



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

*Terra uberrima, mens aperta.
Bøu Lo-tama, chí jí jú*

Campus Tuxtepec

**“Evaluación de dos técnicas de extracción
(reflujo y ultrasonido) para el proceso de
obtención de un agente espumante a partir
de tallos de *Smilax* sp.”**

TESIS

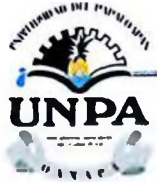
Para obtener el título de:
Licenciada en Ingeniería en Alimentos

Presenta:
Yunuen Erandy Torres Zamudio

Dr. Lemuel Pérez Picaso
Director

Dr. Andrés Aguirre Cruz
Co-Director

San Juan Bautista Tuxtepec Oaxaca, 2017.



UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 16 de Junio de 2017

LIC. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DEL DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES

Sirva la presente para informarle que los miembros de la Comisi3n Revisora del trabajo de tesis de la **C. YUNUEN ERANDY TORRES ZAMUDIO** pasante de la carrera de Ingenieria en Alimentos con n3mero de matr3cula **11070009**, revis3 y aprob3 el trabajo de investigaci3n denominado **"EVALUACI3N DE DOS T3CNICAS DE EXTRACCI3N (REFLUJO Y ULTRASONIDO) PARA EL PROCESO DE OBTENCI3N DE UN AGENTE ESPUMANTE A PARTIR DE TALLOS DE SMILAX SP.**, mismo que ser3 presentado como prueba escrita del acto de recepci3n profesional, para obtener el T3tulo de Ingeniero en Alimentos.

Por lo anterior y de acuerdo a los lineamientos institucionales, se le da tr3mite legal para que proceda a su impresi3n el trabajo presentado.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
B3u Lo-tama, 3n j3 u


M.C. MIGUEL ÁNGEL GARCÍA MUÑOZ
JEFÉ DE CARRERA
INGENIERÍA EN ALIMENTOS



c.c.p. M.C. Héctor López Arjona / Vicerrector Acad3mico. Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Química Orgánica y en el Taller de Alimentos de la Universidad del Papaloapan, *campus* Tuxtepec bajo la dirección del Dr. Lemuel Pérez Picaso y la co-dirección del Dr. Andrés Aguirre Cruz. Se agradece a CONACYT por la beca 22973 otorgada a través del proyecto CB-2011/169593 "Síntesis de epiditiodicetopiperazinas y su evaluación biológica". Así mismo se agradece al LINAN-UNPA por los espectros de UHPLC.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a dios por permitirme cumplir esta meta, porque en esta travesía tuve la oportunidad de aprender y por poner en mi camino a cada una de las personas que ayudaron a que esto fuera posible.

Gracias a mi madre por su apoyo incondicional, su amor, por su comprensión sin importar nuestras diferencias de opiniones, por su empatía y por siempre creer en que lo lograría. A mi padre por sus enseñanzas, por el apoyo brindado y por siempre impulsarme a dar lo mejor de mí.

A mi hermano Xavier por darme apoyo y palabras de aliento.

Agradezco infinitamente al Dr. Lemuel por aceptarme como su tesista, por siempre brindarme su apoyo, su paciencia, por sus consejos, su tiempo, por el conocimiento transmitido, por su disposición ante todos los percances y principalmente por no desistir.

Agradezco al Dr. Andrés por su apoyo, por el conocimiento transmitido, consejos y por aceptarme como su tesista.

Agradezco al Dr. Adolfo por apoyarme en la realización de algunos de mis experimentos, por su amable disposición, así mismo por la enseñanza y conocimiento brindado.

Gracias al Dr. Julián y a la Dra. Jacqueline por permitirme realizar parte de mi trabajo experimental en su laboratorio.

Agradezco al jefe de carrera M.C. Miguel García por su apoyo brindado, por sus consejos y por los conocimientos brindados a través de toda mi carrera.

Al Dr. Mario Magaña por su apoyo en la realización de mi análisis estadístico, de igual manera a mis sinodales Dra. Rubí Utrilla y a la Dra. Fabiola Hernández por sus observaciones y aportaciones para hacer de éste un mejor trabajo

Agradezco al Vicerrector M.C. Héctor López Arjona por su valioso apoyo y por los conocimientos brindados a través de toda mi carrera y a la Lic. Yesenia Barrientos por su apoyo y amabilidad.

A la química Lety, a Luz y al Ing. Juan por su apoyo y facilitación para proporcionarme el material requerido para este trabajo.

A la Dra. Norma, Benito, Eunice, Dora, y Joseoziel por sus consejos, conocimientos, amistad, calidez y apoyo en el laboratorio durante mis estancias en la UTM...#TeamSmilax.

Gracias a aquellas personas que dieron su sangre para la realización de mi prueba de hemólisis de los cuales recuerdo a Crisanto. Lucero y Héctor.

Un verdadero amigo es alguien que te conoce tal y como eres, comprende donde has estado, celebra tus alegrías, te acompaña en tus logros y fracasos, comparte tu dolor y te habla con franqueza cuando has errado, a todo esto y más agradezco a mis amigas Mayra y Yure, por su apoyo, por aquellos momentos de estudio y desvelo, por las locuras y las patoaventuras, por compartir sus conocimientos y por su amistad que aunque a veces no estemos cerca sabemos que nos tenemos las unas a las otras. Las quiero mucho.

A mi persona Sam, mi moedor estrella, gracias por tu apoyo, por tu comprensión, por tu paciencia en mis momentos de estrés y por creer en mí incluso cuando yo deje de hacerlo. Te amo.

A mis amigos que me acompañaron durante toda la carrera, Francisco y Helder y los que estuvieron al inicio Héctor, Mau, Klau Cueto y Marilyn, siempre los llevaré en mis recuerdos.

Y finalmente a mi alma mater UNPA.

“Uno puede devolver un préstamo de oro, pero está en deuda de por vida con aquellos que son amables”

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado principalmente a la persona que me impulsó, me alentó en cada etapa en la que estuvo presente en mi vida, que me enseñó que con dedicación y perseverancia se pueden llegar a hacer grandes cosas y por ser el ejemplo para salir adelante. Uno de mis ángeles: mi abuelita Marce[†].

A mi abuelito Michael[†] siempre te llevare en mis recuerdos y mi corazón.

A mi abuelito Ignacio por sus consejos, sus palabras de aliento y por su amor.

Y a todas aquellas personas que han creído en mí, me han brindado su cariño y han participado en mi formación.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN.....	XV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Aditivos alimentarios.....	4
2.2 Surfactantes.....	5
2.2.1 Función de los surfactantes.....	5
2.3 Espumas.....	6
2.3.1 Etapas de vida de una espuma y factores asociados.....	7
2.4 Perfil cromatográfico.....	10
3. ANTECEDENTES.....	12
3.1 Saponinas.....	12
3.1.1 Aplicación de las saponinas en los alimentos.....	14
3.1.2 Técnicas de extracción de saponinas.....	17
3.1.3 Métodos de comprobación de presencia de saponinas.....	20
3.2 Género Smilax.....	21
3.3 Bebida prehispánica: “popo”.....	22
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
5. JUSTIFICACIÓN.....	25
6. OBJETIVOS.....	26
7. HIPÓTESIS.....	27
8. METODOLOGÍA.....	28
8.1 Recolección de materia prima:.....	28
8.2 Procesamiento del material vegetal.....	28
8.3 Análisis químico proximal.....	29
8.3.1 Cenizas totales.....	29

8.3.2 Grasa cruda	30
8.3.3 Proteína cruda	31
8.3.4 Fibra cruda.....	33
8.4 Diseño experimental	34
8.5 Obtención de los extractos.....	35
8.6 Prueba de la espuma	37
8.7 Prueba de la hemólisis.....	37
8.8 Cuantificación de sapogeninas mediante Espectrofotometría Uv-Vis	40
8.9 Evaluación del pH	40
8.10 Perfil fitoquímico preliminar	41
8.10.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	42
8.11 Perfil cromatográfico	43
8.12 Prueba preliminar del extracto en una bebida.....	44
8.13 Análisis estadístico.....	45
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
9.1 Análisis proximal	46
9.2 Obtención de extractos y prueba de la espuma.....	46
9.3 Prueba de hemólisis.....	49
9.4 Cuantificación de sapogeninas mediante Espectrofotometría Uv-Vis	50
9.5 Evaluación del pH	51
9.6 Perfil fitoquímico preliminar	51
9.6.1 Cromatografía en capa fina (CCF).....	53
9.7 Perfil cromatográfico	58
9.8 Prueba preliminar del extracto en una bebida.....	60
10. CONCLUSIONES.....	62
11. BIBLIOGRAFÍA.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Efecto de Gibbs-Marangoni.....	8
Figura 2: a) Segregación de las burbujas representando el principio de Arquímedes y b) Drenado gravitacional del líquido en la espuma húmeda.....	9
Figura 3: a) Succión capilar del líquido del centro de la película hasta los bordes de Plateau y b) Forma poliédrica que toman las burbujas.	9
Figura 4: Aspectos de la evolución de una espuma debido a la Maduración de Ostwald.	10
Figura 5: Ejemplos de surfactantes a) Lauril éter sulfato de sodio, b) Óxido de amina, c) Aminas y d) Amidas.....	12
Figura 6: Estructura de la glicirricina.	13
Figura 7: Estructuras base que pueden presentar las sapogeninas: a) Clase triterpénica y b) Clase esteroidal.	14
Figura 8: a) Agitación del popo con ayuda de un molinillo de madera para la formación de la espuma característica de la bebida y b) Jícara con la bebida “popo”.....	23
Figura 9: a) Molino manual con <i>Smilax sp.</i> y b) Equipo de liofilización con material vegetal molido.	28
Figura 10: Determinación de cenizas.....	29
Figura 11: Equipo Soxhlet.	30
Figura 12: a) Equipo de destilación microkjeldahl, b) Muestra clarificada, c) Equipo de destilación y d) Solución titulada con color verde.....	32
Figura 13: a) Crisol Gooch con la muestra después de someterse a la estufa y b) Crisol Gooch con la muestra después de someterse a la mufla.....	34
Figura 14: Sistema de reflujo.....	35
Figura 15: a) Equipo sonicación y b) Sonotrodo inmerso en el extracto de <i>Smilax sp.</i>	36
Figura 16: Embudo de decantación con las dos fases inmiscibles.....	38
Figura 17: Espectrofotómetro de UV-Vis.....	40
Figura 18: Equipo de UHPLC.	44
Figura 19: Curva de calibración para la cuantificación de sapogeninas.	50

Figura 20: Resultados positivos del perfil fitoquímico preliminar de: a) Esteroides, b) Carbohidratos, c) Saponinas y d) Cumarinas.....	53
Figura 21: Análisis de CCF para los extractos obtenidos, en un sistema CH ₂ Cl ₂ /MeOH (9:1).	54
Figura 22: Análisis de CCF de los extractos obtenidos, en un sistema CH ₂ Cl ₂ /MeOH (1:1).	56
Figura 23: Cromatograma en fase inversa para el extracto hidrolizado de <i>Smilax sp.</i> vs Diosgenina.	59
Figura 24: Sapogeninas reveladas con anisaldehído.....	59
Figura 25: Prueba preliminar del extracto de <i>Smilax sp.</i> en una bebida a) a un T=0 min y b) a un T=15 min.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de los aditivos en base a su función.....	4
Tabla 2: Relación de la altura de la espuma con el contenido de saponinas.	37
Tabla 3: Diluciones correspondientes para la prueba de hemólisis.....	39
Tabla 4: Procedimiento de perfil fitoquímico preliminar para metabolitos específicos.	41
Tabla 5 : Resultados del porcentaje del análisis proximal.....	46
Tabla 6: Resultados del rendimiento y prueba de la espuma de los extractos de <i>Smilax</i> sp.....	47
Tabla 7: Resultados de la prueba de la hemólisis.....	50
Tabla 8: Resultados del contenido de saponinas.....	51
Tabla 9: Resultados del perfil fitoquímico preliminar.....	52
Tabla 10: Rf de los componentes encontrados en los extractos de <i>Smilax</i> sp. en las placas de gel sílice en un sistema CH ₂ Cl ₂ /MeOH (9:1).....	54
Tabla 11: Rf de los componentes encontrados en el extracto de ultrasonicación en las placas de gel de sílice C ₁₈ en un sistema de CH ₂ Cl ₂ /MeOH (1:1).	57
Tabla 12: Alturas de la prueba preliminar del extracto en una bebida (café).	60

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Porcentaje
α	Alfa
β	Beta
λ	Longitud de onda
$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	Anhídrido acético
\pm	Más/menos
°C	Grados Celsius
μg	Microgramos
Å	Ångström
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
AOAC	Association of Analytical Communities
BuOH	Butanol
CCF	Cromatografía en capa fina
CH_3COOH	Ácido acético
CHCl_3	Cloroformo
Conc.	Concentrado
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Ej.	Ejemplo
EtOH	Etanol
FeCl_3	Cloruro férrico

g	Gramos
h	Hora (s)
H ₂ O	Agua
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HgO	Óxido de mercurio
HNO ₃	Ácido nítrico
K ₂ SO ₄	Sulfato de potasio
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
N	Normalidad
Na ₂ S ₂ O ₃	Tiosulfato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH ₃	Amoniacó
NH ₄ OH	Hidróxido de amonio
nm	Nanómetros
∅	Diámetro

O.C	Onda corta
O.L	Onda larga
Pb(OAc) ₄	Acetato de plomo
pH	Potencial de hidrógeno
psi	Libra por pulgada cuadrada
R _f	Factor de retención
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo(s)
SOR	Relación surfactante/aceite
sp.	Sin especie
T	Tiempo
T°	Temperatura
TsOH	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
UHPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento
UPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento
UV-Vis	Ultravioleta visible
vs	Versus
W	Watts

RESUMEN

La planta *Smilax* sp. (Cocolmecha) es una trepadora que cuenta con zarcillos para adherirse a troncos y/o plantas, las guías o tallos tiernos se utilizan en Oaxaca para proporcionar espuma a una bebida artesanal llamada “popo” ya que la planta contiene saponinas que son las responsables de la formación de la espuma. Por lo que en este trabajo se determinó el contenido de saponinas y se realizó una prueba preliminar como agente espumante en una bebida (café). Al material vegetal liofilizado almacenado por ultracongelación ($T = -80\text{ }^{\circ}\text{C}$), se le realizó el análisis químico proximal obteniendo; cenizas 3.56 %, grasa cruda 0.45 %, fibra cruda 18.06 %, proteínas 6.98 % y carbohidratos 70.8 %. Los extractos del material vegetal liofilizado almacenado en ultracongelación y congelación se obtuvieron mediante dos metodologías extractivas diferentes (sonicación y reflujo), y se probaron dos sistemas de disolventes distintos (H_2O y $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$), obteniendo que los mejores resultados son cuando; el método de extracción es por sonicación, la forma de almacenamiento por ultracongelación y con un sistema para la extracción empleando $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$. A partir de estas condiciones se obtuvieron los valores más altos de rendimiento (7.34 %) y de altura en la prueba de la espuma (11.67 cm). Para la prueba de hemólisis se compararon ambos métodos de extracción, y el extracto obtenido por el método de sonicación (89.94 %) mostró el mayor % de hemólisis y el más bajo por el método de reflujo (64.33 %). En la cuantificación de saponinas totales los resultados fueron que la metodología extractiva por sonicación se obtuvo un mayor contenido de saponinas (37.873 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mientras que el obtenido por reflujo obtuvo el menor contenido de saponinas (25.641 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se realizó un perfil fitoquímico preliminar para ambos métodos de extracción en los cuales ambos mostraron la presencia de esteroides, saponinas, cumarinas y carbohidratos. La CCF utilizando como fase estacionaria gel de sílice muestra que los extractos de sonicación y reflujo presentan al menos 7 componentes principales al ser tratadas con diferentes agentes reveladores, mientras que al utilizar como fase estacionaria sílice C_{18} presentan al menos 6 componentes. Se realizó un perfil cromatográfico mediante UPLC para los hidrolizados de ambos métodos de extracción en el cual

se observó que no hay diferencia en el cromatograma ya que son similares, así mismo se observan 2 compuestos con diferentes tiempos de retención a la *Diosgenina*. Por último, se evaluó su potencial como agente espumante en café mostrando que las saponinas contenidas en el extracto obtenido por sonicación tienen potencial como surfactante y como agente espumante al generar y estabilizar la espuma formada.

1. INTRODUCCIÓN

La humanidad desde sus inicios hasta la actualidad ha dependido de las plantas como medio de subsistencia. Desde la época prehispánica las comunidades autóctonas se han relacionado con la naturaleza de manera intrínseca, haciendo uso de la biodiversidad que les rodea, lo que permitió de forma empírica el aprovechamiento de los recursos naturales que tenían a su alcance para diversos fines como: materiales de construcción, alimento y remedios medicinales. Para el empleo de una planta con fines medicinales los curanderos aprendieron a aprovechar sus diferentes partes como; raíces, tallos, hojas, semillas, frutillas e incluso el espécimen completo.

El uso de los aditivos tiene inicio desde la antigüedad debido a que desde tiempos remotos el hombre incorporaba sustancias a los alimentos con la finalidad de preservarlos y mejorar sus cualidades. El hombre Paleolítico observó que al someter a los alimentos al humo se favorecía su conservación, mientras en el periodo Neolítico (conocido por el comienzo de la práctica de agricultura y la ganadería), el hombre se ve obligado a manipular los alimentos con la finalidad de hacerlos más apetecibles, para lograrlo empleó el uso del azafrán y la cochinilla (insecto), para preservación y conservación de los alimentos se recurrió al uso de la sal y el vinagre. El empleo de éstas sustancias en los alimentos era empírico, pero con los avances experimentados por la química en el siglo XVIII y con las nuevas necesidades de la industria agroalimentaria del siglo XIX, la búsqueda de compuestos para añadir a los alimentos se hizo sistemática y es hasta finales de este siglo cuando en el lenguaje alimentario se incluye el término “aditivo”. Este término se utilizaba de un modo confuso, ya que bajo esta denominación también se agrupaban diversas sustancias con distintos efectos sobre la salud humana: las especias, los enriquecedores, los coadyuvantes tecnológicos, las impurezas y los contaminantes (Ibáñez *et al.*, 2003).

