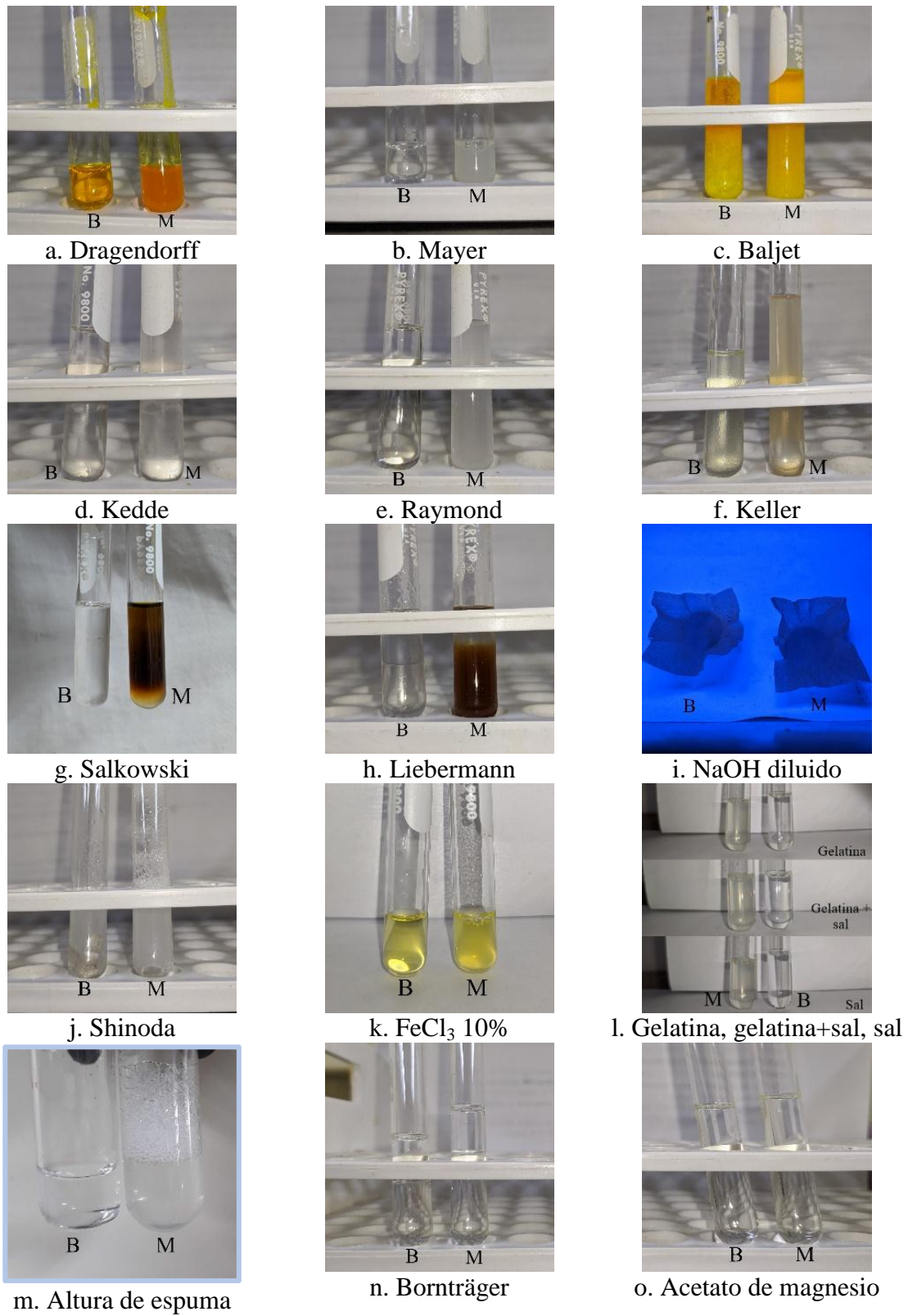
## 6.6 Tamizaje fitoquímico

Una vez obtenidos los contenidos de saponinas totales con las tres técnicas de extracción evaluadas, se realizó el tamizaje fitoquímico preliminar en los EET con los mejores rendimientos, es decir los que fueron obtenidos mediante EAU, utilizando etanol 50% como solvente y con un tiempo de extracción de 30 min. En la Tabla 9 se observan los resultados del tamizaje fitoquímico, donde, mediante diferentes pruebas colorimétricas que revelan la presencia de metabolitos secundarios, se observó la presencia de al menos dos tipos de metabolitos secundarios en el EET del bulbo de ajo macho.

