

ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL JUGO DE FIQUE DE LAS ESPECIES NEGRA
COMÚN (*Furcraea gigantea*) Y UÑA DE ÁGUILA (*Furcraea macrophylla*) DE LOS
MUNICIPIOS DE EL TAMBO Y GUAITARILLA (NARIÑO)

DIANA JHAZMINA BACCA ERAZO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2012

ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL JUGO DE FIQUE DE LAS ESPECIES NEGRA
COMÚN (*Furcraea gigantea*) Y UÑA DE ÁGUILA (*Furcraea macrophylla*) DE LOS
MUNICIPIOS DE EL TAMBO Y GUAITARILLA (NARIÑO)

DIANA JHAZMINA BACCA ERAZO

Trabajo de grado para optar el título de Químico

OLGA LUCÍA BENAVIDES CALVACHE. I.Q.
M.Sc Ciencias Químicas.
DIRECTORA

JESÚS ADRIANO ROMO RAMOS. L.Q.
M.Sc Ciencias Químicas.
CODIRECTOR

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2012

Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de su autor”.

Art. 1 del acuerdo No 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Superior de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

OLGA LUCÍA BENAVIDES CALVACHE.
Directora

JESÚS ADRIANO ROMO RAMOS.
Codirector

JUAN PABLO JIMÉNEZ MORA.
Jurado

JUAN PABLO TORRES MEDICIS.
Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2012.

DEDICATORIA

A Dios por llenarme de tantas bendiciones que han hecho de mi vida un camino hermoso.

A la persona que ha dado todo por mí, a quien no le ha importado las inclemencias y dificultades de la vida y ha sido siempre un ejemplo de rectitud, amor, firmeza, inteligencia y bondad, mi Madre Rosa Susana Erazo Díaz.

A mi Familia, mis abuelitas, mis primos: Cristina, Andrés, Juan Camilo, Lorena y mis tíos: Fidel, Lucía, Fanny, Sandra y Emerson, por ser quienes estuvieron pendientes de mis logros y fracasos para darme siempre la mano y fueron un apoyo incondicional desde mi infancia hasta hoy, con el calor de hogar que nunca faltó.

A mi Padre, quien a pesar de las circunstancias generó en mí la fuerza que me mantiene viva y a quien considero le heredé entre tantas cosas su carácter, el que me ha llevado más allá de lo que pensé y que me hace lo que soy.

A mis amigas, amigos, compañeros y Prince por ser la alegría, el apoyo y el aliento que siempre estuvo presente en los momentos que más lo necesitaba.

Y a todos aquellos para quienes soy importante y que me quieren “tal como soy”...

Diana

AGRADECIMIENTOS

A los directores de este trabajo de investigación: Olga Lucía Benavides Calvache, Ing. Química, M.Sc. y Jesús Adriano Romo, Lic., en Química, M.Sc, por la asesoría, espacio y el apoyo brindado durante el tiempo de ejecución de la investigación.

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Posgrados y Relaciones Internacionales de La Universidad de Nariño (VIPRI) por la financiación de este trabajo.

Al Ministerio de Agricultura por la financiación del macroproyecto “Programa valoración de subproductos de la agroindustria del fique en el Departamento de Nariño”, del cual hace parte este trabajo de investigación

Al director del “Programa valoración de subproductos de la agroindustria del fique en el Departamento de Nariño”: Andrés Hurtado Benavides Ph D.

A la Asociación de Fiqueros de Nariño de los Municipios de El Tambo y Guaitarilla por su aporte con el material de estudio.

A los profesores del Departamento de Química por haber aportado en la formación académica.

A la Facultad de Ingeniería Agroindustrial y al Grupo de Investigación de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial TEA por el apoyo brindado para el desarrollo de esta investigación.

A Dairo Portillo, Myriam Rojas, Fernando Chaves y Julián Acosta por sus valiosos aportes y contribuciones para el desarrollo de esta investigación.

A la Universidad de Nariño porque en ella culmine mis estudios universitarios.

A mis familiares, amigos y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización y culminación de este trabajo de grado.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	24
1. OBJETIVOS	26
1.1 OBJETIVO GENERAL	26
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
2. MARCO REFERENCIAL	27
2.1. MARCO CONTEXTUAL.....	27
2.1.1 Clasificación taxonómica del fique	28
2.1.2 Proceso de desfibrado del fique (beneficio).....	29
2.1.3 Composición química del jugo de fique	30
2.1.4 Potenciales usos del jugo de fique.....	31
2.2 ANTECEDENTES.....	32
2.3 ÁREA DE ESTUDIO	36
2.3.1 Municipio de El Tambo.....	36
2.3.2 Municipio de Guaitarilla.....	36
2.4 ANÁLISIS FITOQUÍMICO	37
2.4.1 Alcaloides.....	37
2.4.2 Cumarinas.....	38
2.4.3 Cardiotónicos.....	39
2.4.4 Terpenlactonas	40
2.4.5 Flavonoides.....	40
2.4.6 Naftoquinonas y Antraquinonas	41
2.4.7 Taninos.....	42
2.4.8 Esteroides y triterpenoides	43
2.4.9 Saponinas	44
2.4.9.1 Ruta biosintética de saponinas esteroidales a partir del ácido mevalónico.....	45
2.5 TÉCNICAS PARA AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS.....	48
2.5.1 Cromatografía en capa delgada.....	49
2.5.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).....	49