La presencia de espuma es una de las características deseables en diferentes alimentos, históricamente los alimentos aireados han sido consumidos desde principios de la civilización. En el antiguo Egipto se consumía algo semejante a las

hogazas de pan actuales y una bebida espumosa parecida a la cerveza, conocida como *ale*, en ambos casos elaborados por fermentación de granos. Otros alimentos espumosos como los elaborados a base de crema batida, así como de claras de huevo, se extendieron una vez lograda la domesticación de los bovinos y de las aves como las gallinas. Los merengues lograron alta popularidad en el siglo XVIII, cuando el azúcar de caña era comercialmente disponible y se logró la estabilidad de sus espumas. Los helados, cuya elaboración se introdujo aire posiblemente desde el siglo XVII en Italia, alcanzando alto consumo hasta el siguiente siglo; es también en esa época cuando se desarrollaron los alimentos tipo *soufflé* por los “chefs” de la alta cocina. En el caso de los productos derivados de la *cocoa* (originaria de América y apreciada por su capacidad espumante), a partir del siglo XIX en Europa se desarrollaron los productos aireados a base de chocolate. Así mismo, las aguas y bebidas carbonatadas se popularizaron en el año de 1851. Finalmente, en el siglo XX se desarrollaron infinidad de productos espumosos, de tal forma que en la actualidad se dispone de una gran diversidad de alimentos con dichos atributos y que son elaborados mediante procedimientos tecnológicos avanzados, entre los más populares se pueden mencionar; a los helados, cereales inflados, merengues, pasteles ligeros, malvaviscos, chocolates espumosos, mousses, soufflés, entre otros (Valdivia, 2014).

Hoy en día y de acuerdo al *Codex Alimentarius*, el concepto de aditivo se refiere a “cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características. Esta definición no incluye “contaminantes” o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales”.

Los aditivos utilizados comúnmente para elaborar espumas en sistemas alimentarios pueden ser de diversa naturaleza química, dentro de los más importantes, se encuentran ciertas proteínas como las contenidas en la clara huevo, en la leche y el colágeno o gelatina, entre otras. También existen agentes espumantes dentro de los carbohidratos, de origen marino como los provenientes de algas (ácido algínico, alginato de sodio, alginato de propilenglicol, alginato de potasio, alginato de amonio, alginato de calcio), los quitosanos presentes en los caparazones de crustáceos, y de origen vegetal (celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa, estearoil-2-lactilato de sodio, povidexrosa), la goma de tragacanto que se obtiene de una leguminosa, o el extracto de *Quillaja* (rico en saponinas) que se obtiene de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*,. (Valdivia, 2014).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Aditivos alimentarios

Los aditivos alimentarios siguen siendo uno de los temas más controversiales en el área de alimentos que inquietan cada vez más a los consumidores por sus implicaciones en la salud. Muchas sustancias se añaden deliberadamente a los alimentos para mejorar sus propiedades funcionales, no obstante en ocasiones dichas sustancias también se encuentran presentes de forma natural en algunos alimentos. Sin embargo, cuando estas sustancias químicas se añaden a los alimentos procesados se les denomina como «aditivos alimentarios». Desde un punto de vista normativo, cada aditivo alimentario debe desempeñar alguna función o conferir un atributo útil y aceptable que justifique su uso. Frecuentemente se consideran funciones propias de los aditivos alimentarios la mejora de la vida de anaquel, el aumento del valor nutritivo, conferir o mejorar alguna propiedad funcional, facilitar el procesado e incrementar la aceptabilidad de parte del consumidor, entre otros.

Existen diversas formas de clasificar a los aditivos, en la Tabla 1 se observa la clasificación de acuerdo a su función.

Tabla 1: Clasificación de los aditivos en base a su función.

ADITIVOS		
• Colorantes	• Antiaglomerantes	• Espumantes
• Edulcorantes	• Antiespumantes	• Gelificantes
• Conservadores	• Emulgentes	• Agentes de recubrimiento
• Antioxidantes	• Espesantes	• Humectantes
• Surfactantes	• Endurecedores	• Gases de envasado
• Correctores de la acidez	• Potenciadores de sabor	• Gasificantes
• Acidulantes	• Secuestrantes	• Estabilizadores

Fuente: Morcillo *et al.*, 2013.

El uso de aditivos para enmascarar daños o alteraciones de los alimentos engañando a los consumidores está expresamente prohibido en las disposiciones

legales que regulan el uso de los aditivos alimentarios (Fennema *et al.*, 2010). Así mismo se pueden encontrar aditivos que ocasionan daños al consumidor; por ejemplo el *Diacetilo* ($C_4H_6O_2$) que se utilizaba para dar el sabor a mantequilla en palomitas de microondas (UITA, 2007) y que estudios han probado que aumenta el riesgo de padecer Alzheimer (More *et al.*, 2012); colorantes como amarillo ocaso, tartrazina, rojo allura, carmoisina, ponceau 4R y amarillo de quinoleína que están relacionados en la hiperactividad y alteración en la conducta de niños (Bateman *et al.*, 2004).

2.2 Surfactantes

Los surfactantes son sustancias cuyas moléculas poseen tanto una parte polar como una parte no polar. La parte polar (hidrofílica) tiene afinidad para los disolventes polares (particularmente el agua), mientras que la parte no polar (lipofílica o hidrófoba) tiene afinidad por los disolventes orgánicos (particularmente los hidrocarburos, aceites o grasas) (Fernández & Salager, 2004).

De acuerdo al tipo de disociación de las moléculas, los surfactantes se clasifican en tres grupos: aniónicos (en solución acuosa se disocian en un anión anfifílico y un catión.), catiónicos (se disocian en un catión anfifílico y un anión) y no iónicos (no forman iones en solución acuosa, ya que su parte hidrofílica está formada por grupos polares no ionizados)(Salager, 2002). Otra forma de clasificar a los surfactantes es debido a su origen; naturales (por ej., jabones, monoacilgliceroles y fosfolípidos) y sintéticos (Fennema *et al.*, 2010).

2.2.1 Función de los surfactantes

Los surfactantes en los alimentos, ya sean moléculas pequeñas anfifílicas o proteínas, producen los siguientes efectos (Fennema *et al.*, 2010):

1. Disminuyen la presión de Laplace (proveniente de la Ley de Laplace, que postula que la presión es mayor en las burbujas pequeñas que en las grandes) y facilitan la deformación de la interfase, lo que resulta importante

en la formación de emulsiones, espumas y en la prevención de la coalescencia.

2. Disminuyen la energía libre interfacial, lo que disminuye proporcionalmente la maduración de Ostwald (crecimiento de las partículas grandes de una dispersión a expensas de las más pequeñas y la desaparición final de las partículas menores).
3. Su presencia permite la creación de gradientes de tensión superficial, que puede ser su función más importante. Son esenciales para la formación y estabilidad de emulsiones y espumas.
4. La adsorción de surfactantes sobre las partículas puede modificar considerablemente las fuerzas interpartículas, generalmente incrementando la repulsión y, por tanto, la estabilidad.
5. Los surfactantes de bajo peso molecular pueden interaccionar específicamente con macromoléculas. Con frecuencia se asocian a las proteínas, modificando las propiedades de las mismas.

2.3 Espumas

Las espumas son sistemas en los que un gas constituye la fase dispersa y un líquido o sólido la fase continua; la fase gaseosa se esparce a lo largo de toda la fase líquida, de manera que las cavidades o burbujas de gas quedan separadas por películas finas de líquido. La estabilidad de estas películas delgadas de líquido son las que determinan la estabilidad global de la espuma. Las dos fases que conforman la espuma están íntimamente ligadas y forman una estructura que se torna más ordenada a medida que la cantidad de gas aumenta. Para que este tipo de sistemas reciban el nombre de espuma, la concentración de la fase dispersa debe ser elevada (Rosen & Kunjappu, 2012).

Las espumas que contienen poco líquido (espumas secas), presentan un contacto mayor entre las burbujas debido a que ocurre un deslizamiento mínimo y el empaquetamiento conlleva a la formación de líquido entre ellas. Mientras que las espumas con un elevado contenido de líquido, también llamadas espumas húmedas, muestran un contacto mínimo entre las burbujas y no hay

empaquetamiento lo cual facilita el deslizamiento entre ellas. Para el caso de las espumas no acuosas, las burbujas que presentan tienen forma esférica y se encuentran separadas por una capa gruesa de líquido (Belandria, 2001).

La espumabilidad y la estabilidad son fenómenos que están involucrados durante toda la vida de la espuma. La espumabilidad hace referencia a la cantidad relativa de espuma que se obtiene en su proceso de formación. Por otro lado la estabilidad se define como la persistencia de la espuma con relación al tiempo. La espumabilidad está relacionada con la estabilidad de la espuma en los instantes iniciales en donde el resultado consiste en el compromiso entre la dispersión del gas en el líquido y la coalescencia de las burbujas (Arengas & Riudiaz, 2006).

2.3.1 Etapas de vida de una espuma y factores asociados

Durante el tiempo de vida de las espumas, se presentan diferentes etapas que difieren entre sí por los fenómenos interfaciales y/o superficiales presentes, estas etapas se describen a continuación (Salager *et al.*, 1999):

- I. La formación de la espuma (de algunos segundos hasta algunos minutos), y los métodos para la formación de la misma como: un gas previamente disuelto en un líquido se libera por un cambio físico por lo general por un descenso de presión o un aumento de la temperatura y mediante la fuerza mecánica a través de un aparato que permita introducir burbujas de gas en el seno del líquido, por lo general esto se logra mediante una agitación violenta o un burbujeo.

Durante la formación de la espuma se encuentran presentes los siguientes fenómenos:

- ✚ Adsorción del surfactante en la superficie gas-líquido: las burbujas formadas por agitación representan un aumento del aire superficial gas-líquido, se origina una nueva superficie disponible para que un surfactante se adsorba en la misma. Una vez adsorbidas en la superficie, estas

moléculas tensoactivas facilitan la creación de un área superficial debido a que disminuyen la tensión interfacial.

- ✚ Separación del gas por gravedad y acumulación de burbujas: Debido a la diferencia de densidad entre la fase líquida y la fase gaseosa, las burbujas de gas se acumulan entre sí, es en este proceso donde se forman las películas inter-burbujas.
- ✚ Efecto de Gibbs-Marangoni: Es un fenómeno físico de desplazamiento del líquido presente en la interfase entre dos burbujas desde las zonas de menor tensión superficial hasta las zonas de mayor tensión, con el fin de detener el estiramiento de la película inter-burbuja, lo que provocaría una ruptura de la misma (Figura 1).

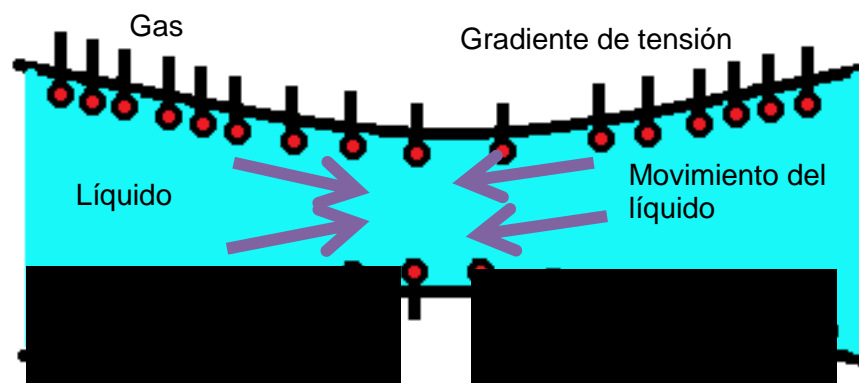


Figura 1: Efecto de Gibbs-Marangoni.

- II. La maduración de la espuma: Después de su formación, la espuma sufre una degradación más o menos lenta (a una escala de algunos minutos a horas), durante ese tiempo se presentan diferentes mecanismos que se describen a continuación:

- ✚ Segregación y drenado gravitacional: La segregación de las burbujas ocurre en los primeros instantes de formación de esta debido al principio de Arquímedes (Todo cuerpo sumergido en un fluido experimenta un empuje vertical hacia arriba igual al peso del fluido

desalojado) (Figura 2a). El drenado gravitacional se presenta durante toda la vida de la espuma pero es más significativo en la espuma húmeda (Figura 2b).

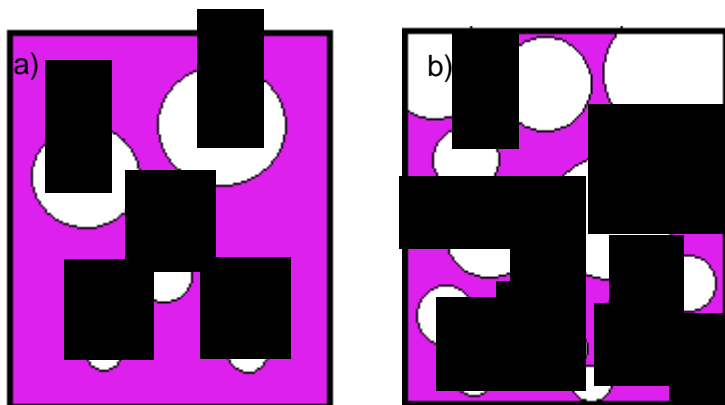


Figura 2: a) Segregación de las burbujas representando el principio de Arquímedes y b) Drenado gravitacional del líquido en la espuma húmeda.

✚ **Succión capilar:** Es la fuerza motriz que desplaza el líquido hasta los bordes de Plateau (bordes de la lamela formada por tres burbujas) (Figura 3a), debido a la diferencia de presiones que ocasiona la forma poliédrica (Figura 3b) que toman las burbujas y provoca que el líquido se desplace del centro de la película, para luego ser desalojado por drenado gravitacional.

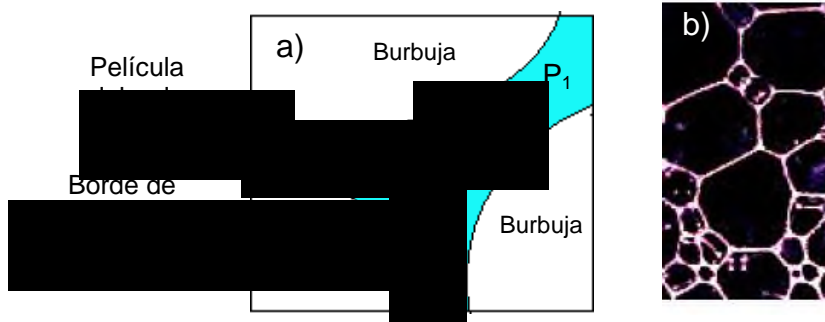


Figura 3: a) Succión capilar del líquido del centro de la película hasta los bordes de Plateau y b) Forma poliédrica que toman las burbujas.

✚ **Difusión gaseosa intra-burbuja:** Cuando las burbujas presentan la forma poliédrica, las películas intra-burbujas se comportan como películas planas

y delgadas de poco espesor lo que produce una difusión gaseosa a través de ésta película debido a la existencia de un gradiente de presión entre las películas. Este fenómeno, llamado maduración de Ostwald, se considera como la difusión de gas desde las burbujas pequeñas a las grandes lo que provoca la desaparición de las mismas (Figura 4). Este es el fenómeno que domina la evolución de las espumas en una escala de tiempo (algunos minutos a algunas horas). En resumen el número de burbujas disminuyen conforme transcurre el tiempo y las burbujas poco a poco se convierten en burbujas grandes sin que sea necesario que las películas se rompan (lo que se puede producir al mismo tiempo).



Figura 4: Aspectos de la evolución de una espuma debido a la Maduración de Ostwald.

2.4 Perfil cromatográfico

Se puede efectuar un perfil cromatográfico para el estudio de plantas con interés medicinal y/o alimenticio, con la finalidad de conocer su composición química. La llamada huella digital de una planta depende del extracto vegetal y de las condiciones definidas de análisis; esto conllevará a que se observe un perfil característico debido a la migración diferencial de los constituyentes de la planta. La huella dactilar cromatográfica de una planta es una característica obtenida por un procedimiento definido, separando tantos compuestos como sea posible para construir un patrón de reconocimiento específico. La identidad de estos componentes químicos puede ser conocida o desconocida. Puesto que todo el conjunto de compuestos caracteriza la composición química de la planta medicinal, la huella digital cromatográfica representa una metodología cualitativa razonable, en la cual todo el cromatograma es evaluado durante el análisis de datos para discriminar entre diferentes especies de la misma familia de plantas. La

obtención de un buen perfil cromatográfico que represente la fitoequivalencia de una planta medicinal depende de factores tales como: el procedimiento de extracción, el instrumento de medición y las condiciones de separación, entre otros. La mayoría de los procesos de extracción para plantas medicinales, emplean mezclas hidroalcohólicas como solvente de extracción y los solventes más comúnmente utilizados son agua, metanol y etanol (Lucio, 2012).

El perfil cromatográfico de un extracto de planta vegetal se realiza para fines de estandarización de extractos, identificación de plantas, determinación del perfil químico de una planta en diferentes épocas del año y análisis de productos fitoterapéuticos. Este perfil puede obtenerse mediante una cromatografía de gases (CG) y mediante el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (UHPLC); en ambos casos (CG y UHPLC) proporcionan cromatogramas, que detallan los compuestos separados y el área del pico de cada uno de ellos, que es proporcional a su concentración (Lucio, 2012).

Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC)

La UHPLC es un método popular empleado en el análisis de plantas medicinales debido a que es una técnica relativamente sencilla y muy versátil, ya que permite analizar compuestos tanto volátiles como no volátiles, polares como no polares y hasta iónicos. En general, la UHPLC puede ser empleada para analizar la mayoría de los compuestos presentes en las plantas medicinales. Entre los métodos cromatográficos para la toma de huellas dactilares de las plantas medicinales, el más popular sigue siendo la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de diodos (UHPLC-DAD). El uso de detectores de diodos en línea proporciona información adicional a los perfiles cromatográficos obtenidos a longitudes de onda simples, ya que se pueden obtener los espectros relacionados con cada uno de los picos, lo cual puede ser empleado como criterio de identificación y análisis de pureza de cada uno de los picos (Lucio, 2012).