**Tabla 9.** Resultados del tamizaje fitoquímico preliminar del EET de bulbos de ajo macho

Tipo de metabolito	Ensayo en tubo	Resultado
Alcaloides	Dragendorff	+
	Mayer	+
	Wagner	+
Cardiotónicos	Baljet	-
	Kedde	-
	Raymond-Marthoud	-
	Keller-Killiani	-
Cumarinas volátiles	Papel impregnado con NaOH	-
Flavonoides	Reacción de Shinoda	-
Saponinas	Formación de espuma	+
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	-
	Salkowski	+
Taninos	Reacción con cloruro férrico	-
	Reactivo de gelatina, gelatina+sal, sal	-
Derivados antracénicos libres	Reacción de Bornträger	-
	Reacción con acetato de magnesio	-

Interpretación: (+) metabolito presente, (-) metabolito ausente



**Figura 24.** Resultados de las diferentes pruebas colorimétricas en el tamizaje fitoquímico de EET de bulbos de ajo macho. B: blanco. M: muestra

### **6.6.1 Determinación de alcaloides**

En las tres pruebas realizadas para la determinación de alcaloides se obtuvieron resultados considerados positivos, ya que en la prueba de Dragendorff se observó una coloración naranja con un leve precipitado también naranja. En la prueba de Mayer se observó una turbidez blanca con leve precipitado (Figura 24, a y b) y en la prueba de Wagner se presentó una coloración marrón con leve formación de precipitado. Se esperaba este resultado ya que el ajo pertenece a la familia Amaryllidaceae, la cual se considera fuente de gran diversidad de alcaloides, tales como licorina, homolicorina, crinamina, galantamina, entre otros (Nair & Van Staden, 2021).

### **6.6.2 Determinación de cardiotónicos**

En primer lugar, se llevó a cabo la prueba de Baljet con el fin de comprobar la presencia de anillos lactónicos propios de este tipo de metabolitos, mediante la observación de una coloración naranja-rojiza en la muestra tras adicionar el reactivo, pero se obtuvo una coloración amarilla, igual tanto para el control negativo como para la muestra (Figura 24,c), por lo cual esta prueba se considera negativa.

A continuación, se realizó la prueba de Kedde, con la que se evalúa la presencia de cardiotónicos de tipo cardenólido, que son los que poseen un anillo lactónico de cinco miembros. Al agregar el reactivo no se observó ninguna coloración en el tubo con la muestra (Figura 24, d), por tanto esta prueba se considera negativa. De igual forma, la prueba de Raymond-Marthoud también revela la presencia de cardiotónicos cardenólidos; al realizar la prueba no se observó la coloración naranja esperada en la muestra (Figura 24, e) por ello, esta prueba también se considera negativa.

La prueba de Keller-Kiliani se realiza para determinar la presencia de desoxiazúcares, los cuales conforman la estructura de los cardiotónicos. Al llevar a cabo la prueba, no se observaron coloraciones intensas, características de un resultado positivo para estos compuestos (Figura 24, f) por tanto esta prueba se considera negativa.

De acuerdo a los resultados de este conjunto de pruebas realizadas para determinar la presencia de cardiotónicos en el EET de bulbos de ajo macho, estos se consideran como ausentes.

### **6.6.3 Determinación de cumarinas volátiles**

Al exponer el papel filtro impregnado con NaOH diluido a la luz ultravioleta, no se observó la fluorescencia amarilla esperada (Figura 24, i), por lo que esta prueba se toma como negativa para la presencia de cumarinas volátiles en el EET.

### **6.6.4 Determinación de flavonoides**

Al realizar la prueba colorimétrica no se observó ningún cambio de color en el tubo con la muestra, incluso no hubo diferencia con el control negativo (Figura 24, j). Por lo tanto, esta prueba se considera negativa para la presencia de flavonoides en el EET. Sin embargo, esto

no implica necesariamente que el ajo macho no contiene flavonoides, más cuando se ha reportado la presencia de flavonoides como miricetina y apigenina en el ajo común (Rizwani & Shareef, 2011).

En otras investigaciones donde se han evaluado los metabolitos secundarios del bulbo de ajo en extractos obtenidos en solventes con diferentes polaridades, los flavonoides se reportaron como ausentes en cada uno de estos extractos (Meriga et al., 2012). Por otra parte, Ameh y Nwammoh (Ameh & Nwammoh, 2010) reportaron la presencia de flavonoides en bajas concentraciones, en el extracto acuoso de bulbos de ajo.