2.5.3 Método de calibración	50
2.5.4 Cromatografía de gases (CG)	51
2.5.5 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) ...	51
3. METODOLOGÍA	53
3.1 DETERMINACIÓN DEL SITIO DE RECOLECCIÓN.	53
3.1.1 Municipio de El Tambo	53
3.1.2 Municipio de Guaitarilla	54
3.2 RECOLECCIÓN DE LAS PENCAS Y EXTRACCIÓN DEL JUGO.....	55
3.3 ESTABILIZACIÓN QUÍMICA DEL JUGO DE FIQUE FERMENTADO Y SIN FERMENTAR.....	58
3.5 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO.	61
3.6 ANÁLISIS FITOQUÍMICO POR COLORIMETRÍA.	62
3.6.1 Análisis preliminar de alcaloides.	63
3.6.1.1 Prueba de Dragendorff.	65
3.6.1.2 Prueba de Hager	65
3.6.1.3 Prueba de Reineckato de amonio	65
3.6.1.4 Prueba de Ehrlich.....	66
3.6.2 Análisis de glicósidos cardiotónicos, cumarinas y lactonas terpénicas.	66
3.6.2.1 Análisis de cumarinas.	67
3.6.2.1.1 Prueba de la fluoresceína.....	67
3.6.2.1.2 Prueba de Ehrlich.....	67
3.6.2.2 Análisis de glicósidos cardiotónicos.....	68
3.6.2.2.1 Prueba de Baljet.....	68
3.6.2.2.2 Prueba de Kedde	68
3.6.2.2.3 Prueba de Keller-Killiani.....	68
3.6.2.2.4 Prueba de Tollens.	68
3.6.2.3 Análisis de lactonas terpénicas	68
3.6.2.3.1 Prueba del hidroxamato férrico	68
3.6.2.3.2 Prueba de Tollens	68
3.6.3 Análisis de esteroides y/o triterpenoides libres, naftoquinonas y/o antraquinonas, taninos y saponinas.	68
3.6.3.1 Análisis de flavonoides.	70
3.6.3.1.1 Prueba de Shinoda	70

3.6.3.1.2 Prueba de Rosenhein	70
3.6.3.2 Análisis de quinonas.	70
3.6.3.2.1 Prueba de dicetonas cíclicas insaturadas	70
3.6.3.2.2 Prueba de Antraquinonas.	71
3.6.3.2.3 Prueba de Rodamina.	71
3.6.3.3 Análisis de taninos.	71
3.6.3.3.1 Prueba del FeCl ₃	71
3.6.3.3.2 Prueba del acetato de plomo.....	71
3.6.3.3.3 Prueba de la gelatina-sal	71
3.6.3.4 Análisis de esteroides y/o triterpenoides.	71
3.6.3.4.1 Prueba de Fieser:.....	71
3.6.3.4.2 Prueba para leucoantocianidinas	72
3.6.3.5 Análisis de saponinas.	72
3.6.3.5.1 Prueba de Rosenthaler.	72
3.6.3.5.2 Prueba de la espuma	72
3.6.3.5.3 Prueba de hemólisis.....	72
3.6.3.5.4 Prueba de reconocimiento de saponinas triterpénicas y/o esteroidales..	72
3.7 EXTRACCIÓN DE SAPOGENINAS PARA ANÁLISIS EN CLAE Y CG-EM. ...	73
3.8 PRUEBAS DE RECONOCIMIENTO DE SAPOGENINAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (CCD).	76
3.8.1 Pruebas de reconocimiento de sapogeninas por CCD.	76
3.9 IDENTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS ESTEROIDALES (TIPO SAPOGENINA) POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	76
3.9.1 Tratamiento de las muestras para análisis por CG-EM.	77
3.10 CUANTIFICACIÓN DE SAPOGENINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE).	78
3.10.1 Método de análisis de sapogeninas por CLAE-DAD	79
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
4.1 REACCIONES COLORIMÉTRICAS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA.....	81
4.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA DE SAPOGENINAS.....	100
4.3 IDENTIFICACIÓN DE SAPOGENINAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM).....	102

4.4 CUANTIFICACIÓN DE SAPOGENINAS POR CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)	110
CONCLUSIONES	119
RECOMENDACIONES	120
APORTES A LA CIENCIA Y LA SOCIEDAD	121
BIBLIOGRAFÍA	122