3. ANTECEDENTES

Los agentes espumantes son sustancias capaces de formar y/o mantener una dispersión homogénea de una fase gaseosa en un alimento líquido o sólido, dentro de los surfactantes aniónicos el más utilizado es el Lauril éter sulfato sódico y los surfactantes no-iónicos nitrogenados como óxido de aminas, alcanolamidas, aminas y amidas etoxiladas: También se usan compuestos complejos como alcanolamidas o monoglicéridos sulfatados (Figura 5) (Salager, 1988).

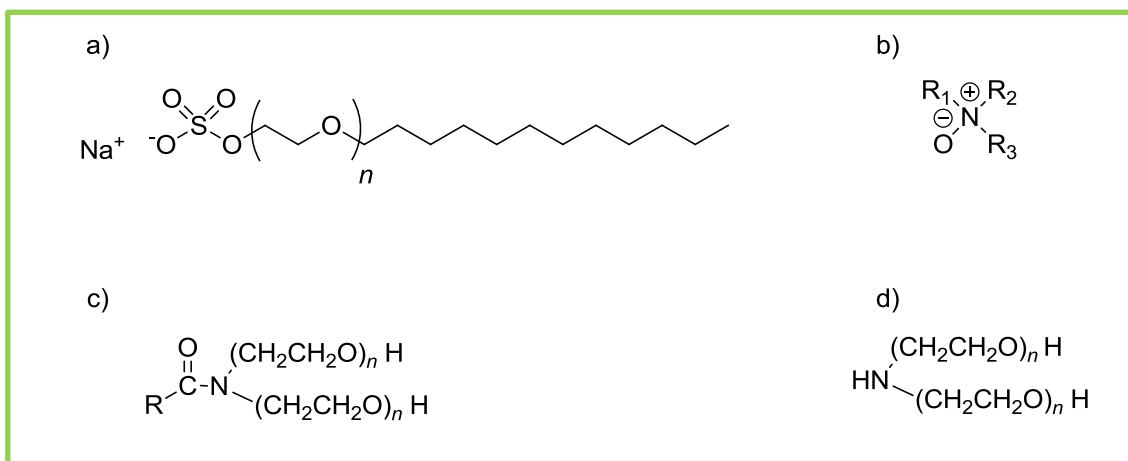


Figura 5: Ejemplos de surfactantes a) Lauril éter sulfato de sodio, b) Óxido de amina, c) Aminas y d) Amidas.

3.1 Saponinas

Las saponinas se han utilizado como detergentes, plaguicidas y molusquicidas. De manera industrial se han empleado como agentes de formación de espuma y agentes activos de superficie (tensoactivos). Incluso algunas saponinas se han utilizado como potenciadores de sabor y edulcorantes en alimentos y cigarrillos. Por ejemplo; el extracto obtenido a partir de la raíz de regaliz (*Glychirrhiza glabra*) que contiene saponinas triterpénicas: glicirricina (Figura 6), se utiliza como edulcorante y potenciador de sabor, también se utiliza en la industria del tabaco para mejorar el sabor del mismo. Una investigación reciente ha establecido a las saponinas como los componentes activos en muchas hierbas medicinales y han destacado los beneficios para la salud de los alimentos como la soja y el ajo. El potencial comercial de saponinas se ha traducido en el desarrollo de nuevas

estrategias de procesamiento y re-evaluación de las tecnologías existentes para su extracción y concentración. Existen dos principales fuentes comerciales de saponinas: las saponinas de yuca (*Yucca schidigera*) y quillaja (*Quillaja saponaria*). La yuca se cultiva en el desierto árido de México y el suroeste de EE.UU., y la quillaja es un árbol cultivado en zonas áridas de Chile (Kharkwal *et al.*, 2012).

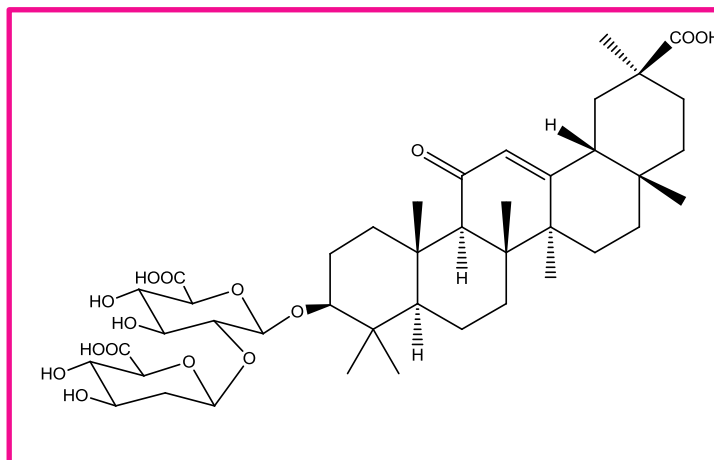


Figura 6: Estructura de la glicirricina.

Las saponinas son un grupo de sustancias glucosídicas que se disuelven en agua y poseen la peculiaridad de formar espumas al agitar la solución en donde se encuentran. Al someter estas sustancias a una hidrólisis ácida, microbiológica o enzimática se obtienen carbohidratos y una aglicona llamada “sapogenina”, la cual estructuralmente puede ser del tipo esteroidal (C_{27}) o triterpenoidal (C_{30}) de acuerdo con la Figura 7. Estos compuestos han sido aislados de diferentes fuentes vegetales. Las saponinas esteroidales son muy comunes en las familias *Liliáceas* (orden Liliales), *Dioscoreáceas* y *Solanáceas*, mientras que las saponinas triterpénicas lo son en las familias *Umbelíferas*, *Leguminosae*, *Caryofiláceas*, *Araliáceas*, *Rhamnáceas*, etc. (Marcano & Hasegawa, 2002).

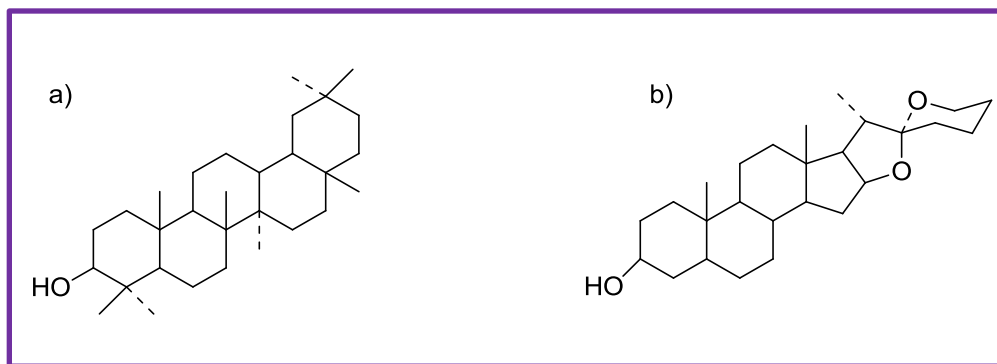


Figura 7: Estructuras base que pueden presentar las saponinas: a) Clase triterpénica y b) Clase esteroidal.

3.1.1 Aplicación de las saponinas en los alimentos

Las saponinas se han utilizado en los alimentos como agentes tensoactivos naturales y como conservadores en el control del deterioro microbiano en alimentos. Recientemente, debido a la preferencia del consumidor por sustancias naturales, las saponinas obtenidas a partir de la corteza del árbol de *Quillaja saponaria* se han utilizado como agente tensoactivo en emulsiones y como agente espumante en bebidas, lo que es una buena opción para la sustitución del uso del tensoactivos sintéticos Tweens (Piorkowski & McClements, 2013). En 2013 Yang *et al.*, compararon la eficacia del agente tensoactivo natural aislado de la corteza del árbol *Q. saponaria* (Q-Naturale®) frente un tensoactivo sintético (Tween 80). El agente Q-Naturale® fue capaz de formar gotas relativamente pequeñas ($\varnothing < 200$ nm) a bajas relaciones de tensoactivo/aceite (SOR < 0.1), usando homogeneización a alta presión (microfluidización), pero las gotitas no eran tan pequeñas como las producidas usando Tween 80 en condiciones similares (\varnothing ; 150 nm). Las gotitas recubiertas con Q-Naturale® se mantuvieron estables a la coalescencia en un intervalo de valores de pH (2 -8), con concentraciones de sales (0 - 500 mM NaCl) y temperaturas (20 -90 °C). Sin embargo, se observó una floculación de gotitas bajo condiciones altamente ácidas (pH 2) y fuertemente iónicas (≥ 400 mM NaCl), lo que se atribuyó a la detección de repulsión electrostática. De hecho, las gotitas revestidas con Q-Naturale® tenían una carga negativa relativamente alta a pH neutro que disminuyó en magnitud con la disminución del pH. En conclusión, los resultados mostraron que el tensoactivo

natural es eficaz y que podría sustituir a los tensoactivos sintéticos en los productos alimenticios y/o bebidas. También se ha demostrado que este surfactante natural obtenido a partir de *Q. saponaria* posee una alta estabilidad y eficacia por la formación de emulsiones para sistemas de administración de vitamina E, por lo que se recomienda para aplicaciones de encapsulación de alimentos y bebidas funcionales (Yang & McClements, 2013).

En la actualidad la empresa Ingredion comercializa agentes espumantes de la línea Foamation dentro de los cuales se encuentra el extracto de *Quillaja saponaria* "Foamation Q" para bebidas sin alcohol (con o sin gas), preparados líquidos para bebidas con o sin gas (concentrados de bebidas a base de agua saborizada, batidos, café, cappuccino, etc.), polvo para preparar bebidas con o sin gas (batidos, refrescos, café, cappuccino, té, etc.), pulpas, leche, extractos (té), infusiones (café), bebidas maceradas, bebidas a base de soja y bebidas heladas. Además cuenta con un producto "Foamation QY50" que es el resultado de la combinación del extracto de yuca y quillaja para aumentar el *mouthfeel* (traducido como tacto del gusto o sensación en la boca, es la interacción física y química del producto en la boca. Se evalúa desde la percepción inicial en el paladar, hasta la primera mordida, pasando por la masticación hasta la deglución y el retrogusto, de esta manera se puede reconocer; la viscosidad, la textura, y la suavidad de aquello que estamos degustando) de bebidas carbonatadas.

Recientemente se estudió la aplicación de saponinas como un agente bio-tensoactivo natural para mejorar las propiedades de superficie de los alimentos. En 2014 Wojciechowski *et al.*, realizaron un estudio para evaluar la actividad superficial entre las saponinas de *Q. saponaria* y la β -caseína de la proteína de la leche bovina, sugirieron que las saponinas obtenidas de la corteza de *Q. saponaria* se pueden utilizar como un bio-tensoactivo natural. Otro estudio reciente indicó que las micro y nanofibras del pseudo-tallo de plátano sometidas a tratamiento con saponina de *Sapindus mukorossi* mostraban diferencias en el grado de modificación y morfología de las fibras de celulosa. Determinaron parámetros que incluían el componente dispersivo de la energía superficial,

heterogeneidad superficial, área superficial, así como propiedades superficiales ácido-base para micro y nanofibras de plátano modificadas con saponina. Estos parámetros muestran un revestimiento de saponina más extenso sobre las nanofibras con una formación de red que se explica por la mayor reactividad de las nanofibras debido a la mayor energía superficial, interacción específica y mayor superficie presentada por las nanofibras. El perfil energético indicó que tanto las micro como las nanofibras recubiertas con saponina interactúan con los mismos sitios activos energéticos o similares. En conclusión el tratamiento con saponina reduce considerablemente el área superficial de las fibras, con la consecuente disminución de la capacidad de la monocapa. La interacción con las sondas polares indica claramente que el tratamiento con saponina crea nuevos sitios activos polares para interacciones específicas en ambas muestras. Los resultados muestran claramente que las saponinas pueden proporcionar enlaces de hidrógeno entre las superficies de las fibras mejorando el carácter hidrófobo y el carácter ácido-base de la superficie de la fibra. Este comportamiento induce a una mejor interacción polímero/fibra durante la preparación del material compuesto (Cordeiro *et al.*, 2013).

En 2010 Andreuccetti *et al.*, evaluaron la incorporación de plastificantes hidrófobos en una matriz de gelatina, utilizando saponinas extraídas a partir de *Yucca schidigera* (yuca) como emulsionante, en la producción de películas emulsionadas biodegradables utilizando la técnica de colado. Sus resultados mostraron que las películas a base de gelatina producidas tienen una buena resistencia mecánica, bajos valores de permeabilidad al vapor de agua y un tiempo de secado reducido, a pesar de que las películas presentan un alargamiento limitado, solubilidad considerable y opacidad. Por lo tanto, sugirieron que la posibilidad de utilizar este tensoactivo natural puede permitir nuevas aplicaciones en la preparación de películas biodegradables emulsionadas.

En 2013 Li *et al.*, investigaron el uso de saponinas a partir de un extracto de *Quillaja saponaria* como una alternativa del uso de sustancias bioquímicas naturales para la inactivación de virus transmitidos por los alimentos, la cual

mostró resultados favorables frente a rotavirus (ATCC VR-954), tanto en un ensayo en placa en el cual las células tratadas permanecen resistentes a la infección viral durante al menos 16 h, mientras que en la prueba *in vivo* con ratones se observó una disminución de la diarrea del 79 % al 11 %. Alberice *et al.* en 2012 observaron que las saponinas extraídas de *Sapindus saponaria* combinadas con un tratamiento térmico produce buenos resultados para la inactivación de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, para así evitar el deterioro del jugo de naranja que ocasiona esta bacteria.

3.1.2 Técnicas de extracción de saponinas

Las saponinas son extraídas tradicionalmente en mezclas acuosas con EtOH o *n*-BuOH, después de lo cual se elimina el disolvente orgánico por evaporación (Kharkwal *et al.*, 2012).

En general, las técnicas de extracción empleadas para la extracción de saponinas se pueden clasificar en dos categorías:

1. Convencional dentro de las cuales se encuentran las siguientes:

- ✚ Maceración: Es una extracción sólido-líquido en la que el compuesto de interés contenido en el material vegetal se extrae empapándolo en un disolvente específico por un período determinado de tiempo. La eficacia del proceso de maceración se determina por dos factores principales; solubilidad y difusión eficaz. La solubilidad se rige por la regla básica de "lo semejante se disuelve con lo semejante" esto quiere decir que los compuestos polares se disuelven en disolventes polares, y los compuestos no polares se disuelven en disolventes no polares. La velocidad de disolución de un soluto en el disolvente de extracción es determinada por la transferencia de masa del soluto contenido en el material vegetal hacia el disolvente debido al gradiente de concentración en la interfaz sólido-líquido demostrando que una difusión eficaz se lleva a cabo. El único factor de suma importancia en el que se debe presentar mucha atención en la mejora de la capacidad de extracción es el conocimiento de la similitud del

compuesto bio-activo de interés y la polaridad del disolvente. EtOH y MeOH son los disolventes de extracción más utilizados para extraer saponinas de material vegetal. La duración del tiempo de extracción es prolongado y en ocasiones toma hasta semanas utilizando este método, por lo tanto, la extracción por maceración a menudo es apoyada con un agitador mecánico o con agitación magnética de esta manera se acorta el tiempo de extracción (Choon *et al.*, 2014).

- ✚ Soxhlet y extracción por reflujo: Debido al principio de funcionamiento similar de Soxhlet y extracciones por reflujo, el proceso consiste en el calentamiento de una solución a ebullición y luego la devolución de los vapores condensados al matraz original, la única diferencia radica en que el aparato Soxhlet se compone de un dedal para alojar el material de la planta y en reflujo el material de la planta se deposita en el matraz que contiene el disolvente, ambas técnicas son utilizadas ampliamente en la industria alimentaria, no alimentaria y en los laboratorios. La desventaja de reflujo y extracción con Soxhlet es con respecto al tiempo ya que se requiere al menos una hora para una extracción. El etanol continúa siendo el disolvente más empleado para la extracción por reflujo, aunque también se puede emplear el metanol como disolvente de extracción. Los tiempos de extracción por reflujo varían desde minutos hasta 4 h, mientras que para Soxhlet es de 24 a 72 horas (Choon *et al.*, 2014).
- ✚ Extracción subsecuente: Existen numerosos estudios llevados a cabo para la extracción de saponinas utilizando dos métodos de extracción subsecuentemente. La finalidad de utilizar dos métodos de extracción se debe a que se desea altamente purificar el extracto antes de someterlo a análisis por HPLC para el aislamiento y la identificación de saponinas del material vegetal. La extracción Soxhlet se lleva a cabo primero para eliminar los lípidos del material vegetal usando un disolvente de baja polaridad tal como CHCl_3 y hexano, y subsecuentemente se realiza la extracción por reflujo (Choon *et al.*, 2014).