#### **6.6.5 Determinación de taninos**

Tras llevar a cabo la adición del cloruro férrico en el tubo con la muestra, no se evidenció un cambio de color; este permaneció igual al color del control negativo. Tampoco se observó la formación de precipitado en los tubos con solución de gelatina y gelatina + sal. (Figura 24, k y l). Por lo tanto, se considera que no hay presencia de taninos en el EET de bulbos de ajo macho. También Wilson y colaboradores (Wilson et al., 2019) reportaron la ausencia de taninos en extractos de bulbo de ajo obtenidos con varios solventes de diferente polaridad; de igual forma Sulaiman y colaboradores (Sulaiman et al., 2014) y Ameh y Nwammoh (Ameh & Nwammoh, 2010) reportaron la ausencia de estos metabolitos en el extracto acuoso del bulbo de ajo.

#### **6.6.6 Determinación de saponinas**

Tras realizar la prueba se observó en el tubo de la muestra la formación de una cantidad considerable de espuma con burbujas de tamaño mediano, una vez transcurridos los 15 min se observó que la espuma permaneció en el tubo (Figura 24, m), lo que confirmó la presencia de saponinas en el EET de bulbos de ajo macho. Numerosas investigaciones reportan la presencia de saponinas en extractos de ajo común; un aspecto importante de dichas investigaciones es que los autores reportan la presencia de saponinas en extractos metanólicos, etanólicos y/o acuosos, y no en extractos con solventes de carácter apolar, en donde reportan ausencia de estos metabolitos. Ejemplos de estas investigaciones son las realizadas por Wilson y colaboradores (Wilson et al., 2019) y Meriga y colaboradores (Meriga et al., 2012).

#### **6.6.7 Determinación de triterpenos o esteroides**

Al realizar la prueba de Salkowski, la cual permite determinar la presencia de esteroides en el EET, se obtuvo un resultado positivo al observar la coloración esperada (Figura 24, g). Por otra parte, al realizar la prueba de Liebermann no se observó la coloración verde-azul esperada. A pesar de que la muestra presentó coloración diferente a la del control negativo (Figura 24, h) este resultado se considera negativo.

En la literatura se reporta la presencia o ausencia de estos metabolitos indistintamente de la prueba realizada; Wilson y colaboradores (Wilson et al., 2019) reportaron la presencia de triterpenoides en extractos acuosos de bulbos de ajo mediante la prueba de Salkowski positiva; Ameh y Nwammoh (Ameh & Nwammoh, 2010) establecieron la prueba de

Salkowski como específica para esteroides y reportaron su presencia en extractos etanólicos de bulbo de ajo al obtener un resultado positivo en esta prueba, mientras que con la prueba de Liebermann reportaron la ausencia de triterpenos debido al resultado negativo de la misma.

#### **6.6.8 Determinación de derivados antracénicos libres**

Al realizar la prueba de Bornträger se esperaba observar una coloración rojiza en la fase acuosa de la muestra, sin embargo esto no sucedió (Figura 24, n) por lo tanto esta prueba se toma como negativa. De igual forma la adición de acetato de magnesio no tuvo ningún efecto en la muestra (Figura 24, o), de manera que esta prueba también se considera negativa, interpretando estos resultados como la ausencia de derivados antracénicos libres en el EET de bulbo de ajo macho. En pocas investigaciones reportan la presencia o ausencia de estos metabolitos; Divya y colaboradores (Divya et al., 2017) reportaron la ausencia de ellos en extractos metanólicos y acuosos de dientes de ajo, pero encontraron su presencia en extractos de solventes apolares como hexano y acetato de etilo.

## 7. CONCLUSIONES

Se implementó el análisis de variables, su interacción e influencia mediante diseño experimental factorial, en la extracción de saponinas totales del bulbo de ajo macho (*Allium sativum*) cultivado en el Departamento del Cauca, encontrando que las diferentes metodologías de extracción aplicadas de acuerdo a los diseños experimentales propuestos en este trabajo, son apropiadas y permiten lograr la extracción de las saponinas en mayor o menor medida, según las condiciones que sean utilizadas.