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica del fique.	29
Tabla 2. Composición química del jugo de la hoja de fique.	31
Tabla 3. Características del molino extractor de jugo.	56
Tabla 4. Codificación de las muestras para la investigación.	57
Tabla 5. Condiciones de liofilización del jugo.	61
Tabla 6. Convencionalismo usado para indicar la abundancia relativa o la ausencia de metabolitos secundarios.	73
Tabla 7. Solventes utilizados en análisis de sapogeninas en CCD.	76
Tabla 8. Especificaciones del equipo de CG.	77
Tabla 9. Condiciones de acondicionamiento de la columna CLAE.	79
Tabla 10. Condiciones de análisis para la cuantificación de saponinas por CLAE.	80
Tabla 11. Concentración de los estándares para las curvas de calibración.	80
Tabla 12. Datos de la determinación de pH y apariencia física del jugo de fique fermentado y sin fermentar.	82
Tabla 13. Resultados de la Marcha Fitoquímica Cualitativa para el jugo de fique proveniente del Municipio de El Tambo.	84
Tabla 14. Resultados de la Marcha Fitoquímica Cualitativa para el jugo de fique proveniente del Municipio de Guaitarilla.	85
Tabla 15. Pruebas con variaciones colorimétricas.	100
Tabla 16. Valores de Rf Jugo Liofilizado Negra Común Tambo (JL1T).	101
Tabla 17. Valores de Rf encontrados para Sapogeninas.	101
Tabla 18. Identificación de las señales cromatográficas mayoritarias.	103
Tabla 19. Pesos del jugo de fique liofilizado de la especie Negra Común, para el análisis cuantitativo.	111

Tabla 20. Longitudes de onda de los estándares utilizados y las muestras.	111
Tabla 21. Resultados de repetibilidad para ácido oleanólico a 203 nm.	113
Tabla 22. Datos del cromatograma de la muestra JL1T a 203 nm.....	114
Tabla 23. Datos de la repetibilidad estándar para acetato de hecogenina a 235 nm.....	115
Tabla 24. Datos del cromatograma de la muestra JL1T a 235 nm.....	116
Tabla 25. Correlación entre tigogenina y hecogenina expresados como ácido oleanólico y acetato de hecogenina respectivamente.	117

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Planta de fique, especie Negra Común.....	27
Figura 2. Proceso de desfibrado del fique y generación de biosólidos (izquierda) y Obtención de la fibra (derecha).	30
Figura 3. Estructuras de algunos alcaloides.	38
Figura 4. Estructura química de la cumarina y sus derivados.	39
Figura 5. Estructura de los núcleos fundamentales de los cardenolidos y bufadieólidos.	39
Figura 6. Estructura de algunas terpenlactonas.	40
Figura 7. Estructura fundamentales a partir de las cuales derivan la mayoría de flavonoides.	41
Figura 8. Estructura básica de los flavonoides.	41
Figura 9. Estructuras de naftoquinonas y antraquinonas.	42
Figura 10. Estructuras químicas de taninos hidrolizables (izquierda) y condensados (derecha).....	43
Figura 11. Estructuras algunos esteroides y triterpenoides.	43
Figura 12. Estructura química de esteroides.	44
Figura 13. Estructuras de saponinas esteroidales y triterpénicas pentacíclicas.....	45
Figura 14. Sapogenina triterpénica (izquierda), sapogenina esteroidal (derecha).	45
Figura 15. Ejemplo de saponina esteroidal.	46
Figura 16. Origen biogenético de saponinas y sapogeninas esteroides.	47
Figura 17. Origen biogenético de sapogeninas triterpénicas.	48
Figura 18. Vereda Trojayaco, Municipio de El Tambo, Departamento de Nariño.	54
Figura 19. Vereda Villa Nueva, Municipio de Guaitarilla, Departamento de Nariño.	55
Figura 20. Molino para la extracción del jugo de la Universidad de Nariño, Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial.	56

Figura 21. Planta de fique especies Uña de Águila (izquierda) y Negra Común (derecha).	57
Figura 22. Diferencias entre las especies Uña de águila (superior) y Negra Común (Inferior).	58
Figura 23. Jugo de fique de las especies Negra Común de El Tambo y Uña de Águila de El Tambo después de 6 días de fermentación.	59
Figura 24. Jugo de fique de las especies Negra Común de Guaitarilla y Uña de Águila de Guaitarilla sin fermentar.	60
Figura 25. Residuo después de la concentración del extracto etanólico de las especies Negra Común (Izquierda) y Uña de Águila (Derecha).	62
Figura 26. Separación de las fases clorofórmicas (Inferior) y capa acuosa (superior) en la extracción de alcaloides.	65
Figura 27. Extracto III (Filtrado madre) para análisis de glicósidos cardiotónicos, cumarinas y lactonas terpénicas.	67
Figura 28. Residuo II en extracción con éter de petróleo.	70
Figura 29. Sapogeninas cristalizadas.	74
Figura 30. Equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) 7890 ^a FID/MSD 5975C.	77
Figura 31. Equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) con bomba binaria 1525 y detector DAD WATERS 2998.	77
Figura 32. Jugo de fique fresco de la especie Negra Común Tambo.	83
Figura 33. Pruebas de Reineckato, Dragendorff y Hager con patrón de cafeína.	86
Figura 34. Pruebas para alcaloides positivas de Dragendorff, Reineckato, Hager y Erlich con FB jugo fresco Negra Común El Tambo.	86
Figura 35. Prueba de fluoresceína positiva para cumarinas con SH 2G (izquierda). Prueba de Ehrlich positiva para SH 1T (derecha).	87
Figura 36. Reacción general de glicósidos cardiotónicos con el reactivo de Baljet.	88
Figura 37. Prueba positiva para Glicósidos Cardiotónicos: Prueba positiva para Baljet y Kedde. Negativa para Tollens y Keller – Killiani con SH 2G.	89