2. Tecnologías verdes dentro de las cuales se describen las siguientes:

- ✚ Extracción asistida por ultrasonido (EAU): El fenómeno de ultrasonido ocurre a través de la generación y subsiguiente colapso de burbujas de cavitación, las cuales aparecen, crecen y colapsan dentro del líquido. Esto ocurre asimétricamente cerca de las interfases y golpes sobre la superficie sólida para desnaturalizar la pared celular de la planta (Choon *et al.*, 2014).
- ✚ Extracción asistida por microondas (EAM): Las microondas son ondas electromagnéticas no ionizantes con una gama de frecuencias de 0.3 a 300 GHz. Recientemente, EAM ha llamado la atención en la extracción de compuestos bio-activos de material vegetal debido a la corta duración de la extracción, el uso mínimo de disolvente, y su mecanismo de calentamiento especial. Las microondas son capaces de penetrar en los biomateriales y generar calor mediante la interacción con moléculas polares tales como el agua en el interior de los materiales. La profundidad de penetración de las microondas en la matriz vegetal depende de la constante dieléctrica, el contenido de humedad, la temperatura y la frecuencia del campo eléctrico. El agua contenida en un material vegetal es responsable de la absorción de la energía de microondas que da lugar a sobrecalentamiento y la ruptura celular interna que, en consecuencia, facilita la difusión del compuesto bio-activo desde la matriz de la planta (Choon *et al.*, 2014).
- ✚ Extracción acelerada con disolvente (EAD): Se trata de una técnica de extracción rápida automatizada que utiliza una cantidad mínima de disolvente a temperatura y presión elevada. El empleo del aumento de la temperatura es para mejorar la solubilidad y la transferencia de masa de soluto a disolvente, y la presión elevada mantiene el disolvente por debajo de su punto de ebullición, lo que permite la extracción rápida, segura y eficiente de los analitos diana de materiales vegetales en el disolvente de extracción. Un proceso de extracción se completa generalmente en 15 a 25 min utilizando aproximadamente 15-45 mL de disolvente. Por lo tanto, se ha

aplicado ampliamente en los campos de medio ambiente, alimentación, polímeros y en investigaciones farmacéuticas (Choon *et al.*, 2014).

La temperatura de funcionamiento más usualmente aplicada y la presión de EAD son 100 °C a 1500 psi este método se utiliza sobre todo para extraer ginsenósidos de ginseng. La eficacia de la EAD en la extracción de saponinas se ha estudiado y comparado con otros métodos de extracción descritos anteriormente. En un estudio se obtuvo un rendimiento superior de saponinas a partir de semillas de vaca berberecho utilizando EAD en comparación con la extracción asistida por ultrasonido en disolventes puros y mezclas de H₂O con EtOH y MeOH respectivamente (Güçlü-Üntündağ *et al.*, 2007). Del mismo modo, el sistema de agua caliente a presión produce un mayor rendimiento en la extracción de ginsenósidos (11.2 mg/g) en comparación con la extracción asistida por ultrasonido (7.2 mg/g) de *Panax quinquefolium* (Engelberth *et al.*, 2010). Se presentó un ligero aumento en los rendimientos de saponinas que se obtuvieron de la extracción de *Aesculus chinensis* utilizando EAD, la extracción requirió un tiempo de extracción más corto de 7 min en comparación con reflujo y sonicación extracción de 1 h y 30 min, respectivamente (Chen *et al.*, 2007). La extracción con líquido presurizado mostró ventajas distintivas de rendimiento de la cantidad total de saponinas de 7.36 % con respecto a otros métodos de extracción verdes como el ultrasonido que obtuvo un rendimiento del 5.77 %, las extracciones convencionales de Soxhlet de 6.99 % y la maceración que obtuvo un rendimiento del 6 % en la extracción de saponinas a partir *Panax notoginseng* (Wan *et al.*, 2006).

3.1.3 Métodos de comprobación de presencia de saponinas

Para la identificación de saponinas se han desarrollado diversos ensayos, como el índice de hemólisis; este método se basa en la habilidad de las saponinas para lisar a los eritrocitos. Otro ensayo de uso común en la identificación de saponinas, es el número o índice de espuma el cual se basa en la medición de la altura y el

tiempo que dura la espuma formada por una solución de saponinas mediante agitación (Hernández *et al.*, 2005).

La cuantificación de sapogeninas mediante espectrofotometría UV-Vis es un método específico para la determinación espectrofotométrica de la sapogenina esteroide total, el cual se basa en la reacción colorimétrica empleando anisaldehído, H₂SO₄ y AcOEt, aplicable a cantidades de microgramos (µg). Las sapogeninas tienen las mismas propiedades colorimétricas, si se encuentran en estado libre, unidas con azúcares, esterificadas con ácido acético, mono- o polihidroxiladas (Baccou *et al.*, 1977).

3.2 Género *Smilax*

La familia *Smilacaceae* pertenece al orden *Liliales* y se encuentra constituida por 10 géneros y unas 400 especies de las regiones tropicales y templadas de ambos hemisferios. El género *Smilax* abarca aproximadamente 350 especies que se caracterizan por ser trepadoras o también conocidas como plantas de guía, ya que tienen tallos largos delgados y espinosos, en sus ramas poseen zarcillos con la función de fijarse a plantas u objetos para así poder ascender firmemente. Se encuentran distribuidas a lo largo de varios continentes, desde Asia, Europa Oceanía y gran parte de América, en las regiones con climas tropicales, subtropicales y templados (Ferrufino, 2010).

Estas plantas se utilizan como alimento y para la medicina tradicional, comúnmente se utiliza el rizoma, raíces, tallos y ocasionalmente las hojas, además que sus flores son ricas en néctar. Se les ha conferido el efecto inmunomodulador, antioxidante, antibacterial, antifúngico así como el alivio de malestares en la menopausia (Wan *et al.*, 2006). Además se han descrito propiedades farmacológicas del género *Smilax*, utilizadas para enfermedades como el cáncer, diabetes mellitus, enfermedades de la piel, úlceras, también se utiliza para el tratamiento de la fiebre, la gota, como diurético, enfermedades oftálmicas, infertilidad y como fuente de antioxidantes (Jiang & Xu, 2003).

En los últimos años el estudio de las plantas del género *Smilax* ha recobrado interés principalmente en países europeos y asiáticos debido a la presencia de flavonoides, además que se ha probado su efectividad en el tratamiento del cáncer. Adicionalmente, los extractos de algunos agentes etnobotánicos provenientes del género *Smilax* exhiben actividad pro-apoptótica así como actividad antioxidante. De la misma forma varias investigaciones han mostrado que son una fuente rica en saponinas con efecto antimicrobiano y citotóxico (Zubair et al., 2013). Las sapogeninas esteroidales encontradas en *Smilax* son; laxogenina (*Smilax sieboldi*), diosgenina (*Smilax zeylanica*), esmilagenina (*Smilax ornata*) sarsapogenina (*Smilax regillii*, *Smilax officinalis* y *Smilax medica*), tigogenina (*Smilax sieboldi*) y neotigogenina (*Smilax sieboldi*) (Murali et al., 2011; Grollier & Boudy, 1984; Okanishi et al., 1965).

Smilax sp. (llamada comúnmente cocolmecha o axquiate), es una planta trepadora que cuenta con zarcillos para poder adherirse a los troncos de los árboles y a otras plantas, crece en zonas templadas y tropicales de ambos hemisferios, sus hojas son ovaladas y los frutos son bayas ovoides con tonalidades entre marrón y vino.

3.3 Bebida prehispánica: “popo”

El “popo” es una bebida prehispánica, elaborada a base de cacao cuyo nombre proviene del nahua (lengua emparentada con el náhuatl) popocti que significa “cosa que humea o hace espuma”, en virtud de ser esta una de sus principales características, es elaborado a base de una pasta que se obtiene al moler en el metate cacao, azúcar, canela, arroz, dependiendo del lugar en donde se elabora se acostumbra agregarle masa de maíz, y las guías o tallos tiernos del axquiate (cocolmecha) una planta trepadora que crece en suelos arenosos en los acahuales y proporciona espuma a la bebida, llamada en Oaxaca cocolmecate o cocolmecha perteneciente al género *Smilax* y algunos investigadores lo asocian con las especies *cordifolia* o *pseudochina*, aunque por sus características taxonómicas es muy probable que su nombre científico sea *Smilax bona-nox*. Una vez reunidos todos los ingredientes el popo se bate enérgicamente con un molinillo de madera

(artefacto provisto de un extremo ancho dentado y con anillos, cuyo mango es sujetado con las palmas de las manos) efectuando con ellas una serie de movimientos giratorios hasta obtener abundante espuma (Figura 8a). La forma tradicional de beber el *popo* es en recipientes llamados **jícaras**, que en nahua se conocen como *xicalli*, que significa “*jícara de madera*”, fruto del árbol iguallo, güira o jícaro (*Crescentia cuete*) (Figura 8b).

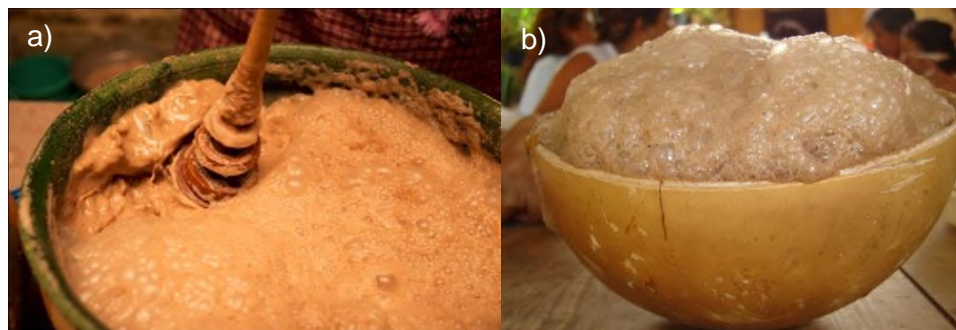


Figura 8: a) Agitación del popo con ayuda de un molinillo de madera para la formación de la espuma característica de la bebida y b) Jícara con la bebida “popo”.

Con algunas variantes, esta bebida de carácter ritual es preparada por diversos grupos étnicos asentados en el sur de Veracruz y en la cuenca del Papaloapan como; Tuxtepec perteneciente al estado de Oaxaca, Tres Valles, Otatitlán, Cosamaloapan y Tlacotalpan pertenecientes al estado de Veracruz.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las características espumosas son deseables en determinados tipos de alimentos y bebidas. El uso de un agente espumante natural como aditivo alimentario es una gran área de oportunidad debido a que muchos de los productos que presentan estas características son mundialmente comercializados como las cervezas, café, bebidas carbonatadas, helados, entre otros.

En la región de la Cuenca del Papaloapan y sus alrededores se prepara la bebida tradicional “popo”, en la cual se emplean los tallos de *Smilax* sp. (Cocolmeca), para producir la espuma que la caracteriza. En este trabajo se explora el uso de los tallos de esta planta como agente espumante de origen natural para su empleo como aditivo alimenticio en la generación y estabilización de espumas.

5. JUSTIFICACIÓN

La tendencia actual en el uso de aditivos para productos alimenticios es utilizar agentes de origen natural en sustitución de los agentes sintéticos, los cuales proporcionen una función específica al producto o bebida al cual son incorporados. En este sentido algunas industrias, tienen la necesidad de incorporar agentes espumantes para dar esta característica a sus bebidas. En la región del Papaloapan el extracto de la planta con la que se elabora la bebida del popo se vuelve una opción viable como uso de agente espumante debido al uso tradicional de esta planta en la elaboración de una bebida regional. Este extracto no ha sido estudiado por lo cual, su estudio como agente espumante representa un aporte muy importante desde el punto de vista alimenticio.

6. OBJETIVOS

General

Obtener y comparar dos técnicas (reflujo y ultrasonido) para el proceso de extracción acuosa de un agente espumante a partir del tallo de *Smilax* sp.

Específicos

- Obtener un extracto acuoso e hidroalcohólico a partir de los tallos de *Smilax* sp. con propiedad espumante mediante dos técnicas diferentes reflujo y ultrasonido.
- Comprobar y cuantificar la presencia de saponinas en el extracto.
- Efectuar el perfil fitoquímico preliminar a los extractos obtenidos.
- Efectuar el perfil cromatográfico a los extractos obtenidos.
- Realizar una prueba preliminar de aplicación en una bebida (café).

7. HIPÓTESIS

El extracto obtenido mediante sonicación y reflujo a partir de los tallos de *Smilax* sp. podrá ser utilizado como un agente espumante con posible aplicación en una bebida (café).

8. METODOLOGÍA

8.1 Recolección de materia prima:

La recolección de la planta *Smilax* sp. (Cocolmecha) se realizó en San Felipe Jalapa de Díaz (coordenadas 18° 04' latitud norte y 96° 32' longitud oeste, a una altura de 111 metros sobre el nivel del mar), localidad perteneciente al Distrito de Tuxtepec, en la región de la Cuenca del Papaloapan del estado de Oaxaca, México. La recolección se realizó en los meses de Febrero y Marzo.

8.2 Procesamiento del material vegetal

El material vegetal obtenido de los tallos de la planta se trituró en un molino de mano para granos alimenticios (Figura 9a), se almacenó en dos formas distintas; en un ultracongelador a -80 °C y en un congelador a una -8 °C, el cual permaneció en almacenamiento hasta su utilización. Posteriormente el material vegetal almacenado se deshidrató sometiéndolo a un proceso de liofilización en una liofilizadora (marca: LABCONCO; Figura 9b).



Figura 9: a) Molino manual con *Smilax* sp. y b) Equipo de liofilización con material vegetal molido.

8.3 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal de los alimentos comprende métodos de análisis básicos, que permiten identificar la cantidad de nutrimentos que componen a los alimentos como son: cenizas, proteínas, carbohidratos, fibra y grasa, así de esta manera proporciona información detallada de la concentración de éstos. Para la determinación del análisis químico proximal del material vegetal liofilizado se utilizaron los métodos oficiales de la AOAC de 2002.

8.3.1 Cenizas totales

La determinación en seco de cenizas totales es el método más común para cuantificar la totalidad de minerales en alimentos y se basa en la descomposición térmica de la materia orgánica quedando solamente el residuo inorgánico contenido en la muestra. Ésta técnica es eficiente ya que determina tanto cenizas solubles en agua como insolubles y solubles en medio ácido. En este método toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre los 550 - 600 °C y el residuo inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza.

Procedimiento

Se pesaron 2 g de muestra deshidratada en un crisol (a peso constante), posteriormente se carbonizó la muestra sobre la flama (Figura 10), la muestra carbonizada se colocó dentro de una mufla a 550 °C \pm 1 °C por 5 h hasta que las cenizas quedaron blancas, los crisoles se colocaron en un desecador hasta que se enfriaron y se pesaron.



Figura 10: Determinación de cenizas

El porcentaje de cenizas se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{peso del crisol con residuo}(g) - \text{peso del crisol vacío}(g)}{\text{peso de la muestra en base seca}(g)} \times 100$$

8.3.2 Grasa cruda

La estimación de lípidos se llevó a cabo mediante la técnica de Soxhlet, la cual consiste en una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y al condensarse gotea sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente. Posteriormente se sifonea al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso.

Procedimiento

Se pesaron 2 g de muestra deshidratada en un papel filtro (doblado en forma de cartucho), la cual se colocó en el aparato de extracción Soxhlet (Figura 11). Al matraz de recuperación se le adicionó $\frac{3}{4}$ partes de éter de petróleo, posteriormente se realizó la extracción por 4 h. Finalmente, el matraz se concentró y se colocó en una estufa a $90 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta sequedad (peso constante), se enfrió en un desecador.

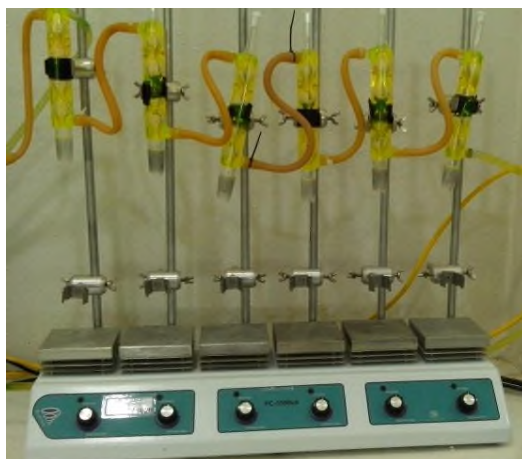


Figura 11: Equipo Soxhlet.

El porcentaje de lípidos se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{\text{peso final del matraz}(g) - \text{peso inicial del matraz}(g)}{\text{peso de la muestra en base seca}(g)} \times 100$$

8.3.3 Proteína cruda

La determinación de proteína cruda es el análisis más buscado y con mayor frecuencia que las proteínas o aminoácidos individuales. En general, el procedimiento de referencia Kjeldahl determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas.

El método se basa en la determinación de la cantidad de nitrógeno orgánico contenido en productos alimentarios que comprende dos pasos consecutivos:

- a) La descomposición de la materia orgánica al calentarla en presencia de ácido sulfúrico concentrado.
- b) El registro de la cantidad de amoníaco obtenida de la muestra.

Durante el proceso de descomposición ocurre la deshidratación y carbonización de la materia orgánica combinada con la oxidación de carbono a dióxido de carbono. Mientras el nitrógeno orgánico es transformado a amoníaco que se retiene en la disolución como sulfato de amonio. La velocidad de recuperación del nitrógeno puede incrementarse por la adición de sales que abaten la temperatura de descomposición (sulfato de potasio), o por la adición de oxidantes (peróxido de hidrógeno, tetracloruro, persulfatos o ácido crómico) y/o por la adición de un catalizador.

Procedimiento

Se pesaron 40 mg de muestra deshidratada y libre de grasas la cual se colocó en un tubo microkjeldahl, se le adicionó 2 g de mezcla de catalizador ($\text{HgO-K}_2\text{SO}_4$) y 3 mL de H_2SO_4 . Se digirió la muestra en un equipo de digestión de microkjeldahl (Figura 12a) manteniendo el calentamiento de 1.5-2 h hasta que clarificó (Figura 12b). El residuo obtenido se dejó enfriar, posteriormente se disolvió con 10 mL de

H₂O. En un matraz Erlenmeyer se colocaron 10 mL de solución de ácido bórico al 5 % con 2 gotas de indicador verde de bromocresol y se colocó en la terminal del condensador. Al tubo con muestra se le adicionaron 13 mL de solución de NaOH-Na₂S₂O₃ y enseguida se colocó en el destilador (Figura 12c), posteriormente se inició la destilación por arrastre de vapor, en donde se recolectaron aprox. 75-100 mL de destilado. La solución recolectada se tituló con HCl 0.1 N hasta que viró a un color verde (Figura 12d).