Los contenidos de saponinas totales extraídos del bulbo de ajo macho varían de acuerdo a la técnica de extracción utilizada, encontrándose entre 6,292 – 102,4 mg/g al emplear la extracción asistida por ultrasonido; 5,818 – 76,97 mg/g al utilizar la extracción asistida por microondas y 0,7910 – 58,58 mg/g al utilizar la dispersión de matriz en fase sólida como técnica extractiva.

La técnica de extracción asistida por ultrasonido, relación de solvente etanol 50 %, y tiempo de extracción de 30 minutos divididos en tres extracciones sucesivas, son las mejores condiciones para extraer mayores contenidos de saponinas totales presentes en el bulbo de ajo macho.

El solvente es la variable de extracción con el mayor efecto en el contenido de saponinas totales extraídas del bulbo de ajo macho, de acuerdo a los dos diseños experimentales planteados en este trabajo de investigación; los solventes con una polaridad alta, tales como etanol acuoso 50 % o metanol son más efectivos en la extracción de saponinas totales mediante las técnicas de extracción empleadas, debido al carácter altamente polar de estos metabolitos.

La dispersión de matriz en fase sólida, técnica muy poco reportada en la literatura para la extracción de metabolitos secundarios del ajo, permite la obtención de contenidos considerables de saponinas al emplear fases y solventes acordes al carácter polar de dichos compuestos, representando así una opción sencilla y conveniente para ser utilizada como técnica de extracción de las saponinas totales en el bulbo de ajo macho.

Se determinó la presencia de saponinas en el extracto etanólico total del bulbo de ajo macho mediante pruebas colorimétricas cualitativas establecidas por protocolo de tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total, así como la presencia de alcaloides y triterpenos o esteroides, metabolitos secundarios que se ha demostrado contribuyen a las diversas actividades biológicas atribuidas al bulbo de ajo.

Las extracciones de saponinas con un enfoque verde que se llevaron a cabo en este trabajo de investigación comprueban la viabilidad de la implementación de este tipo de metodologías verdes en la labor investigativa, educativa y científica, convirtiéndose en interesantes alternativas a las metodologías tradicionales que producen un impacto negativo a la salud y al ambiente.

## **8. RECOMENDACIONES**

Habiendo comprobado la presencia de saponinas en el bulbo del ajo macho descritas en el presente trabajo de investigación, se recomienda realizar estudios posteriores para la identificación y elucidación estructural de las mismas mediante técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas o la resonancia magnética nuclear protónica y de carbono 13.

Evaluar la actividad biológica de las saponinas presentes en el bulbo de ajo macho, con el fin de comprobar la existencia de propiedades antioxidantes, antifúngicas, citotóxicas, entre otras, que se atribuyen en la literatura a estos metabolitos secundarios.

De igual forma, se recomienda profundizar en el estudio de las propiedades químicas y biológicas del ajo macho y su extracto etanólico total, las cuales hasta el momento son desconocidas.



## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelrahman, M., Hirata, S., Mukae, T., Yamada, T., Sawada, Y., El-Syaed, M., Yamada, Y., Sato, M., Hirai, M. Y., & Shigyo, M. (2021). Comprehensive Metabolite Profiling in Genetic Resources of Garlic (*Allium sativum* L.) Collected from Different Geographical Regions. *Molecules*, 26, 1415.
- Ajami, M., & Vazirijavid, R. (2019). Garlic (*Allium sativum* L.). In *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements* (Issue 1, pp. 227–234). Elsevier Inc.
- Akbari, S., Abdurahman, N. H., Mohd, R., Abdurahman, A. H., & Ahmed, N. (2021). LC-QTOF-MS analysis of phenolics and saponins extracted from *Aloe vera* leaves via microwave technology in optimal condition. *South African Journal of Botany*, 139, 362–373.
- Akbari, S., Abdurahman, N. H., & Yunus, R. M. (2019). Optimization of saponins, phenolics, and antioxidants extracted from fenugreek seeds using microwave-assisted extraction and response surface methodology as an optimizing tool. *Comptes Rendus Chimie*, 22, 714–727.
- Alam, K., Hoq, O., & Uddin, S. (2016). Medicinal plant *Allium sativum* = A Review. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(6), 72–79.
- Albero, B., Sánchez-brunete, C., Miguel, E., & Tadeo, J. L. (2017). Application of matrix solid-phase dispersion followed by GC–MS/MS to the analysis of emerging contaminants in vegetables. *Food Chemistry*, 217, 660–667.
- Alzate, F., Lesmes, M., Cortés, N., Varela, S., & Osorio, E. (2019). Sinopsis de la familia Amaryllidaceae en Colombia. *Biota Colomb.*, 20(1), 2–20.
- Ameh, G. ., & Nwammoh, A. . (2010). Phytochemical and Ethnobotanical Evaluation of Garlic Bulb (*Allium sativum* L.). *Bio-Research*, 8(1), 618–621.
- Arya, P., & Kumar, P. (2021). Comparison of ultrasound and microwave assisted extraction of diosgenin from *Trigonella foenum graecum* seed. *Ultrasonics Sonochemistry*, 74(February), 105572.
- Barker, S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 151–162.
- Batiha, G. E.-S., Beshbishy, A. M., Wasef, L. G., Elewa, Y., Al-Sagan, A. A., El-Hack, A., Mohamed, E., Taha, A. E., Abd-Elhakim, Y. M., & Devkota, H. P. (2020). Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium sativum* L.): A Review. *Nutrients*, 12.
- Borges, R. M., Valença, S. S., Lopes, A. A., Barbi, N. D. S., & Da Silva, A. J. R. (2013).