Figura 38. Prueba negativa para latonas terpénicas. En pruebas de hidroxamato férrico y Tollens.....	90
Figura 39. Prueba de Shinoda con patrón de quercetina (izquierda). Prueba positiva para flavonoides con la prueba de Rosenhein y Shinoda con SF de 2T (Derecha).	91
Figura 40. Reacción general de los flavonoides con el reactivo de Shinoda.	92
Figura 41. Reacción general de los flavonoides con el reactivo de Rosenhein.....	92
Figura 42. Prueba positiva para dicetonas cíclicas insaturadas y antraquinonas, prueba negativa para prueba de rodamina con SF 2G (izquierda) y con SF 1T (derecha).	93
Figura 43. Prueba del FeCl ₃ con ácido tánico (izquierda) y acetato de plomo con ácido tánico (derecha).	94
Figura 44. Prueba positiva para taninos: prueba del acetato de plomo (centro), FeCl ₃ (izquierda) y prueba negativa para gelatina sal con SF 1T (Derecha).	94
Figura 45. Reacción general de los taninos con acetato de plomo	95
Figura 46. Reacción general de los taninos con cloruro férrico.	95
Figura 47. Prueba de Fieser positiva para esteroides con SF de 1G y 2FG.	96
Figura 48. Resultado positivo de saponinas para la prueba de espuma ácida, básica y hemólisis con SF 1G y 2G. Tubo de referencia para hemólisis.	97
Figura 49. Prueba de reconocimiento de saponinas triterpénicas y/o esteroidales. Residuo II, especie Negra Común El Tambo.	98
Figura 50. Sapogeninas mezcla de solventes 6 (arriba), sapogeninas mezcla No 4 de solventes (abajo).	102
Figura 51. Perfil cromatográfico de sapogeninas en la muestra JL1T.	103
Figura 52. Espectro de masas de tigogenina.	104
Figura 53. Posibles fragmentaciones de masas de tigogenina.	105
Figura 54. Espectro de masas de hecogenina.	106
Figura 55. Posibles fragmentaciones de masas de hecogenina.	107
Figura 56. Fragmentación del ion molecular.	108
Figura 57. Efectos estereoelectrónicos en la fragmentación del ion molecular. ...	108

Figura 58. Mecanismo de fragmentación de las saponinas para dar la señal en m/z 139.....	109
Figura 59. Mecanismo de fragmentación de las saponinas para dar la señal en m/z 115.....	109
Figura 60. Fragmentación de un glicósido.	110
Figura 61. Repetibilidad del ácido oleanólico a 203 nm.	112
Figura 62. Cromatograma de la muestra JL1T a 203 nm cuantificada como ácido oleanólico.	113
Figura 63. Repetibilidad estándar acetato de hecogenina a 235 nm.	115
Figura 64. Cromatograma de la muestra JL1T a 235 nm cuantificada como acetato de hecogenina.....	116

LISTA DE DIAGRAMAS

	Pág.
Diagrama 1. Metodología general para el análisis fitoquímico y el fraccionamiento de la muestra.	63
Diagrama 2. Marcha fitoquímica para alcaloides.....	64
Diagrama 3. Metodología para el análisis de esteroides y/o triterpenoides, flavonoides, naftoquinonas y/o antraquinonas, taninos y saponinas.	69
Diagrama 4. Metodología para extracción y cuantificación de sapogeninas.	75

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Curva de calibración para ácido oleanólico a 203 nm.....	112
Gráfica 2. Curva de calibración para acetato de hecogenina a 235nm.	114
Gráfica 3. Concentración de hecogenina y tigogenina en la muestra.	118