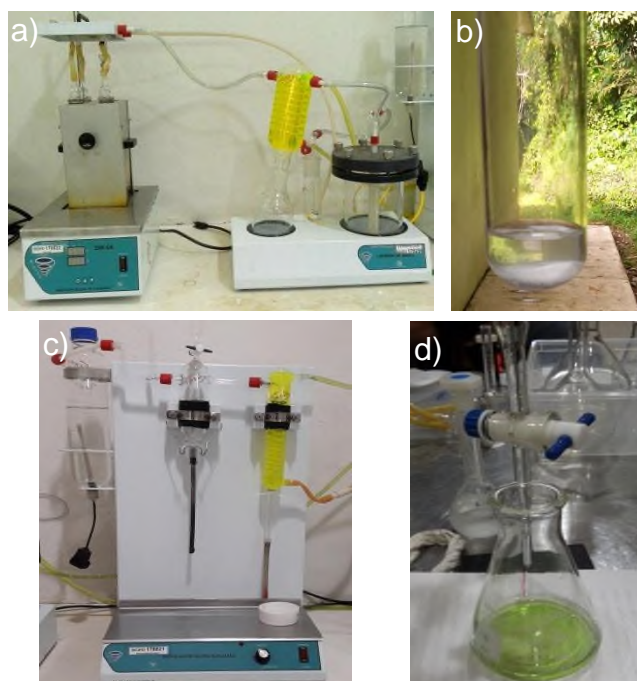


Figura 12: a) Equipo de destilación microkjeldahl, b) Muestra clarificada, c) Equipo de destilación y d) Solución titulada con color verde.

El porcentaje de nitrógeno total se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno total} = \frac{\text{mL gastados del HCl} \times N \text{ del HCl} \times 14}{\text{peso de la muestra en base seca}} \times 100$$

El porcentaje de proteína cruda se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Proteína cruda} = \% \text{ Nitrógeno total} \times F$$

Dónde:

N: Normalidad del ácido de valoración

14: Peso atómico del nitrógeno

F: Factor de conversión a proteína, 5.7

8.3.4 Fibra cruda

Se emplea como una medida del contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, materiales indigeribles en los alimentos. Por este método la fibra se determina mediante hidrólisis con H_2SO_4 y NaOH, pretendiendo simular una digestión ácida (estómago) y una alcalina (intestino), por lo cual representaría la fracción no digerible de los carbohidratos que se separa del material soluble en ácidos y álcalis diluidos. Los minerales insolubles se estiman por calcinación y la diferencia indica el contenido de fibra cruda (FC) presente.

Procedimiento

Digestión ácida: Se pesaron 2 g de muestra desengrasada y deshidratada, que se colocaron en un matraz de bola de 250 mL al cual se le agregaron 200 mL de H_2SO_4 al 1.25 % caliente, perlas de ebullición y unas gotas de antiespumante, posteriormente se puso a reflujo durante 30 min y se dejó enfriar. Se filtró el contenido a través del crisol Gooch (previamente a peso constante). lavando el matraz con 50 ml de agua destilada caliente y filtrando, el residuo se lavó 3 veces. Se removió el residuo y se colocó en el matraz nuevamente.

Digestión alcalina: Al matraz con el residuo del procedimiento anterior se le agregaron 200 mL de NaOH al 1.25 % caliente, perlas de ebullición y unas gotas de antiespumante y se puso a reflujo por 30 min. Se dejó enfriar el matraz y su contenido se filtró al vacío en un crisol Gooch.

Posteriormente el matraz se enjuagó con 25 mL de H_2SO_4 1.25 % y se lavó tres veces con agua destilada caliente y se filtró su contenido, el residuo contenido en el crisol Gooch se lavó con una porción de 25 mL de EtOH y se dejó secar al vacío. Finalmente el residuo se secó en la estufa a 110 °C durante 6 h (Figura

13a), se enfrió en un desecador y se registró el peso. Posteriormente se calcinó en una mufla durante 2 h a 600 °C, se dejó enfriar en la mufla hasta que llegó a 100 °C, el crisol se colocó en un desecador para enfriarse y finalmente se registró su peso (Figura 13b).

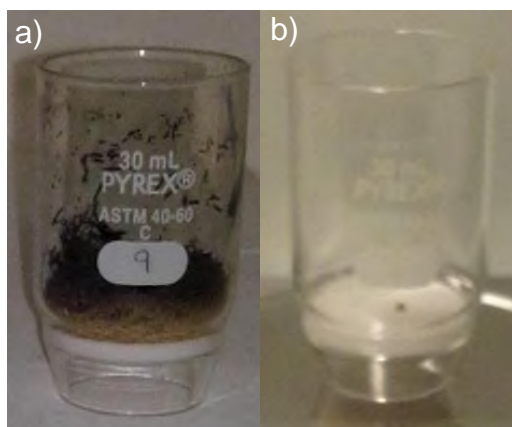


Figura 13: a) Crisol Gooch con la muestra después de someterse a la estufa y b) Crisol Gooch con la muestra después de someterse a la mufla.

El porcentaje de fibra cruda se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Fibra cruda} = [(W_1 - W_2) / W_0] * 100$$

Dónde:

W_0 = Peso de la muestra desengrasada y seca

W_1 = Peso del crisol con residuo seco

W_2 = Peso del crisol con residuo calcinado

8.4 Diseño experimental

Para la extracción de saponinas se empleó un diseño experimental en el cual fueron evaluados 3 factores de 2 tratamientos cada uno. Factor A: Fuente de almacenamiento (congelación y ultracongelación) del material liofilizado, Factor B: Método de extracción (sonicación y reflujo), Factor C: Disolvente de extracción (H_2O y $EtOH/H_2O$), con 2 variables de respuesta; % de rendimiento y altura de la espuma.

8.5 Obtención de los extractos

Al material vegetal liofilizado almacenado (ultracongelación y congelación) se le realizaron las extracciones por los métodos de reflujo y sonicación, como se describen a continuación:

✚ Extractos obtenidos mediante reflujo (a partir del material vegetal almacenado mediante ultracongelación y congelación) (Figura 14):

- Extracto H₂O: Se pesó 1 g de material vegetal liofilizado al cual se le añadió 40 mL de H₂O, se mantuvo en ebullición con apoyo de una columna de refrigeración para mantener el reflujo durante 20 min.
- Extracto EtOH/H₂O: Se pesó 1 g de material vegetal liofilizado al cual se le añadió 40 mL de EtOH/H₂O en una relación 1:1, se mantuvo en ebullición con apoyo de una columna de refrigeración para mantener el reflujo durante 20 min.



Figura 14: Sistema de reflujo.

✚ Extractos obtenidos mediante sonicación (a partir material vegetal almacenado mediante ultracongelación y congelación) (Figura 15a):

- Extracto H₂O: Se pesó 1 g de material vegetal liofilizado al cual se le añadió 40 mL de H₂O, para posteriormente colocarlo en un sonicador (modelo: UP 200 St-DT, marca: Hielscher) en el cual se empleó un sonotrodo S26d7 (7mm), con una potencia de 180 W y una amplitud del 20 % (Figura 15b).
- Extracto EtOH/H₂O: Se pesó 1 g de material vegetal liofilizado al cual se le añadió 40 mL de EtOH/H₂O en una relación 1:1 para posteriormente colocarlo en un sonicador (modelo: UP 200 St-DT, marca: Hielscher) en el cual se empleó un sonotrodo S26d7 (7mm), con una potencia de 180 W y una amplitud del 20 % (Figura 15b).

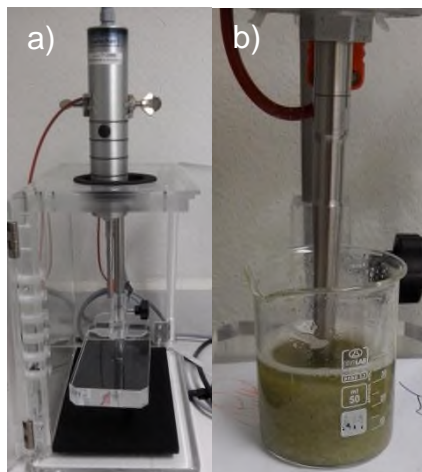


Figura 15: a) Equipo sonicación y b) Sonotrodo inmerso en el extracto de *Smilax* sp.

Los rendimientos de los extractos obtenidos se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{g \text{ de extracto}}{g \text{ material vegetal}} \times 100$$

8.6 Prueba de la espuma

Se tomó 1 mL de los extractos obtenidos mediante las técnicas de reflujo y sonicación y se colocó en un tubo de ensayo. A cada tubo se le adicionó 9 mL de H₂O destilada y se agitó vigorosamente durante 30 s, después de la agitación la mezcla se dejó reposar por 15 min; al término de este periodo la presencia de saponinas se evidencia por la espuma sobrenadante en donde la altura de la espuma (Tabla 2) proporciona un valor cualitativo del contenido de saponinas (Galindo *et al.*, 1989).

Tabla 2: Relación de la altura de la espuma con el contenido de saponinas.

Altura de la espuma	Contenido de saponinas
5 mm	No contiene
5-9 mm	Bajo contenido
10-14 mm	Contenido moderado
>15 mm	Alto contenido

Nota: Una solución acuosa que contenga saponinas se evidencia por la formación de una espuma estable como la obtenida al agitar una solución de jabón.

8.7 Prueba de la hemólisis

La hemólisis es el fenómeno de la desintegración de los glóbulos rojos. Ésta prueba se basa en la capacidad que tienen las saponinas para lisar a los glóbulos rojos, por ello el porcentaje de hemólisis está directamente relacionado a la concentración de saponinas (Pérez & Quitián, 2009).

Procedimiento de hidrólisis de las saponinas a sapogeninas

- 1) Evaporación de disolventes: Se partieron de extractos con una concentración de 0.0250 g/mL, se colocaron en un horno a una temperatura no superior a 60 °C hasta sequedad, se registró el peso para posteriormente agregar 50 mL de H₂O destilada para proceder al desengrasado.

- 2) Desengrasado de los extractos: Se midieron 50 mL de hexano que se colocaron en un embudo de decantación en el cual se agregó la fase acuosa que contenía al extracto, se agitó y se dejó en reposo por 30 min. Transcurrido éste tiempo se observaron dos fases (Figura 16), de la cual se recolectó la fase inferior que es la libre de grasas y se transfirió en un matraz de bola de 250 mL para su hidrólisis.



Figura 16: Embudo de decantación con las dos fases inmiscibles.

- 3) Hidrólisis: En un matraz balón se depositó la muestra desengrasada y se mezcló en cantidades iguales con una solución de HCl al 2.5 N, se ajustó a un condensador y se llevó a reflujo. La mezcla se mantuvo en agitación y calentamiento durante 4 h, transcurrido este tiempo se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y finalmente se transfirió la solución madre a recipientes de vidrio.

Realización de la prueba de la hemólisis: Se prepararon las soluciones de trabajo diluyendo la cantidad necesaria de la solución madre de sapogeninas en 100 mL con agua destilada de acuerdo con las diluciones de la Tabla 3; para la solución 1:10 se añadió 10 mL de la solución de sapogeninas en 90 mL

de H₂O destilada, en el caso de la solución 1:20 se añadió 5 mL de la solución de sapogeninas a 95 mL de H₂O destilada, para la solución 1:30 se añadió 3.3 mL de la solución de sapogeninas a 96.7 mL de H₂O destilada, en el caso de la solución 1:40 se añadió 2.5 mL de la solución de sapogeninas en 97.5 mL de H₂O destilada, para la solución 1:50 se añadió 2 mL de la solución de sapogeninas en 98 mL de H₂O destilada y para la solución 1:60 se añadió 1.7 mL de la solución de sapogeninas en 98.3 mL de H₂O destilada.

Tabla 3: Diluciones correspondientes para la prueba de hemólisis.

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

Procedimiento

Se colocaron 5 mL de cada concentración en un tubo de ensayo, se adicionó 0.02 mL de sangre con anticoagulante (EDTA) y se mezcló por inversión. Las muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente por 30 min. Se centrifugaron a 3000 gravedades por 10 min. Las absorbancias de cada uno de los sobrenadantes se leyeron a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Lambda 25 marca: PerkinElmer). Para el blanco se tomó el sobrenadante de un tubo con 0.85 % de solución salina y con glóbulos rojos (que representa el 0 % de hemólisis), y para el patrón se tomó el sobrenadante de un tubo con 0.10 % de solución salina y glóbulos rojos (que representa el 100 % de hemólisis).

El % de hemólisis se determinó mediante la siguiente fórmula:

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

8.8 Cuantificación de sapogeninas mediante Espectrofotometría Uv-Vis

Para esta determinación se utilizó como estándar la sapogenina esteroidea *Diosgenina* (Sigma, CAS: 512-04-9). Se prepararon 2 tipos de reactivos; reactivo A (0.5 % de *p*-anisaldehído y 99.5 % de AcOEt) y el reactivo C (relación 1:1 de H₂SO₄ y AcOEt).

Procedimiento

Se colocaron de 0-40 µg de sapogenina en 2 mL de AcOEt contenidos en un vial y se añadió 1 mL de reactivo A y 1 mL de reactivo C y se agitaron, posteriormente se colocaron los viales en un baño de agua manteniéndolos a 60 °C durante 20 min y se dejaron enfriar durante 10 minutos en un baño de agua mantenido a temperatura ambiente. Se realizó un barrido en un espectrofotómetro UV/Vis (Lambda 25 marca: PerkinElmer; Figura 17) para medir la λ_{\max} la cual fue de 435 nm (Baccou *et al.*, 1977).



Figura 17: Espectrofotómetro de UV-Vis.

A partir de este método se procedió a elaborar una curva de calibración utilizando como estándar la *Diosgenina*. El contenido de sapogeninas se puede obtener a partir de la ecuación que se obtiene de la curva de calibración. En donde; “x” hace referencia al contenido de sapogeninas expresado en mg/mL y “y” es la absorbancia de la muestra.

8.9 Evaluación del pH

Procedimiento

Se elaboró una solución al 4 % (v/v) de los extractos con H₂O destilada la cual se colocó en un vaso de precipitado, posteriormente con ayuda de un potenciómetro

calibrado se midió el pH introduciendo el electrodo en las muestras, enjuagando el electrodo entre muestra y muestra con H₂O destilada (FAO, 2005).

8.10 Perfil fitoquímico preliminar

Teniendo en cuenta que la especie empleada para este trabajo no ha sido identificada, en este trabajo se realizó un análisis fitoquímico preliminar cualitativo que permitió establecer la presencia de metabolitos secundarios como: alcaloides, flavonoides, esteroides, triterpenos, carbohidratos, antraquinonas, proteínas, emodinas, glucósidos, taninos, saponinas y cumarinas, el procedimiento para la identificación de éstos metabolitos se detalla en la Tabla 4 (Patil & Deshmukh, 2016).

Tabla 4: Procedimiento de perfil fitoquímico preliminar para metabolitos específicos.

Metabolito	Condiciones	Resultado
Terpenoides	2 mL del extracto se disuelven en 2 mL (CH ₃ CO) ₂ O y se añaden de 2-3 gotas de H ₂ SO ₄ (conc.).	<i>El color rojo oscuro indica la presencia de terpenoides.</i>
Esteroides	2 mL del extracto se disuelven en 2 mL de CHCl ₃ y se añaden 2 mL de H ₂ SO ₄ (conc.).	<i>La formación de un anillo color rojizo indica la presencia de esteroides.</i>
Taninos	2 mL de extracto se disuelven en 2 mL de H ₂ O y se añaden de 2-3 gotas de FeCl ₃ al 5 %.	<i>La formación de un precipitado verde indica la presencia de taninos</i>
Saponinas	5 mL de extracto se mezcla con 20 mL de H ₂ O destilada y se agitan durante 15 min.	<i>La formación de espuma indica la presencia de saponinas.</i>
Flavonoides	1 mL de extracto se añade 1 mL de Pb(OAc) ₄ al 10 %.	<i>La observación de una coloración amarilla indica la presencia de flavonoides.</i>
Carbohidratos	Prueba de Molisch: Se toman 2 mL del extracto se le añaden 10 mL de H ₂ O, se le adicionan 2 gotas de α-naftol etanólico al 20 % y se le añaden 2 mL de H ₂ SO ₄ conc.	<i>La formación del anillo de color violeta rojizo indica presencia de carbohidratos.</i>
Proteínas	1 mL de extracto se le añade 1 mL de	<i>La formación de un precipitado blanco</i>

	H ₂ SO ₄ (conc.).	<i>indica la presencia de proteínas.</i>
Cumarinas	2 mL del extracto se añaden 3 mL de NaOH al 10 %.	<i>La coloración amarilla indica la presencia de cumarinas.</i>
Alcaloides	2 mL del extracto se le añaden unas pocas gotas del reactivo de Hager.	<i>La formación de un precipitado color amarillo indica la presencia de alcaloides.</i>
Emodinas	2 mL del extracto se añaden 2 mL de NH ₄ OH y 3 mL de benceno.	<i>La coloración rojo indica la presencia de emodinas.</i>
Antraquinonas	3 mL del extracto se añaden 3 mL de benceno y 5 mL de NH ₃ 10 %.	<i>La formación de una capa con coloración rosa, rojo o violeta indica la presencia de antraquinonas.</i>
Glucósidos	2 mL de extracto se añaden CHCl ₃ y 2 mL de CH ₃ COOH.	<i>La coloración de violeta a azul y a verde indica la presencia de glucósidos.</i>

8.10.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Procedimiento

Se puntearon los extractos de sonicación y reflujo con la técnica de almacenamiento por ultracongelación y extraído por un sistema de disolvente 1:1 EtOH/H₂O, se eluyeron en diferentes sistemas de disolventes variando la polaridad con el fin de obtener el sistema adecuado de disolventes en el cual se pudiesen separar mejor a los metabolitos. Se empleó como fase estacionaria para los metabolitos más apolares una placa de gel de sílice (SiO₂) grado 60 de 0.2 mm de espesor ALUGRAM Xtra SIL G/UV254 de Macherey-Nagel y para los metabolitos más polares se empleó como fase estacionaria una placa de gel de sílice grado 60 C₁₈ de Merck KGaA.