- Saponins from the roots of *Chiococca alba* and their in vitro anti-inflammatory activity. *Phytochemistry Letters*, 6, 96–100.
- Bravo-Núñez, Á., Golding, M., McGhie, T. K., Gómez, M., & Matía-Merino, L. (2019). Emulsification properties of garlic aqueous extract. *Food Hydrocolloids*, 93, 111–119.
- Chaieb, I. (2010). Saponins as Insecticides: a Review. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 5, 39–50.
- Cheok, C. Y., Salman, H. A. K., & Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16–40.
- Choudhary, N., Chatterjee, M., Kumar, S., Singh, G., & Suttee, A. (2021). Effect of conventional method and microwave assisted extraction on phytoconstituents of *Chenopodium album*. *Materials Today: Proceedings*, 45, 5362–5367.
- da Silva, C. G. F., Cassel, E., Vargas, R. M. F., & Marczak, L. D. F. (2018). Selective extraction of saponins from *Ilex paraguariensis* St.-Hil. unripe fruits. *Food and Bioproducts Processing*, 111, 72–82.
- Dahmoune, B., Houma-Bachari, F., Chibane, M., Akrou-Aissou, C., Guégan, J. P., Vives, T., Jehan, P., Dahmoune, F., Mouni, L., Ferrières, V., & Hauchard, D. (2021). Microwave assisted extraction of bioactive saponins from the starfish *Echinaster sepositus*: Optimization by response surface methodology and comparison with ultrasound and conventional solvent extraction. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 163, 108359.
- Diretto, G., Rubio-Moraga, A., Argandoña, J., Castillo, P., Gómez-Gómez, L., & Ahrazem, O. (2017). Tissue-specific accumulation of sulfur compounds and saponins in different parts of garlic cloves from purple and white ecotypes. *Molecules*, 22, 1359.
- Divya, B. J., Suman, B., Venkataswamy, M., & Thyagaraju, K. (2017). A study on phytochemicals, functional groups and mineral composition of *Allium sativum* (garlic) cloves. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 9(3), 42–45.
- Domínguez, X. A. (1988). *Métodos de investigación fitoquímica* (Limusa (ed.)).
- Farid, A., Yousry, M., & Safwat, G. (2022). Garlic (*Allium sativum* Linnaeus) improved inflammation and reduced cryptosporidiosis burden in immunocompromised mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 292, 115174.
- Guclu-Ustundag, Ö., & Mazza, G. (2007). Saponins: Properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 231–258.
- Hadidi, M., Ibarz, A., & Pagan, J. (2020). Optimisation and kinetic study of the ultrasonic-assisted extraction of total saponins from alfalfa (*Medicago sativa*) and its bioaccessibility using the response surface methodology. *Food Chemistry*, 309,

125786.