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A.....	127
ANEXO B.....	131
ANEXO C	132
ANEXO D	133
ANEXO E.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Porcentaje
[M ⁺]	Ion molecular
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
1FG	Jugo fermentado especie Negra Común Municipio de Guaitarilla
1FT	Jugo fermentado especie Negra Común Municipio de El Tambo
1G	Jugo fresco especie Negra Común Municipio de Guaitarilla
1T	Jugo fresco especie Negra Común Municipio de El Tambo
2FG	Jugo fermentado especie Uña de Águila Municipio de Guaitarilla
2FT	Jugo fermentado especie Uña de Águila Municipio de El Tambo
2G	Jugo fresco especie Uña de Águila Municipio de Guaitarilla
2T	Jugo fresco especie Uña de Águila Municipio de El Tambo
ACN	Acetonitrilo
α	Alfa
Abs	Absorbancia
AU	Unidades de absorbancia
A _x	Área del estándar
A _y	Área de la muestra
BHT	Butil hidroxil tolueno
β	Beta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CGL	Cromatografía gas – líquido
CLAE - EM	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas
cm	Centímetros
c _o	Concentración nominal del analito en la muestra en mg/mL
c _v	Concentración real de un analito en mg/mL
c _x	Concentración en mg/mL del estándar
DAD	Detector de arreglo de diodos
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
E ₁	Solución E ₁
EC	Electroforesis capilar
F ₂₅₄	Fluorescente a 254 nm
FA	Filtrado A
FAB – EM	Bombardamiento rápido de átomos acoplado a espectrometría de masas
FB	Filtrado B
FC	Filtrado C

FD	Filtrado D
FE	Filtrado E
FT-IR	Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier
g	Gramos
γ	Gama
Glu	Glucosa
h	Horas
HP	Horse Power
JL1T	Jugo fresco liofilizado especie Negra Común Municipio de El Tambo
L	Litro
m	Metros
m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
m/z	Relación masa – carga
Met	Metilo
mg/mL	miligramos por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	milímetros
nm	Nanómetros
ONU	Organización de Naciones Unidas
PDA	Arreglo de Fotodiodos
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	partes por millón
R ²	Coeficiente de correlación
Rf	Relación de frente
RMN	Resonancia magnética nuclear
SF 1G	Solución F jugo fresco Negra Común Guaitarilla
SF 1T	Solución F jugo fresco Negra Común El Tambo
SF 2G	Solución F jugo fresco Uña de Águila Guaitarilla
SF	Solución F
SH 1T	Solución H jugo fresco Negra Común El Tambo
SH 2G	Solución H jugo fresco Uña de Águila Guaitarilla
SH	Solución H
SPE C ₁₈	Solid Phase Extraction
UV	Ultra violeta
wt%	Porcentaje en peso
λ	Longitud de onda
μm	micrómetros

RESUMEN

El fique (*Furcraea spp*), es originario de la región andina de Colombia, y se distribuye desde el sur del continente hasta Centro América. Las especies más cultivadas en Nariño son la Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*) y la Negra Común (*Furcraea gigantea*), siendo esta última la más cultivada.

Se realizó el análisis fitoquímico del jugo de fique fermentado y sin fermentar de las especies Negra Común y Uña de Águila de los Municipios de El Tambo y Guaitarilla (Nariño). Las pruebas realizadas indican la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, glicósidos cardiotónicos, cumarinas, quinonas y saponinas. Los resultados obtenidos evidenciaron una variabilidad en la presencia de metabolitos como quinonas, ya que éstas únicamente se encuentran presentes en el jugo de fique fresco de las especies Negra Común y Uña de Águila de los Municipio de Guaitarilla (1G y 2G) y de El Tambo (1T y 2T). No se encontraron quinonas en el jugo fermentado de las especies Negra Común y Uña de Águila de los Municipios de Guaitarilla (1FG y 2FG) y de El Tambo (1FT y 2FT). Esta variabilidad puede corresponder a las características del suelo, edad de la planta y condiciones de cultivo.

Se identificaron las sapogeninas: tigogenina y hecogenina por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) en el jugo de fique fresco liofilizado de la especie Negra Común (*Furcraea gigantea*) del Municipio de El Tambo (1JFL).

Se cuantificaron las sapogeninas por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE-DAD) en el jugo fresco de fique liofilizado de la especie Negra Común (*Furcraea gigantea*) del Municipio de El Tambo, encontrándose una proporción similar de hecogenina (62,861 ppm) respecto a tigogenina (61,862 ppm). Se escogió esta especie por ser la más cultivada en los dos Municipios y tiende a ser la predominante entre los cultivos.

ABSTRACT

The Figue (*Furcraea spp*) is native to the Andean region of Colombia and, where it was distributed to the south of the continent and Central America. In Nariño spices are grown in Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*) and Negra Común (*Furcraea gigantea*) the latter being the most cultivated.

This work was carried out phytochemical analysis of figue juice fermented and unfermented Negra Común and Uña de Águila species of the dairy municipalities El Tambo and Guaitarilla (Nariño). The tests indicate the presence of alkaloids, flavonoids, tannins, cardiac glycosides, coumarins, quinones and saponins. The results obtained showed a variability in the presence of metabolites as quinones, since these are only found present in the fresh juice Negra Común species and Uña de Águila of the Municipality of Guaitarilla (1G and 2G) and El Tambo (1T and 2T). Quinones were not found in the fermented juice of the Negra Común species (1FT and 1FG) and Uña de Águila (2FT and 2FG) of the Municipalities of Guaitarilla and El Tambo. This variability may correspond to the soil characteristics, plant age and growing conditions.