Para el revelado de las placas obtenidas se utilizó: una lámpara de luz ultravioleta UVG-11 de onda corta de 254 nm y de onda larga de 365 nm, una cámara de Yodo y por inmersión: en *p*-anisaldehído, ácido *p*-toluensulfónico y H₂SO₄ al 50 %, para posteriormente someterlas a una parrilla de calentamiento a 100 °C durante 5-10 minutos. El factor de retención (R_f) para los metabolitos de cada extracto, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

8.11 Perfil cromatográfico

Procedimiento

Preparación de las muestras: Se pesó 0.5 g del material vegetal liofilizado al cual se le añadieron 15 mL de MeOH y se colocó en un baño ultrasónico a temperatura ambiente por 30 min. Las operaciones se repitieron dos veces y el residuo se lavó con 5 mL de disolvente. Al extracto obtenido se le añadió una cantidad de 20 mL de solución de HCl (10 %, v/v), se calentó para hidrolizar en un baño de agua durante 30 min y se enfrió. Posteriormente se transfirió el extracto metanólico a un embudo de separación y se le adicionó 30 mL de CHCl₃, se recogió la capa inferior y se repitió esta operación tres veces. La parte extraída con CHCl₃ se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió con una cantidad apropiada de metanol; después se transfirió a un matraz aforado de 25 mL y el volumen se completó hasta su aforo con MeOH. Los extractos se filtraron a través de un filtro de jeringa (0.2 µm). Se inyectó una alícuota de 5 µL de solución para el análisis de UPLC-MS (Yi *et al.* 2014). Del mismo modo se utilizó el procedimiento para obtener dos extractos más, lo único que se modificó fue la técnica de extracción, que en este caso fueron mediante sonicación y reflujo, para obtener un total de tres extractos para analizar.

Preparación del estándar: Se suspendieron 10 mg de *Diosgenina* (Sigma) en 10 mL de MeOH para obtener una concentración de 1 mg/mL; posteriormente se realizó una dilución del estándar para obtener una concentración de 10 µg/mL (Yi *et al.* 2014).

Condiciones de la separación cromatográfica: Se utilizó una columna cromatográfica Acquity UPLC BEH C₁₈ a (1.7 µm, 2.1 × 100 mm). La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0.1 % (v/v) en H₂O (A) y ácido fórmico al 0.1 % (v/v) en ACN (B) usando una elución isocrática del 82 % (v/v) (B) en 0-10 min. El caudal de disolvente fue de 0.3 mL/min, el volumen de inyección fue de 5 µL, la

temperatura de la columna se fijó a 40 °C y la longitud de onda de detección fue de 203 nm con una ventana espectral 200-400 nm (Yi *et al.* 2014).

Equipo: Para el análisis de las muestras se utilizó un equipo UHPLC Acquity Arc, Waters que consta de un detector de arreglo de diodos 2998 PDA detector, un sistema Sample Manager FTN-R y una bomba cuaternaria Manager-R (Figura 18)



Figura 18: Equipo de UHPLC.

8.12 Prueba preliminar del extracto en una bebida

Para ésta prueba se utilizó el extracto que presentó la mayor cantidad de saponinas de acuerdo con los resultados obtenidos de las pruebas anteriores. La bebida que se utilizó fue café caliente marca CAFIVER elaborado en una cafetera con una concentración de 0.0452 g/mL. La metodología empleada fue una adaptación de la prueba de la espuma que se describió anteriormente (Galindo *et al.*, 1989).

Procedimiento

Para la prueba se utilizó 1 mL de extracto rico en saponinas que se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de café, a este tubo se le realizó la prueba de la espuma agitándolo vigorosamente durante 30 s, posteriormente se dejó en reposo durante 15 min, transcurrido éste tiempo se le registró la altura de la

espuma y se comparó con un blanco que contenía 1 mL de H₂O destilada y 9 mL café.

8.13 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de significancia $\alpha= 0.05$, utilizando el paquete estadístico Statgraphics (Centurion XVI, versión 16.02.04) efectuando una comparación de medias.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Análisis proximal

A la muestra del material vegetal liofilizado, almacenada mediante ultracongelación, se le efectuó el análisis proximal que constó de: cenizas, grasa cruda, fibra cruda, proteína cruda y carbohidratos (Tabla 5). Esto fue realizado con la finalidad de tener referencia acerca de la composición de la planta y para los fines de futuras aplicaciones, los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5 : Resultados del porcentaje del análisis proximal.

Análisis	Porcentaje (%)
Cenizas	3.56 ± 0.04
Grasa cruda	0.45 ± 0.03
Fibra cruda	18.06 ± 0.66
Proteína cruda*	6.98 ± 0.2
Carbohidratos	70.8 ± 0.88

*N x 5.7. Los carbohidratos se determinaron por diferencia.
Los valores representan la media de tres experimentos ± error estándar.

Guambo en el 2016 realizó un análisis químico proximal de la raíz de *Smilax aspera*, en donde se encontró que dicho material vegetal presentó un contenido de cenizas de 1.56 %, fibra 4.5 %, grasa cruda de 1.2 %, carbohidratos 84.5 % y un contenido de proteínas del 6.39 %. Este último valor (proteínas) coincide con lo encontrado en esta investigación (6.98 %). Sin embargo el contenido de cenizas, carbohidratos, grasa y fibra fue muy diferente al resultado obtenido en esta investigación. Estas diferencias entre el material vegetal pueden ser debidas a las características agronómicas o factores edafoclimáticos del espécimen o simplemente que se trata de otra especie.

9.2 Obtención de extractos y prueba de la espuma

El material vegetal liofilizado almacenado en ultracongelación y congelación se procesó mediante dos metodologías extractivas diferentes (reflujo y sonicación), empleando dos sistemas de disolventes distintos (H₂O y EtOH/H₂O), de igual forma los extractos se sometieron a la prueba de la espuma la cual establece que al agitar una solución acuosa de saponinas se forma una espuma estable, como la

formada al agitar una solución acuosa de jabón, la finalidad de esta prueba fue encontrar las mejores condiciones para el proceso de extracción de saponinas presentes en *Smilax* sp., los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Resultados del rendimiento y prueba de la espuma de los extractos de *Smilax* sp.

EXTRACTOS DE <i>Smilax</i> sp.				
Factor A	Factor B	Factor C	Variables respuesta	
Almacenamiento	Método de extracción	Disolvente	Rendimiento (%)	Prueba de la espuma (cm)
Ultracongelación	Sonicación	H ₂ O	6.42 ± 0.05 ^a	3.67 ± 0.58 ^a
		EtOH/H ₂ O	7.34 ± 0.03 ^b	11.67 ± 0.58 ^b
	Reflujo	H ₂ O	5.41 ± 0.13 ^c	5.33 ± 0.58 ^c
		EtOH/H ₂ O	6.74 ± 0.02 ^d	7.67 ± 0.58 ^d
Congelación	Sonicación	H ₂ O	6.05 ± 0.12 ^e	2.00 ± 0.00 ^e
		EtOH/H ₂ O	6.61 ± 0.16 ^f	5.67 ± 0.58 ^f
	Reflujo	H ₂ O	5.36 ± 0.08 ^g	2.67 ± 0.58 ^g
		EtOH/H ₂ O	6.435 ± 0.04 ^h	5.00 ± 0.00 ^h

Los valores representan la media de tres experimentos ± error estándar.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística (p<0.05).

Efectuando el comparativo estadístico por tipo de almacenamiento (Factor A) para el caso de sonicación, en los cuales se evaluaron dos sistemas de disolventes diferentes (Factor C), se encontró que el mejor método de almacenamiento es el de ultracongelación ya que hubo diferencia significativa frente a congelación. Para ambos métodos de almacenamiento el mejor sistema de disolventes es EtOH/H₂O ya que presentó los resultados más altos en la prueba de la espuma que fueron significativamente diferentes si se empleara únicamente H₂O. La ultracongelación es el mejor tipo almacenamiento ya que obtuvo valores más altos en % de rendimiento y en la prueba de la espuma (variables respuesta), que son significativamente diferentes que si se empleara congelación con el sistema de

disolventes EtOH/H₂O. En el caso del método de extracción por reflujo; se realizó la misma comparación que en el caso anterior y los resultados fueron similares, se encontró que el mejor tipo de almacenamiento es el de ultracongelación con un sistema de disolventes EtOH/H₂O, donde se obtuvieron los valores más altos en la prueba de la espuma y en el % de rendimiento que son significativamente diferentes que si se empleara congelación con el mejor sistema de disolventes EtOH/H₂O.

El mejor rendimiento (7.34 %) y la mejor altura de la prueba de la espuma (11.67 cm) se obtuvieron con material vegetal almacenado mediante ultracongelación, utilizando sonicación como método de extracción y empleando EtOH/H₂O como disolvente. Se observa que las saponinas extraídas a partir del material vegetal almacenado por ultracongelación fueron mejores en % de rendimiento y en la prueba de la espuma. De alguna forma la temperatura de almacenamiento de -80 °C contribuyó a una mejor extracción de saponinas y con una mayor capacidad de formación de espuma.

En cuanto al método de extracción por reflujo (Factor B), se observan que los resultados de % de rendimiento y de la altura en la prueba de la espuma se obtuvieron cuando se empleó como disolvente EtOH/H₂O, tanto para sonicación como para reflujo independientemente del tipo de almacenamiento.

El resultado de la prueba de la espuma para el mejor extracto de *Smilax* sp. (11.67 ± 0.58), presenta un nivel moderado de saponinas en comparación con los resultados obtenidos por Galindo *et al.* en 1989 (partiendo de extractos con 10 g de material vegetal en 60 mL de disolvente), determinaron que el contenido de saponinas para las hojas de *Trichantera gigantea* es bajo y para las especies *Inga spectabilis* y *Gliricidia sepium* es moderado (de acuerdo con la Tabla 2). Tomando en cuenta las diferentes concentraciones con los que se realizaron los extractos de Galindo *et al.* (0.17 g/mL) y los del presente trabajo (0.025 g/mL), los resultados moderados de *Inga spectabilis* y *Gliricidia sepium* son similares a los obtenidos por *Smilax* sp. por lo que si se aumentara el contenido de material vegetal con el que

se realizó el extracto del presente trabajo el resultado del contenido de saponinas con la prueba de la espuma sería alto.

Un motivo por el cual se obtuvo el mejor extracto mediante sonicación se debe a que los principales efectos del ultrasonido en un medio líquido se atribuyen a los fenómenos de cavitación que provienen de los procesos físicos que crean, agrandan e implotan microburbujas de gases disueltos en el líquido, cuando estas burbujas colisionan sobre la superficie de un material sólido, la alta presión y la temperatura liberadas generan microjets y ondas de choque dirigidas hacia la superficie sólida. La alta presión y temperatura implicadas en este proceso destruyen las paredes celulares de la matriz vegetal y su contenido se libera en el medio, debido a esto es más eficiente la extracción de todos los componentes presentes en la planta (Pringret *et al.*, 2013), lo que explica mejor el resultado de las altas alturas obtenidas referentes al método de extracción ya que a mayor altura de espuma es directamente proporcional a un mayor contenido de saponinas. Debido a que en el método de reflujo la temperatura la determina el punto de ebullición del disolvente utilizado, en éste caso la temperatura de ebullición del EtOH es de 78.37 °C aproximadamente, esta temperatura pudo haber intervenido en la estabilidad de las saponinas ya que se extrajeron a una temperatura elevada.

9.3 Prueba de hemólisis

La prueba de la hemólisis se le realizó a una muestra ultracongelada de cada tipo de extracción (sonicación y reflujo) obtenida con una mezcla hidroalcohólica con los dos mejores índices de espuma. La prueba fue positiva y los porcentajes altos de hemólisis en cada muestra correlacionan con los ensayos de espuma presentados anteriormente, en donde los resultados con mayor producción de espuma son los resultados con mayor porcentaje de hemólisis (Tabla 7). Con lo anterior se confirma la presencia de saponinas en los extractos por su relación directamente proporcional entre los resultados de las pruebas de espuma y hemólisis (Pérez & Quitián, 2009).

Tabla 7: Resultados de la prueba de la hemólisis.

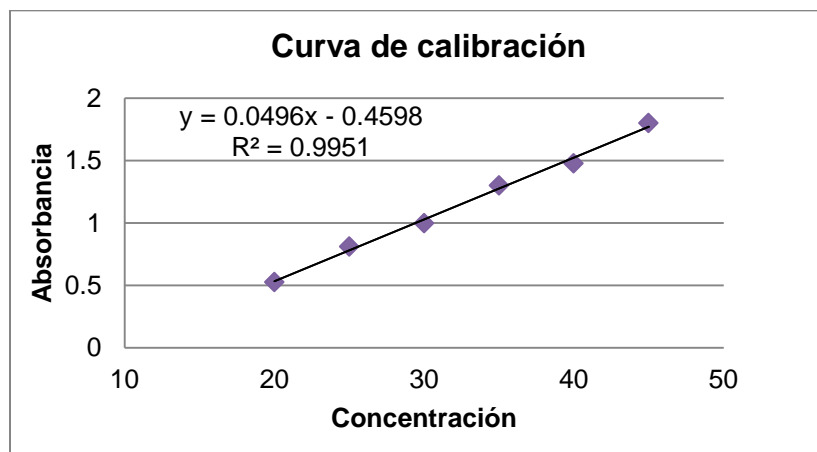
Extracto	% Hemólisis
Sonicación	89.94 ± 0.3 ^a
Reflujo	64.33 ± 0.37 ^b

Los valores representan la media de tres experimentos ± error estándar.
 Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Comparando los métodos de extracción de saponinas (Tabla 6) y el porcentaje de hemólisis (Tabla 7), se observa que el porcentaje más alto corresponde al extracto que presenta un mayor índice de espuma que se refiere al extracto obtenido por el método de sonicación, mientras que el porcentaje de hemólisis más bajo es el extraído por el método de reflujo, estos resultados ratifican la extracción por el método de sonicación como el más eficiente para la extracción de saponinas.

9.4 Cuantificación de sapogeninas mediante Espectrofotometría Uv-Vis

La cuantificación de sapogeninas se le realizó a una muestra ultracongelada de cada tipo de extracción (sonicación y reflujo) obtenida con una mezcla hidroalcohólica. Las concentraciones de las cuales se partieron para conocer la cantidad de sapogeninas son: 0.010293 g/mL para el extracto de sonicación y 0.01245 g/mL para el extracto de reflujo. Mediante la curva de calibración (Figura 19) se determinó que el extracto que presentó un mayor contenido de sapogeninas fue el obtenido por sonicación (37.873 µg/mL) (Tabla 8).

**Figura 19:** Curva de calibración para la cuantificación de sapogeninas.

$$y = 0.0496x - 0.4598$$

$$x = \frac{y + 0.4598}{0.0496}$$

Tabla 8: Resultados del contenido de saponinas.

Extracto	Absorbancia	Contenido de saponinas
Sonicación	1.4187 nm	37.873 µgmL ± 0.11 ^a
Reflujo	0.8120 nm	25.641 µg/mL ± 0.23 ^b

Los valores representan la media de tres experimentos ± error estándar.
Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

El análisis estadístico de las concentraciones que se obtuvieron a partir de la cuantificación de las saponinas demostraron una diferencia significativa entre los extractos (sonicación y reflujo), siendo el extracto obtenido por el método de sonicación el que mostró un mayor contenido de saponinas, lo que permite corroborar de una manera más certera el método más eficiente para la extracción de saponinas, dado que las saponinas están directamente relacionadas a la cantidad de la saponinas presentes en el extracto, solo que la saponina pertenece únicamente al constituyente aglicona de la saponina principal.

9.5 Evaluación del pH

Los valores de pH obtenidos son; 6.12 para el extracto obtenido mediante sonicación y 6.13 para el obtenido mediante reflujo. Lo que refleja que no existe variación de los valores de pH. Por lo que se puede decir que ambos métodos son similares en este aspecto.

9.6 Perfil fitoquímico preliminar

El análisis fitoquímico preliminar de ambos extractos (sonicación (S) y reflujo (R)) mostró la presencia de esteroides, saponinas, cumarinas y carbohidratos (Tabla 9).

Tabla 9: Resultados del perfil fitoquímico preliminar.

Metabolito	Resultado	
Esteroides	R(+)	S(+)
Carbohidratos	R(+)	S(+)
Cumarinas	R(+)	S(+)
Saponinas	R(+)	S(+)
Terpenoides	R(-)	S(-)
Flavonoides	R(-)	S(-)
Taninos	R(-)	S(-)
Proteínas	R(-)	S(-)
Alcaloides	R(-)	S(-)
Emodinas	R(-)	S(-)
Antraquinonas	R(-)	S(-)
Glucósidos	R(-)	S(-)

En la detección de esteroides se observó la formación de un anillo rojizo, para ésta determinación se utilizaron como controles colesterol (*Sigma*) y β -sitosterol, y como blanco H₂O (Figura 20a). La formación del anillo se observa con mayor intensidad en el extracto de sonicación en comparación con el extracto de reflujo, así mismo es probable que éste positivo se deba a que la saponina presente sea de origen esteroidal lo que está de acuerdo con Marcano & Hasegawa (2002), en donde las saponinas esteroidales son muy comunes en orden *Liliales*, que es el orden al que pertenece *Smilax* sp.

En la detección de carbohidratos se observó la formación del anillo de color violeta en la interfase de ambos extractos. Para ésta determinación se utilizaron como controles glucosa (*Sigma*) y sacarosa, y como blanco H₂O (Figura 20b).

La presencia de saponinas se demostró por la formación característica de espuma en la superficie del líquido al agitar los extractos vigorosamente. Para ésta determinación se utilizó como control *Quillaja saponaria* (Sigma-Aldrich) y como blanco H₂O (Figura 20c).

La presencia de cumarinas se detectó por la coloración amarilla que toma la solución al ser expuesta a un medio básico (Figura 20d). Para ésta determinación se utilizó como control un derivado de ácido cinámico. Esta clase de metabolitos también ha sido descrita para *Smilax domingensis* (Cáceres *et al.*, 2011).