- Hsu, W., Chen, S., Lin, J., & Yen, G. (2022). Application of saponins extract from food byproducts for the removal of pesticide residues in fruits and vegetables. *Food Control*, *136*, 108877.
- Hu, Z., Cai, M., & Liang, H.-H. (2008). Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from *Radix Bupleuri*. *Separation and Purification Technology*, *61*, 266–275.
- Kang, J. S., Kim, S. O., Kim, G. Y., Hwang, H. J., Kim, B. W., Chang, Y. C., Kim, W. J., Kim, C. M., Yoo, Y. H., & Choi, Y. H. (2016). An exploration of the antioxidant effects of garlic saponins in mouse-derived C2C12 myoblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, *37*, 149–156.
- Lanzotti, V., Barile, E., Antignani, V., Bonanomi, G., & Scala, F. (2012). Antifungal saponins from bulbs of garlic, *Allium sativum* L. var. *Voghiera*. *Phytochemistry*, *78*, 126–134.
- Lavilla, I., & Bendicho, C. (2017). Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. In *Water Extraction of Bioactive Compounds* (pp. 291–316). Elsevier Inc.
- Le Bot, M., Thibault, J., Pottier, Q., Boisard, S., & Guilet, D. (2022). An accurate, cost-effective and simple colorimetric method for the quantification of total triterpenoid and steroidal saponins from plant materials. *Food Chemistry*, *383*, 132597.
- Lebot, V., Faloye, B., Okon, E., & Gueye, B. (2019). Simultaneous quantification of allantoin and steroidal saponins in yam (*Dioscorea spp.*) powders. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *13*, 100200.
- Li, J., Zu, Y. G., Fu, Y. J., Yang, Y. C., Li, S. M., Li, Z. N., & Wink, M. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia Bunge.*) kernel and evaluation of its antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *11*, 637–643.
- Llompart, M., Garcia-Jares, C., Celeiro, M., & Dagnac, T. (2018). Extraction | Microwave-Assisted Extraction. In *Encyclopedia of Analytical Science* (3rd ed.). Elsevier Inc.
- Lopez-Avila, V., & Luque de Castro, M. D. (2014). Microwave-Assisted Extraction. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier Inc.
- Ma, Q., Luo, J., & Kong, L. (2011). Preparative isolation of steroidal saponins from garlic (*Allium Sativum* L.) using high-speed countercurrent chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, *34*, 1997–2007.

- Majinda, R. (2012). Extraction and Isolation of Saponins. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 864, Issue 12, pp. 415–426).
- Makkar, H., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). Plant Secondary Metabolites. In *Methods in molecular biology*.
- Meriga, B., Mopuri, R., & MuraliKrishna, T. (2012). Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 391–395.
- Moghimpour, E., & Handali, S. (2015). Saponin: Properties, Methods of Evaluation and Applications. *Annual Research & Review in Biology*, 5(3), 207–220.
- Mostafa, A., Sudisha, J., El-sayed, M., Ito, S., & Ikeda, T. (2013). Aginoside saponin, a potent antifungal compound, and secondary metabolite analyses from *Allium nigrum* L. *Phytochemistry Letters*, 6, 274–280.
- Nair, J. J., & Van Staden, J. (2021). The Amaryllidaceae, a chemically and biologically privileged plant family. *South African Journal of Botany*, 136, 1–6.
- Navarro del Hierro, J., Herrera, T., García-Risco, M. R., Fornari, T., Reglero, G., & Martin, D. (2018). Ultrasound-assisted extraction and bioaccessibility of saponins from edible seeds: quinoa, lentil, fenugreek, soybean and lupin. *Food Research International*, 109, 440–447.
- Picot-Allain, C., Mahomoodally, M. F., Ak, G., & Zengin, G. (2021). Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective. *Current Opinion in Food Science*, 40, 144–156.
- Podolak, I., Galanty, A., & Sobolewska, D. (2010). Saponins as cytotoxic agents: A review. *Phytochemistry Reviews*, 9, 425–474.
- Ramli, N. H., Yusup, S., Quitain, A. T., Johari, K., Wei, B., & Kueh, B. (2019). Optimization of saponin extracts using microwave-assisted extraction as a sustainable biopesticide to reduce *Pomacea canaliculata* population in paddy cultivation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 11, 23–35.
- Ren, Y., Chen, Y., Hu, B., Wu, H., Lai, F., & Li, X. (2015). Microwave-assisted extraction and a new determination method for total steroid saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright. *Steroids*, 104, 145–152.
- Rizwani, G. H., & Shareef, H. (2011). Genus *Allium*: The potential nutritive and therapeutic source. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 1, 158–165.
- Sabiu, S., Madende, M., Ajao, A. A., Aladodo, R. A., Nurain, I. O., & Ahmad, J. B. (2019). The Genus *Allium* (Amaryllidaceae: Alloideae): Features, Phytoconstituents, and

Mechanisms of Antidiabetic Potential of *Allium cepa* and *Allium sativum*. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* (2nd ed., pp. 137–154). Elsevier Inc.