Sapogenins were identified: hecogenin and tigogenin to gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) in the freeze-dried fresh figue juice Negra Común species (*Furcraea gigantea*) of the El Tambo municipality (1JFL).

Quantification was performed by sapogeninas high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) in the freeze-dried fresh figue juice Negra Común variety (*Furcraea gigantea*) of the municipality of El Tambo, found a similar proportion of hecogenin (62.861 ppm) about tigogenin (61.862 ppm). This species was chosen as the most cultivated in the two municipalities and tends to make the predominant crops.

INTRODUCCIÓN

En Colombia existen cerca de 75 municipios productores y procesadores de fibra de fique distribuidos en su mayoría en ocho departamentos, como son Nariño, Cauca, Santander, Antioquia, Boyacá, Caldas, Quindío y Risaralda. En el departamento de Nariño alrededor de 22 municipios están dedicados al cultivo de fique, siendo los de mayor producción El Tambo, Guaitarilla, La Florida, Chachagüí, San Lorenzo, San Bernardo y Samaniego.

El sector figuero es altamente deprimido, aunque es generador de empleo, los beneficios económicos para sus integrantes son tan bajos que la mayoría viven por debajo de la línea de pobreza. Además de esto, el procesamiento de la fibra de fique ha generado graves problemas ambientales debido el vertimiento del jugo en fuentes hídricas, causando gran impacto sobre la biodiversidad y disminuyendo la calidad del agua para consumo humano y procesos agrícolas.

El lavado de la fibra de fique es una actividad que ocasiona contaminación de las aguas, dado que el bagazo y el jugo de fique contienen sustancias tóxicas como las saponinas, que al oxidarse desplazan el oxígeno disuelto en el agua, afectando la ictiofauna de las quebradas, además el jugo de fique contiene sustancias tóxicas que afectan la disponibilidad del recurso para el consumo humano y animal¹.

Varios estudios científicos realizados sobre el jugo de fique, indican que este líquido posee sustancias químicas de alto valor agregado tal como las sapogeninas (hecogenina y tigogenina), empleadas en la industria farmacéutica como precursores de medicamentos hormonales y corticoides; además de azúcares, ácidos grasos, proteínas, alcaloides, triterpenos, flavonoides y minerales. El contenido de sapogeninas en el jugo fresco es muy bajo, por este motivo la primera etapa del proceso es fermentarlo, donde el precipitado constituye las sapogeninas.

Investigadores del tema, ven en el jugo de fique un insumo de amplias aplicaciones, tales como tensoactivos, plaguicidas y productos farmacéuticos². A pesar de las investigaciones ya realizadas, en el Departamento de Nariño no se ha planteado el análisis químico cualitativo del jugo de fique fresco y fermentado, en dos de las especies más cultivadas: Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*) y

¹ MOJICA, A y PAREDES, J. Informe de Coyuntura Económica Regional. Santander.2003. p. 4.

² GÓMEZ, M y VANEGAS, E. Evaluación de la producción de esteroides a partir del jugo de fique con *Cunninghamella spp.* Trabajo de Grado (Ingeniero Químico). Medellín.: Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín Facultad de Ingeniería Química. 2001. p. 44.

Negra Común (*Furcraea gigantea*). Además, la investigación se realizó en dos zonas geográficas con diferentes características medioambientales, de fácil acceso y donde se están llevando a cabo las fases del Macroproyecto valoración de los subproductos del fique, como son los Municipios de El Tambo y Guaitarilla.

En el departamento de Nariño se producen cerca de 100.000 toneladas/año de jugo de fique desaprovechado y dispuesto inadecuadamente. Se han reportado como sustancias presentes en el jugo de fique: saponinas, flavonoides, alcaloides, esteroides y triterpenos³. Sin embargo no hay información científica relevante sobre otros tipos de metabolitos secundarios que pueden identificarse mediante un análisis fitoquímico preliminar, como son naftoquinonas y/o antraquinonas, taninos, esteroides y/o triterpenoides, cumarinas, terpenlactonas y cardiotónicos, que proporcione indicios de su presencia o ausencia en el mismo^{4,5,6,7,8,9}.

Esta investigación se desarrolló dentro del macroproyecto avalado por el Ministerio de Agricultura del Programa de Investigación: “Valoración de subproductos de la agroindustria del fique en el Departamento de Nariño”, a partir del cual se planteó el proyecto de investigación docente “Estudio fitoquímico cualitativo del jugo de dos especies de fique del Departamento de Nariño” a cargo de la Magister Olga Lucia Benavides Calvache y financiado por el Sistema de Investigaciones de la Universidad de Nariño.

³ COMPAÑÍA DE EMPAQUES S.A., CORANTIOQUIA., ALCALDÍA DE BARBOSA. y COMITÉ DE FIQUEEROS DE BARBOSA. Manual de Buenas Prácticas para el cultivo y beneficio del Fique. Medellín. 2004. p. 67.