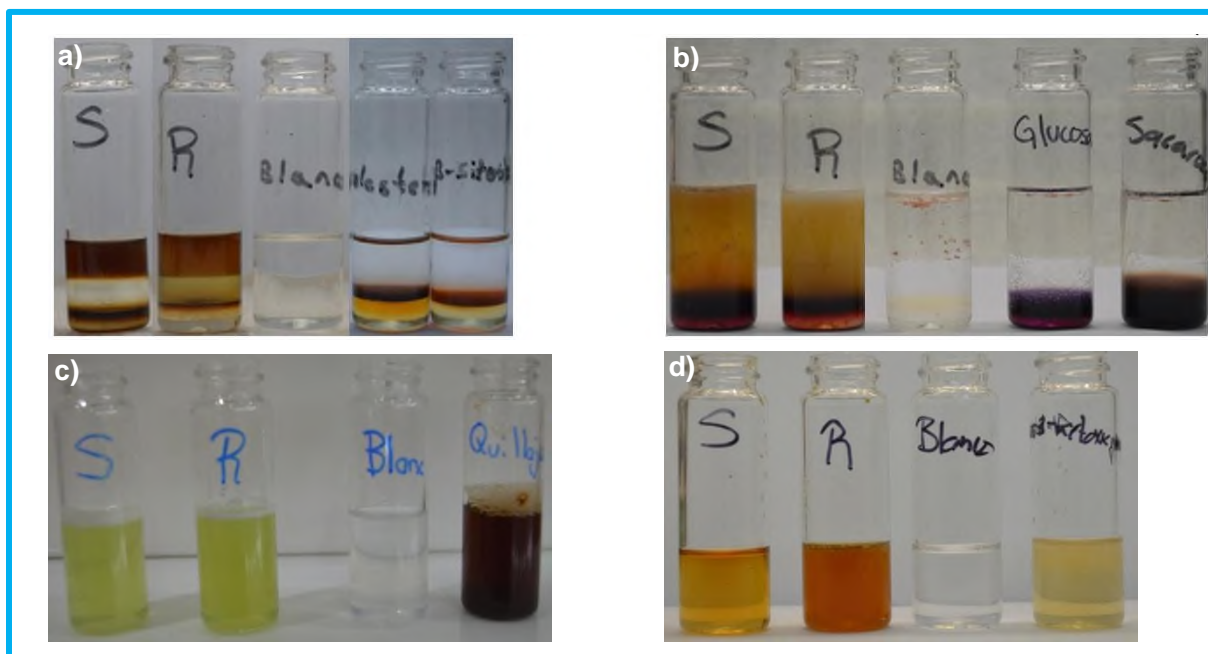


Figura 20: Resultados positivos del perfil fitoquímico preliminar de: a) Esteroides, b) Carbohidratos, c) Saponinas y d) Cumarinas.

9.6.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

En todas las placas se muestrearon los extractos hidroalcohólicos (sonicación y reflujo) de acuerdo con los datos obtenidos de la prueba fitoquímica preliminar.

El análisis de CCF se realizó en placas de aluminio donde se utilizó como fase estacionaria: gel de sílice y como fase móvil: sistema de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1). Para los extractos obtenidos mediante sonicación (S) y reflujo (R), se detectó la presencia de los compuestos en las placas mediante el uso de reveladores físicos (UV) y químicos (I_2 , H_2SO_4 , *p*-anisaldehído y ácido *p*-toluensulfónico) (Figura 21).

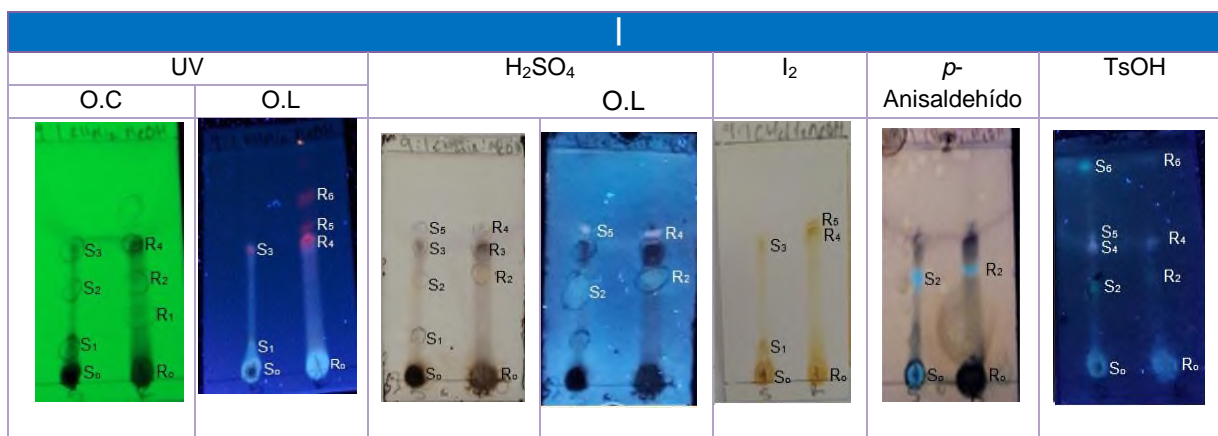


Figura 21: Análisis de CCF para los extractos obtenidos, en un sistema CH₂Cl₂/MeOH (9:1).

La cromatografía en capa fina muestra que los extractos de sonicación (S) y reflujo (R) presentan al menos 7 componentes principales al ser tratadas con diferentes agentes reveladores. Se enlistaron los R_f de los componentes encontrados para ambos extractos se muestran en la Tabla 10, de acuerdo con su aparición en la placa mediante el uso de agentes reveladores.

Tabla 10: R_f de los componentes encontrados en los extractos de *Smilax* sp. en las placas de gel sílice en un sistema CH₂Cl₂/MeOH (9:1).

Representación		R _f	O.C	O.L	H ₂ SO ₄	I ₂	Anisaldehído	TsOH
S ₀	R ₀	0	✓ X	✓ X	✓ X	✓ X	✓	✓ X
S ₁		0.1282	✓	✓	✓	✓		
R ₁		0.2051	X					
S ₂		0.3077	✓		✓		✓	✓
R ₂		0.3333	X		X		X	X
S ₃		0.4359	✓	✓	✓	✓		
S ₄	R ₃	0.4615			X			✓
S ₅	R ₄	0.4744	X	X	✓ X	X		✓ X
	R ₅	0.7179		X		X		
S ₆	R ₆	0.9417		X				✓ X

Al exponer las placas a la luz UV de onda corta (O.C, λ= 254 nm), para el extracto de sonicación se observan sólo 4 compuestos S₀, S₁, S₂ y S₃, y en el extracto de reflujo 4 compuestos R₀, R₁, R₂ y R₄, que deben de ser compuestos que presentan grupos cromóforos en su estructura que absorben a esa longitud de onda, de los cuales un punto presenta el mismo R_f (R₀=S₀) en ambos extractos. Al cambiar a una longitud de onda larga (O.L, λ= 365 nm), se observan para el extracto de

sonicación sólo 3 compuestos S_0 , S_1 y S_3 , y en el extracto de reflujo se observan 4 compuestos R_0 , R_4 , R_5 y R_6 , que deben ser moléculas que presentan grupos cromóforos que absorben a esa longitud, en donde S_0 , S_1 y R_0 emiten un color azul S_3 , R_4 , R_5 y R_6 emite un color rojizo, de los cuales sólo comparten 1 compuesto $R_0=S_0$ ($R_f=0$) en ambos extractos.

Al someter a las placas a un revelador universal como el H_2SO_4 , se observan en el extracto de sonicación sólo 5 compuestos S_0 , S_1 , S_2 , S_3 y S_5 , mientras que en el extracto de reflujo se observan 4 compuestos R_0 , R_2 , R_3 y R_4 , de los cuales sólo comparten 2 compuestos $R_0=S_0$ ($R_f=0$) y $R_4=S_5$ ($R_f=0.4744$) en ambos extractos.

Al observar la misma placa en O.L se observa en el extracto de sonicación 2 compuestos que emiten un color azul R_2 y S_2 , del mismo modo en el extracto de reflujo se observan 2 compuestos que emiten un color rojizo R_4 y S_5 . Éste revelador permite visualizar casi todas las clases de compuestos (Jork *et al.*, 1990), por lo que la mayor parte de las sustancias presentes en los extractos (saponinas, esteroides, cumarinas y carbohidratos) deberían ser visibles. Sin embargo, 2 compuestos (iguales) pertenecientes a los extractos de sonicación y reflujo no fueron observadas con este revelador.

En las placas reveladas con yodo (I_2), se observa que para el extracto de sonicación hay solo 3 compuestos S_0 , S_1 y S_3 , mientras que para el extracto de reflujo se observan 3 compuestos R_0 , R_4 y R_5 , de los cuales sólo comparten 1 compuesto $R_0=S_0$ ($R_f=0$) en ambos extractos. Éste es un revelador universal reactivo para sustancias lipofílicas por lo que los compuestos revelados con este reactivo deben presentar estas características.

Al exhibir a las placas a un revelado con anisaldehído, se observan en el extracto de sonicación sólo 2 compuestos S_0 y S_2 , mientras que en el extracto de reflujo se observa 1 compuesto R_2 . Éste revelador es reactivo para antioxidantes, esteroides, carbohidratos, fenoles, glucósidos y saponinas (Jork *et al.*, 1990), por lo que se puede atribuir a la presencia de alguno de éstos compuestos ya que

en los resultados de la Tabla 9 del perfil fitoquímico, la prueba fue positiva para esteroides, carbohidratos y saponinas para ambos extractos.

El revelado de las placas con TsOH, se observan en el extracto de sonicación solo 5 compuestos S₀, S₂, S₄, S₅ y S₆, mientras que en el extracto de reflujo se observan solo 4 compuestos R₀, R₂, R₄, y R₆, de los cuales sólo comparten 3 compuesto R₀=S₀ (R_f= 0), R₄=S₅ (R_f= 0.4744) y R₆=S₆ (R_f= 0.9417) en ambos extractos. Éste revelador es reactivo para esteroides, flavonoides y catequinas. En base a esto y a los resultados de la Tabla 9 del perfil fitoquímico se puede decir que estos compuestos corresponden a la presencia de esteroides y/o saponinas esteroidales, ya que la prueba demostró la ausencia de flavonoides, así mismo se podrían descartar las catequinas ya que pertenecen a la familia de los flavonoides.

El análisis de CCF en fase reversa se utilizó como fase estacionaria: sílice C₁₈ y como fase móvil: sistema 1:1 de CH₂Cl₂/MeOH, para los extractos obtenidos mediante sonicación (S) y reflujo (R), se detectó la presencia de los compuestos en las placas mediante el uso de reveladores físicos (UV) y químicos (I₂, H₂SO₄, *p*-anisaldehído y ácido *p*-toluensulfónico) para cada extracto (Figura 22).

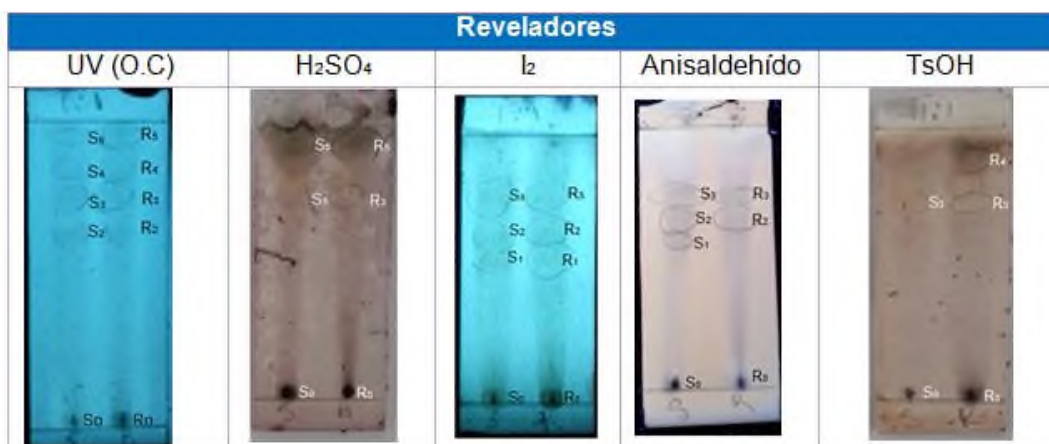


Figura 22: Análisis de CCF de los extractos obtenidos, en un sistema CH₂Cl₂/MeOH (1:1).

La cromatografía en capa fina muestra que los extractos de sonicación (S) y reflujo presentan al menos 6 componentes principales al ser tratadas con diferentes agentes reveladores. Se enlistaron los R_f de los componentes encontrados para ambos extractos, de acuerdo con su presencia a través de los reveladores en la

placa mediante el uso de los reveladores físicos (UV) y químicos (I_2 , H_2SO_4 , *p*-anisaldehído y ácido *p*-toluensulfónico) (Tabla 11).

Tabla 11: R_f de los componentes encontrados en el extracto de ultrasonificación en las placas de gel de sílice C₁₈ en un sistema de CH₂Cl₂/MeOH (1:1).

Representación	R _f	O.C	H ₂ SO ₄	I ₂	anisaldehído	TsOH
S ₀	R ₀	0	✓ X	✓ X	✓ X	✓ X
S ₁	R ₁	0.5514		✓ X		
S ₂	R ₂	0.6512	✓ X	✓ X	✓ X	
S ₃	R ₃	0.7442	✓ X	✓ X	✓ X	✓ X
S ₄	R ₄	0.8606	✓ X			X
S ₅	R ₅	0.9535	✓ X	✓ X		

Al exponer las placas a la luz UV de onda corta (O.C, $\lambda = 254$ nm), en los extractos se observan solo 4 compuestos para el de sonicación se observan S₀, S₂, S₃, S₄ y S₅, mientras que para el reflujó se observan R₀, R₁, R₂, R₄ y R₅, que deben de ser compuestos que presentan grupos cromóforos en su estructura que absorben a esa longitud de onda.

Al someter a las placas a un revelador universal como el H₂SO₄, en los extractos se observan solo 3 compuestos para el de sonicación se observan S₀, S₃ y S₅, mientras que para el de reflujó se observan R₀, R₃ y R₅. Éste revelador permite visualizar casi todas las clases de compuestos (Jork *et al.*, 1990), por lo que la mayor parte de las sustancias presentes en los extractos (saponinas, esteroides, cumarinas y carbohidratos) deberían ser visibles. Sin embargo, 2 manchas pertenecientes a los extractos de sonicación y reflujó no se observaron con este revelador.

En las placas reveladas con yodo (I₂), se observa que para el extracto de ultrasonificación solo 4 compuestos S₀, S₁, S₂ y S₃, mientras que para el extracto de reflujó se observan 3 compuestos R₀, R₁, R₂ y R₃. Éste es un revelador universal que es reactivo para sustancias lipofílicas por lo que los compuestos observados deben presentar estas características.

Mientras que en las placas reveladas con anisaldehído, se observan en el extracto de sonicación sólo 4 compuestos S₀, S₁, S₂, y S₃, mientras que en el extracto de

reflujo se observan solo 3 compuesto R_0 , R_2 y R_3 . Éste revelador es reactivo para antioxidantes, esteroides, carbohidratos, fenoles, glucósidos y saponinas (Jork *et al.*, 1990), se le puede atribuir la presencia de alguno de éstos compuestos ya que en los resultados de la Tabla 9 del perfil fitoquímico, la prueba fue positiva para esteroides, carbohidratos y saponinas para ambos extractos.

Al tratar las placas a un revelado con TsOH, se observan en el extracto de sonicación solo 2 compuestos S_0 , y S_3 , mientras que en el extracto de reflujo se observan solo 4 compuestos R_0 , R_3 y R_4 . Éste revelador es reactivo para esteroides, flavonoides y catequinas. En base a esto y a los resultados de la Tabla 9 del perfil fitoquímico se puede decir que estas manchas corresponden a la presencia de esteroides y/o saponinas esteroidales, ya que la prueba demostró la ausencia de flavonoides, así mismo se podrían descartar las catequinas ya que pertenecen a la familia de los flavonoides.

9.7 Perfil cromatográfico

Se realizó un perfil cromatográfico para los hidrolizados de ambos extractos y siguiendo la metodología de Yi *et al.* 2014. El cromatograma obtenido es representativo para los 3 hidrolizados (Figura 23), en donde se observa que no existe una diferencia significativa entre la extracción de las muestras analizadas, ya que ambas presentan un perfil cromatográfico similar en donde hay 2 compuestos con diferente tiempo de retención a la *Diosgenina*, en donde el compuesto que sale alrededor del minuto 2 es más polar que la *Diosgenina*, mientras que el compuesto que sale alrededor del minuto 9 es menos polar que la *Diosgenina*. El espectro de UV de la *Diosgenina* ($R_f = 4$ min) muestra que este esteroide no posee ningún grupo cromóforo característico. Analizando los 2 compuestos que salen en el extracto de *Smilax* sp. se puede observar que presentan espectros de UV similares como se muestran en las gráficas que se encuentran en la parte superior de cada compuesto (Figura 23), lo que se podría deber a dos esteroides funcionalizados con un grupo cromóforo similar con una ligera modificación estructural ya que su R_f es distinto en el perfil cromatográfico.

El pico con $R_f = 1$ min se le conoce como tiempo muerto y en esta señal se observan los compuestos que no interaccionan con la columna.