- Sharma, P., Tyagi, A., Bhansali, P., Pareek, S., Singh, V., Ilyas, A., Mishra, R., & Poddar, N. K. (2021). Saponins: Extraction, bio-medicinal properties and way forward to antiviral representatives. *Food and Chemical Toxicology*, *150*, 112075.
- Shi, X., Jin, Y., Liu, J., Zhou, H., Wei, W., Zhang, H., & Li, X. (2011). Matrix solid phase dispersion extraction of ginsenosides in the leaves of *Panax ginseng* C.M. Mey. *Food Chemistry*, *129*, 1253–1257.
- Singh, B., & Kaur, A. (2018). Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: A review. *LWT - Food Science and Technology*, *87*, 93–101.
- Skoog, D. A., & West, D. M. (2015). *Fundamentos de Química Analítica* (9th ed.). Cengage Learning.
- Sobolewska, D., Michalska, K., Podolak, I., & Grabowska, K. (2016). Steroidal saponins from the genus *Allium*. *Phytochemistry Reviews*, *15*(1), 1–35.
- Sulaiman, F. A., Kazeem, M. O., Waheed, A. M., Temowo, S. O., Azeez, I. O., Zubair, F. I., Adeyemi, T. A., Nyang, A., & Adeyemi, O. S. (2014). Antimicrobial and toxic potential of aqueous extracts of *Allium sativum*, *Hibiscus sabdariffa* and *Zingiber officinale* in Wistar rats. *Journal of Taibah University for Science*, *8*, 315–322.
- Suleria, H. A. R., Butt, M. S., Khalid, N., Sultan, S., Raza, A., Aleem, M., & Abbas, M. (2015). Garlic (*Allium sativum*): Diet based therapy of 21st century-a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *5*(4), 271–278.
- Tapera, M., & Machacha, S. (2017). Matrix Solid Phase Dispersion Extraction and Screening of Phytochemicals from *Dioscorea steriscus* Tubers of Mashonaland Central Province, Zimbabwe. *Der Chemica Sinica*, *8*(1), 117–122.
- Tenon, M., Feuillère, N., Roller, M., & Birtić, S. (2017). Rapid, cost-effective and accurate quantification of *Yucca schidigera* Roezl. steroidal saponins using HPLC-ELSD method. *Food Chemistry*, *221*, 1245–1252.
- Terry, L. A. (2011). Health-promoting properties of fruits and vegetables. In CABI (Ed.), *Health-promoting Properties of Fruit and Vegetables*.
- Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A., & Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, *68*, 275–297.
- Wianowska, D., & Gil, M. (2019). New insights into the application of MSPD in various fields of analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, *112*, 29–51.
- Wilson, A., Pandya, D., & Solanki, H. (2019). Comparative Phytochemical Screening of

Leaves and Bulb of *Allium sativum* L. *International Journal of Information and Computing Science*, 6(2), 80–84.

Yu, Z., Zhang, T., Zhou, F., Xiao, X., Ding, X., He, H., Rang, J., Quan, M., Wang, T., Zuo, M., & Xia, L. (2015). Anticancer Activity of Saponins from *Allium chinense* against the B16 Melanoma and 4T1 Breast Carcinoma Cell. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 725023.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1. Reactivos y materiales de laboratorio utilizados

Reactivos	Especificaciones
Etanol, 1-butanol, cloroformo, metanol, acetonitrilo, diclorometano	J.T. Baker (Xalostoc, México)
Ácido (+)-tartárico, ácido clorhídrico, ácido acético glacial, ácido pícrico, tricloruro de antimonio, vainillina, gelatina	Merck (Darmstadt, Alemania)
Nitrato de bismuto III pentahidratado, hidróxido de sodio, ácido cítrico, hidróxido de potasio, yoduro de potasio, ácido bórico, cloruro de sodio	Carlo Erba (Val de Reuil, Francia)
Ácido sulfúrico concentrado, cloruro férrico, sílica gel	Fischer Scientific (Nueva York, USA)
Ácido 3,5-dinitrobenzoico	Alfa Aesar (Nueva York, USA)
Acetato de plomo (II)	Laboratorios Biocroma (Cali, Colombia)
Sílica C <sub>18</sub>	
Saponinas de corteza de quillaja	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