⁴ SANABRIA, A. Análisis Fitoquímico Preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia *Compositae*. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. 1983. p. 4.

⁵ FERNÁNDEZ, L. Fitoquímica del *Agave salmiana*. Trabajo de grado. México, Puebla.: Universidad de Las Américas. Escuela de Ciencias. Departamento de Química y Biología. 2005. p. 36.

⁶ GÓMEZ, M y VANEGAS, E. Op. Cit., p. 44.

⁷ COMPAÑÍA DE EMPAQUES S.A., Op. Cit., p. 48.

⁸ SEGURA DE CORREA, R. *Et al.* Ácidos grasos presentes en el extracto heptánico del jugo de fique (*Furcraea macrophylla*) variedades Uña de águila y Negra común. MADR, Corpoica & Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Productos Naturales Vegetales. Bogotá. D.C. 2004. p. 21-24.

⁹ SEGURA DE CORREA, R. *et al.* Azúcares constituyentes del hidrolizado del jugo de fique (*Furcraea macrophylla*) variedades Uña de águila y Negra común. MADR, Corpoica & Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Productos Naturales Vegetales. Bogotá. D.C. 2004. p. 11-13.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL.

Realizar un estudio fitoquímico del jugo de fique (fermentado y sin fermentar) de las especies Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*) y Negra Común, (*Furcraea gigantea*) cultivadas en los Municipios de El Tambo y Guaitarilla del Departamento de Nariño.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Realizar ensayos preliminares de detección cualitativa mediante reacciones colorimétricas y cromatografía de capa delgada, para la determinación de metabolitos secundarios presentes en el jugo de fique fermentado y sin fermentar.
- Identificar mediante CG-EM y cuantificar mediante CLAE con estándar externo, los metabolitos secundarios mayoritarios en la familia de sapogeninas presentes en el jugo de fique.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. MARCO CONTEXTUAL.

El Fique (*Furcraea spp*), es una planta originaria de la región andina de Colombia y Venezuela, desde donde se distribuyó a la zona sur del continente y Centro América. (Ver figura 1).

Figura 1. Planta de fique, especie Negra Común.



Fuente: Esta investigación.

Pertenece al orden Liliflorae, de la familia Agavaceae, género *Furcraea*, con varias especies tales como: *F. gigantea*, *F. cabuya*, *F. macrophylla*, *F. andina*, *F. humboldtiana*, *F. cubensis*, y de cada especie pueden haber diversas variedades. Esta planta puede tener un ciclo de vida promedio entre 8 y 10 años, sin embargo este tiempo puede variar dependiendo de factores como herencia, suelo, clima y prácticas culturales. Su reproducción puede comenzar entre los 3 y 4 años de vida, dependiendo de las condiciones genéticas, del clima y del suelo¹⁰.

En Colombia se cultiva en mayor cantidad las especies Negra Común (*Furcraea gigantea*), Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*) y variedades Ceniza y Borde de Oro (*Furcraea cabuya*), debido a que geográficamente cumple con las condiciones

¹⁰ OBREGÓN, L.En: Agricultura Tropical. N 11. Noviembre, 1965. p 660.

climáticas y de suelos óptimas para su cultivo como son: alturas entre 1200 y 1900 m.s.n.m., temperaturas entre 18 y 23°C, nivel de lluvias entre 1000 y 1600 mm, buena luminosidad y suelos de pH entre 5 y 7 con textura mediana¹¹.

2.1.1 Clasificación taxonómica del fique. El fique (*Furcraea spp*), es una planta grande, de tallo erguido, su altura varía entre 2 y 7 m, densamente poblada de hojas de color verde, en forma radial, largas (1 a 3 m), angostas (10 a 20 cm), escamosas, puntiagudas, acanaladas, dentadas espinosas, en algunas variedades, presentando líneas o estrías tenues de unos 3 mm de largo; las plantas jóvenes consisten en un rosetón de hojas gruesas, escamosas de color verde azulado, a medida que la planta crece, se desarrolla en la base un tronco corto que lleva de 75 a 100 hojas cuya longitud varía de 150 a 200 cm y su anchura de 15 a 20 cm en la parte más ancha cerca de la mitad, angostándose a 10 cm cerca de la base, la cual tiene un espesor de 6 a 8 cm. Su flor es de color blanco verdoso, llamada magüey o escapo, sólo florece una vez en su ciclo de vida y luego le sobreviene la muerte (magueciada). Las semillas germinan en la misma planta y sus propágulos (bulbillos) caen ya formados al suelo por lo que se considera al fique una planta vivípara. Pueden encontrarse plantas con más de 50 años de edad, pero su periodo típico de vida varía entre 10 y 20 años. Tienen gran cantidad de raíces que se expanden y enraízan profundamente haciéndola una planta antierosiva. Su vida útil comienza entre 3 y 6 años, dependiendo de las condiciones que enfrente. (Ver tabla 1)¹².