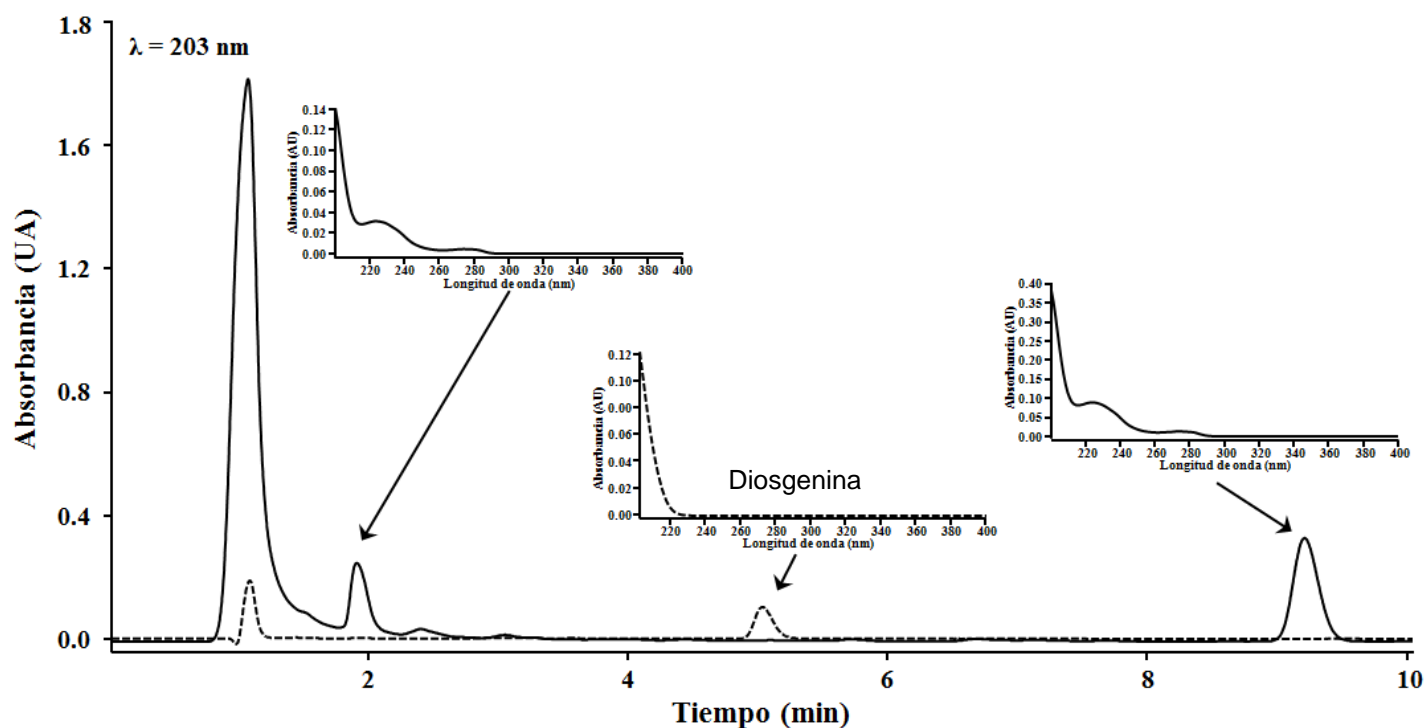


Figura 23: Cromatograma en fase inversa para el extracto hidrolizado de *Smilax sp.* vs Diosgenina.

Análisis de CCF de las sapogeninas

Para el análisis de CCF de las sapogeninas que se analizaron por UPLC (Figura 24), se efectuó en un sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) en una placa de gel de sílice, la cual se sometió a un revelado con anisaldehído y se tomó como referencia a la *Diosgenina*. Las sapogeninas presentes en ambos extractos muestran un R_f similar al de la *Diosgenina* ($R_f = 0.5315$).



Figura 24: Sapogeninas reveladas con anisaldehído.

9.8 Prueba preliminar del extracto en una bebida

El extracto evaluado es el que mostró los mejores resultados de las pruebas anteriores, el cual se obtuvo mediante sonicación con un sistema EtOH/H₂O (1:1) partiendo de 1 g de material vegetal liofilizado en 40 mL de disolvente. La prueba preliminar consistió en realizar la prueba de la espuma a una muestra de café que contenía el extracto rico en saponinas (S1), comparándolo contra un blanco (café sin extracto) en un lapso de tiempo definido (15 min). A un T= 0 min (T₀) se realizó una análisis estadístico el cual indica que existe una diferencia significativa ($p < 0.5$) en la generación de la espuma, en donde la muestra S1 presentó casi el doble de la espuma generada por el blanco (6.9 cm vs 3.7 cm; Figura 25a). Mientras que a un T= 15 min (T₁₅) se observó una mayor disminución de la altura de la espuma en el blanco debido a una menor estabilidad de la misma, en donde la altura final del blanco fue de 0.9 cm mientras que en la muestra S1 fue de 6.5 cm (Figura 25b).

Tabla 12: Alturas de la prueba preliminar del extracto en una bebida (café).

Tubo	Tiempo= 0 min	Tiempo= 15 min
Blanco	3.7 cm ± 0.1 ^a	0.9 cm ± 0.5 ^b
Muestra	6.9 cm ± 0.15 ^c	6.5 cm ± 0.17 ^d

Los valores representan la media de tres experimentos ± error estándar.

Letras diferentes en la misma fila y columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

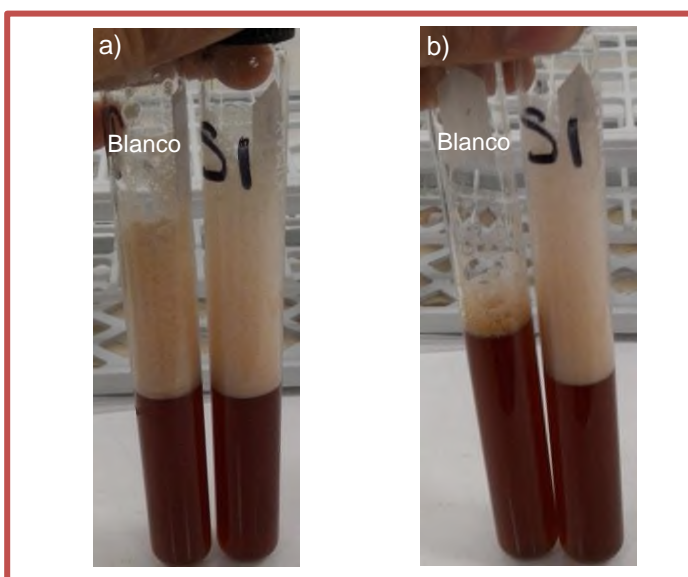


Figura 25: Prueba preliminar del extracto de *Smilax* sp. en una bebida a) a un T=0 min y b) a un T=15 min.

A partir de estos resultados (Tabla 12) se puede comprobar la presencia y la acción de las saponinas del extracto *Smilax* sp. en el café, ya que aparte de generar espuma ejercen su acción como surfactante al estabilizar la espuma formada (Figura 25b) de acuerdo con Yang & McClements en 2013. Lo anterior se confirma debido a que la espuma generada en el T_0 en comparación a la espuma en el T_{15} disminuye notablemente en el blanco (de 3.7 cm a 0.9 cm), en cambio la muestra de café con extracto presentó una estabilización de la espuma formada ya que solo tuvo una ligera disminución de la altura durante el lapso de tiempo evaluado (6.9 cm a 6.5 cm; sin embargo estadísticamente existe una diferencia significativa entre T_0 y T_{15}).

10. CONCLUSIONES

- ✚ Se determinó el contenido de cenizas (3.56 % \pm 0.04), grasa cruda (0.45 % \pm 0.03), fibra cruda (18.06 % \pm 0.66), proteína cruda (6.98 % \pm 0.2) y carbohidratos (70.8 % \pm 0.88) del material vegetal liofilizado. Al no tener una referencia de apoyo para relacionar la planta, resulta de interés ésta aportación para en un futuro rectificar que se trata del mismo espécimen.
- ✚ La detección de la presencia de saponinas en el tallo de *Smilax* sp. se efectuó mediante las pruebas fitoquímicas preliminares, del mismo modo se pudieron detectar metabolitos secundarios de tipo esteroidal, cumarínico y carbohidratos en ambos extractos.
- ✚ Se corroboró que la concentración de saponinas en los diferentes extractos está influenciado por el método de extracción, el tipo de almacenamiento y el sistema de disolventes empleado. Así mismo, se comprobó que la extracción mediante sonicación fue la mejor alternativa para la obtención de los mejores rendimientos de extracción del material vegetal liofilizado con una mezcla EtOH/H₂O (1:1) y un almacenado por ultracongelación.
- ✚ El método colorimétrico mediante UV-Vis, para la determinación de la concentración de sapogeninas esteroidales totales de una muestra se considera factible debido al coeficiente de correlación obtenido en la curva de calibración. La cuantificación mostró que el extracto de sonicación contuvo el mayor contenido de sapogeninas.
- ✚ Se confirmó que *Smilax* sp. puede ser utilizado como fuente potencial de saponinas, así mismo como surfactante y agente espumante para bebidas y/o posiblemente para alimentos, ya que en la prueba preliminar de café (blanco y bebida con el extracto) demostró estabilizar la espuma inicial formada al presentar una menor disminución de la altura de la espuma en comparación con el blanco durante un tiempo de 15 min.

- ✚ El análisis de CCF permitió obtener un perfil cromatográfico de los componentes presentes en los extractos crudos y el método de UPLC mostró dos compuestos (sapogeninas) con diferente tiempo de retención que compartían el mismo grupo cromóforo que podrían provenir de las saponinas presentes en el extracto responsables de la propiedad espumante.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alberice, J.V., Funes-Huacca, M.E., Guterres, S.B., Carrilho, E. 2012. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by saponin extracts combined with heat-treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 159: 130-135.
- Andreuccetti, C., Carvalho, R.A., Grosso, C.R.F. 2010. Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers and saponin from *Yucca schidigera* as the surfactant. *Food Research International*. 43: 1710-1718.
- AOAC. 2002. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, *International Gaitherstourg*. 16a Ed. E.U.U.
- Arengas, T.J., Riudiaz, E. 2006. Estudio del comportamiento de las espumas generadas en el lavado de carbones por flotación mediante el uso de mezclas densas tipo CCTA. *Universidad de Santander*. Tesis de Licenciatura.
- Baccou, J.C., Lambert, F., Sauvaire, Y. 1977. Spectrophotometric method for the determination of total steroidal saponin. *Analyst*. 102: 458-465.
- Bateman, B., Warner, J.O., Hutchinson, E., Rowlandson, P., Gant, C., Grundy, J., Fitzgerald, C., Stevenson, J. 2004. The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Archives of Disease in Childhood*. 89: 506-511.
- Belandria, V.C. 2001. Estabilización de espumas no acuosas en presencia de sólidos finos. *Universidad de los Andes*. Tesis de Licenciatura.
- Cáceres, A., Cruz, S., Martínez, V., Gaitán, I., Santizo, A., Gatusso, S., Gatusso, M. 2011. Ethnobotanical, pharmacognostical, pharmacological and phytochemical studies on *Smilax domingensis* in Guatemala. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22: 43-44.
- Chen, J., Li, W., Yang, B., Guo, X., Lee, F.S., Wang, X. 2007. Determination of four major saponins in the seeds of *Aesculus chinensis Bunge* using accelerated solvent extraction followed by high-performance liquid

- chromatography and electrospray-time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 596: 273-280.
- Choon, C., Hanna, K.S., Rabiha, S. 2014. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*. 59: 16-37.
 - Cordeiro, N., Faria, M., Abraham, E., Pothan, L.A. 2013. Assessment of the changes in the cellulosic surface of micro and nano banana fibres due to saponin treatment. *Carbohydrate Polymers*. 98: 1065-1071.
 - Engelberth, A.S., Clausen, E.C., Carrier, D.J. 2010. Comparing extraction methods to recover ginseng saponins from American ginseng (*Panax quinquefolium*), followed by purification using fast centrifugal partition chromatography with HPLC verification. *Separation and Purification Technology*. 72: 1-6.
 - FAO. 2005. *Quillaia extract (type 1)*. Recuperado el 15 de marzo de 2016, de http://www.fao.org/ag/agn/jecfa_additives/specs/monograph3/additive-367.pdf
 - Fennema, O. R., Damodaran, S., Parkin, K.L. 2010. Química de los alimentos. Madrid, España: Acribia.
 - Fernández, A., Salager, J.L. 2004. Surfactantes: I. Generalidades y II. Materias primas. *Universidad de los Andes*. Recuperado el 22 de abril de 2016 de <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S301.pdf>
 - Ferrufino, L. 2010. Taxonomic revision of the genus *Smilax* (*Smilacaceae*) in Central America and the Caribbean Islands. *BGBM*. 402: 227-280.
 - Galindo, W.F., Rosales, M., Murgueitio, E., Larrahondo, J.E. 1989. Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacerredo y matarratón. *Livestock. Research for Rural Development*. Recuperado de www.fao.org/ag/aga/agap/frg/lrrd/lrrd1/1/mauricio.htm
 - Grollier, J. F., Boudy, F. (1984). *U.S. Patent No. 4,481,185*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
 - Guambo, D. M. 2016. Identificación de los metabolitos secundarios de la raíz de zarzaparrilla (*Smilax aspera*), para la elaboración de una bebida. *Universidad Nacional de Chimborazo*. Tesis de Licenciatura.

- Güçlü-Üntündağ, Ö., Balsevich, J., & Mazza, G. 2007. Pressurized low polarity water extraction of saponins from cow cockle seed. *Journal of Food Engineerin.* 80: 619-630.
- Hernández, R., Lugo E., Díaz L., Villanueva, S. 2005. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de agave lechuguilla Torrey. *E-Gnosis.* 3: 2-3.
- Ibáñez F.C., Torre P., Irigoyen, A. 2003. Aditivos alimentarios. *Universidad Pública de Navarra.* Recuperado el 6 de abril 2016 de http://www.nutricion.org/publicaciones/revista_agosto_03/funcionales/aditivo_s.pdf
- Jiang, J., Xu, Q. 2003. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 85: 53-59.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H. 1990. *Thin-layer chromatography: reagents and detection methods.* Cambridge, Nueva York: VCH.
- Kharkwal, H., Panthari, P., Kant, M., Kharkwal, H., Kharkwal, A.K., Joshi, D.D. 2012. Foaming glycosides: A review. *Journal of Pharmacy.* 2: 23-28.
- Li, D., Baert, L., Uyttendaele, M. 2013. Inactivation of food-borne viruses using natural biochemical substances. *Food Microbiology.* 35: 1-9.
- Lucio, J.R. 2012. Aplicación de métodos quimiométricos para la caracterización y control de calidad de plantas medicinales. *Universidad Autónoma de Barcelona.* Tesis de Doctorado.
- Marcano, D., Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica orgánica.* Caracas Venezuela: U.C.V., consejo de desarrollo científico y humanístico.
- Morcillo, D., Cortés, E., García, J. 2013. *Biotechnología y alimentación.* Madrid, España: UNED.
- More, S., Vartak, A., Vince, R. 2012. The Butter Flavorant, Diacetyl, Exacerbates β -Amyloid Cytotoxicity. *Chemical Research in Toxicology.* 25: 2083-2091

- Murali, A., Ashok, P., Madhavan, V. 2011. In vitro antioxidant activity and hptlc studies on the roots and rhizomes of *Smilax zeylanica* L. (*Smilacaceae*). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3: 191-195.
- Okanishi, T., Akahori, A., Yasuda, F. 1965. Studies on the Steroidal Components of Domestic Plants. XLVII. Constituents of the Stem of *Smilax sieboldi* MIQ. (1). The Structure of Laxogenin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 13: 545-550.
- Patil, U.S., Deshmukh, O.S. 2016. Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used as traditional medicine. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 7: 77-81.
- Pérez, J.L., Quitián, L.A. 2009. Evaluación de métodos de extracción de saponinas de los residuos del beneficio del fique. *Universidad Industrial de Santander*. Tesis de Licenciatura.
- Piorkowski, D.T., McClements, D.J. 2013. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*. 42: 1-37.
- Pringret, D., Fabiano A., Chemat, F. (2013). Chapter 3: *Ultrasound-assisted Extraction*. En M. Rostango y J. Prado. (Ed.), *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. Avignon, France: Royal Society of Chemistry.
- Rosen, M.J., Kunjappu, J.T. 2012. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. New Jersey, USA: Wiley-interscience.
- Salager, J.L. 1988. Detergentes: componentes, fabricación y formulas. *Universidad de los Andes*. Recuperado el 19 de abril de 2016 de http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S332A_Detergentes.pdf
- Salager, J.L. 2002. Surfactantes: Tipos y usos. *Universidad de los Andes*. Recuperado el 22 de abril de 2016 de <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S300A.pdf>
- Salager, J.L., Andérez, J.M., Forgiarini, A. 1999. Influencia de la formulación sobre las espumas. *Universidad de los Andes*. Recuperado el 24 de abril de 2016 de http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S263_Espumas.pdf

- UITA. 2007. Diacetil, ingrediente tóxico vinculado a la dolencia pulmonar. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de http://www.iuf.org/cgi-bin/dbman/db.cgi?db=default&uid=default&ID=4685&view_records=1&ww=1&es=1
- Valdivia, M .2014. Espumas en alimentos. *Revista digital universitaria*. 15: 2-5.
- Wan, J.B., Lai, C.M., Li, S.P., Lee, M.Y., Kong, L.Y. Wang, Y.T. 2006. Simultaneous determination of nine saponins from *Panax notoginseng* using HPLC and pressurized liquid extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 274-279.
- Wojciechowski, K., Kezwon A., Lewandowska, J., Marcinkowski, K. 2014. Effect of β -casein on surface activity of *Quillaja* bark saponin at fluid/fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*. 34: 208-216.
- Yang, Y., Leser, M.E., Sher, A.A., McClements, D.J. 2013. Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: *Quillaja* saponin (Q-Naturale®). *Food Hydrocolloids*. 30: 589-596.
- Yang, Y., McClements, D.J. 2013. Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. *Food Hydrocolloids*. 30: 712-720.
- Yi, T., Fan L., Chen. H., Zhu, G., Suen, H., Tang. Y., Zhu. L., Chu, C., Zhao, Z., Chen, H. 2014. Comparative analysis of diosgenin in *Dioscorea* species and related medicinal plants by UPLC-DAD-MS. *BMC Biochemistry*. 15: 2-5.
- Zubair, M., Rizwan, K., Rashid, U., Saeed, R., Saeed, A.A., Rasool, N., Riaz, M. 2013. GC/MS profiling, *in vitro* antioxidant, antimicrobial and haemolytic activities of *Smilax macrophylla* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*.10: 1-9.