### Anexo 2. Equipos de laboratorio utilizados

Equipo	Modelo	Marca
Espectrofotómetro UV-Vis	UV-5800PC	Scientific productos para laboratorio
Rotaevaporador	Laborota 4003	Heidolph Instruments GmbH Co (Schwabach, Alemania)
Baño Ultrasónico	MH series	Fischer Scientific (Hampton, USA)
Balanza analítica	Adventurer™ AR2140	OHAUS corp (Pine Brook, New Jersey)
Centrífuga	Z326K	Hermle Labortechnik GmbH (Wehingen, Alemania)
Horno a microondas	WMP07ZD	Whirpool (Michigan, USA)
Estufa	WTC Binder	Binder (Tuttlingen, Alemania)

**Anexo 3.** Masas de muestras utilizadas en cada uno de los experimentos (Exp) para las extracciones planteadas por los diseños experimentales

Diseño experimental 2 <sup>3</sup>				Diseño experimental 2 <sup>2</sup>		
EAM		EAU		DMFS		
#Exp	Masa muestra (g)	#Exp	Masa muestra (g)	#Exp	Masa muestra (g)	Masa fase (g)
1	0,9026	2	0,3025	1	0,2516	0,7509
3	0,9030	4	0,3021	2	0,2511	0,7526
5	0,9033	6	0,3017	3	0,2513	0,7546
7	0,9009	8	0,3014	4	0,2522	0,7543
9	0,9019	10	0,3011	5	0,2502	0,7515
11	0,9012	12	0,3025	6	0,2520	0,7518
13	0,9024	14	0,3011	7	0,2542	0,7528
15	0,9013	16	0,3016	8	0,2521	0,7511

**Anexo 4.** Datos curva de calibración con reactivo de saponinas en espectrofotómetro UV-Vis

Concentración de estándar (mg/L)	Absorbancia
20,84	0,3158
33,34	0,4207
66,68	0,5560
100,02	0,7405
133,35	0,8741
150,02	0,9396



**Anexo 5.** Datos de absorbancias de muestras en extracciones de diseño experimental factorial  $2^3$

Experimento	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs promedio	Desviación estándar
1	0,5075	0,4786	0,4738	0,4866	0,0182
2	0,9168	0,8877	0,9319	0,9121	0,0225
3	0,7738	0,7926	0,8096	0,7920	0,0179
4	0,6157	0,5902	0,5919	0,5993	0,0143
5	0,5331	0,4958	0,5346	0,5212	0,0220
6	0,3150	0,3106	0,3267	0,3174	0,0083
7	0,3360	0,3185	0,3213	0,3253	0,0094
8	0,6981	0,6388	0,6765	0,6711	0,0300
9	0,5479	0,5336	0,5307	0,5374	0,0092
10	0,7941	0,8000	0,8215	0,8052	0,0144
11	0,6604	0,6485	0,6804	0,6631	0,0161
12	0,7242	0,7481	0,7238	0,7320	0,0139
13	0,5688	0,5015	0,5395	0,5366	0,0337
14	0,3678	0,3187	0,3543	0,3469	0,0254
15	0,3465	0,4149	0,4207	0,3940	0,0413
16	0,5714	0,6314	0,6189	0,6072	0,0317

**Anexo 6.** Datos de absorbancias de muestras en extracciones de diseño experimental factorial  $2^2$  para las muestras cuantificadas por curva de calibración

Experimento	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs promedio	Desviación estándar
3	0,4341	0,4322	0,4467	0,4377	0,0079
4	0,4192	0,3947	0,3887	0,4009	0,0162
7	0,4810	0,4797	0,4729	0,4779	0,0044
8	0,4581	0,4704	0,4594	0,4626	0,0068

**Anexo 7.** Datos de absorbancias de muestras en extracciones de diseño experimental factorial  $2^2$  para las muestras cuantificadas por adición estándar

<b>Experimento</b>	<b>Abs muestra</b>	<b>Promedio Abs muestra</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Abs M+E</b>	<b>Promedio Abs M+E</b>	<b>Desviación estándar</b>
1	0,0374	0,0569	0,0338	0,4388	0,4660	0,0421
	0,0959			0,5145		
	0,0373			0,4447		
5	0,0559	0,0729	0,0188	0,4717	0,4856	0,0132
	0,0931			0,4980		
	0,0698			0,4871		
2	0,0340	0,0327	0,0030	0,5061	0,4941	0,0118
	0,0348			0,4937		
	0,0292			0,4825		
6	0,0444	0,0470	0,0031	0,5143	0,5091	0,0048
	0,0462			0,5048		
	0,0505			0,5082		