¹¹ COMPAÑÍA DE EMPAQUES S.A., Op. Cit., p. 70.

¹² COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA, DESARROLLO TERRITORIAL Y MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Guía ambiental del sector figuero. Segunda Edición. Departamento Nacional de Planeación, Bogotá, 2005. p. 21.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del fique.

Reino	Vegetal
Phylum	Spermatophyta
Clase	Angiospermae
Subclase	Monocotyledonea
Orden	Liliflorae
Familia	Agavaceae
Género	Furcraea
Nombre común	Fique, cabuya, penca, fique, perulero, magüey, cabui, cabuya, blanca, chuchao, cocuiza.

Fuente. Compañía de empaques S.A. *et al* 2004.

2.1.2 Proceso de desfibrado del fique (beneficio). El beneficio se desarrolla en tres fases principales: primero la preparación o alistamiento, en esta fase se cortan las hojas, se destunan o desorillan y se despalkan; segundo el desfibrado de la hoja, que consiste en pasar las hojas por la desfibradora para obtener la fibra de fique; y tercero el terminado, es la fase final del beneficio, en la cual se fermenta y lava la fibra extraída, se seca, sacude y finalmente se empaca para su comercialización. Cada una de estas fases está conformada por una serie de labores que en su conjunto forman el proceso¹³.

En el desfibrado de la hoja también se generan altos impactos ambientales ya que se producen grandes volúmenes de biosólidos, los cuales generalmente se desaprovechan y se acostumbra almacenar en el mismo lugar del cultivo, lo que ocasiona emisión de olores, atracción de moscas y posible contaminación de cuerpos de agua superficiales por escorrentía o aguas subterráneas por filtración y lixiviación. (Ver figura 2)¹⁴.

¹³ COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. CASTELLANOS, O. *et al*. Agenda de prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de fique en Colombia. Bogotá D.C.: Proyecto Transición de la Agricultura. Universidad Nacional de Colombia. Grupo de investigación y desarrollo en gestión, productividad y competitividad Bio-Gestión 2009. p. 64.

¹⁴ *Ibíd.*, p. 67.

Figura 2. Proceso de desfibrado del fique y generación de biosólidos (izquierda) y Obtención de la fibra (derecha).



Fuente. Esta investigación.

2.1.3 Composición química del jugo de fique. La composición química del jugo de fique puede variar dependiendo de las características propias de la planta y el cultivo, sin embargo estudios químicos previos indican la existencia de metabolitos secundarios tales como: saponinas, flavonoides, alcaloides, esteroides y triterpenos ^{15,16,17,18,19}.

El porcentaje del jugo de fique en la hoja se calcula en un 70%, sin embargo por los métodos convencionales de prensado, no tecnificados de su extracción en las zonas figueras del país, este porcentaje puede bajar al 40%. La composición química del jugo de la hoja de fique se indica en la tabla 2²⁰.

¹⁵ FERNÁNDEZ, L. Op. Cit., p. 36.

¹⁶ GÓMEZ, M y VANEGAS, E. Op. Cit., p. 44.

¹⁷ COMPAÑÍA DE EMPAQUES S.A.; Op. Cit., p. 48.

¹⁸ SEGURA DE CORREA, R. *et al.* Ácidos grasos presentes en el extracto heptánico del jugo de fique (*Furcraea macrophylla*) variedades Uña de águila y Negra común. Op. Cit., p. 21-24.

¹⁹ SEGURA DE CORREA, R. *et al.* Azúcares constituyentes del hidrolizado del jugo de fique (*Furcraea macrophylla*) variedades Uña de águila y Negra común. Op. Cit., p. 11-13.

²⁰ ARROYAVE, P y VELÁSQUEZ, D. Aprovechamiento integral de *Furcraea macrophylla* Backer. Medellín: Universidad EAFIT. Departamento de Ingeniería de Procesos. 2000. p. 250.

Tabla 2. Composición química del jugo de la hoja de fique.

No	Composición química del Jugo de Fique
1	Clorofila
2	Carotenoides
3	Saponinas
4	Azúcares
5	Resinas
6	Flavonoides
7	Ácidos orgánicos
8	Alquitranes
9	Agua
10	Lignina
11	Calcio
12	Lipoides
13	Fósforo

Fuente: Arroyave y Velásquez, 2001.

2.1.4 Potenciales usos del jugo de fique. Debido a la composición química detectada hasta el momento del jugo de fique, se puede considerar como una potencial materia prima para la elaboración de tensoactivos, plaguicidas y fármacos²¹.

A nivel nacional la expectativa referente al aprovechamiento de los jugos provenientes del fique es significativa; los actores de la cadena reconocen el valor agregado que los productos derivados del jugo poseen y por ende el aumento de ingresos que puede resultar de su uso; de igual manera se han realizado investigaciones sobre diferentes productos de los jugos con el fin de dar respuesta a las expectativas de la cadena y abarcar nuevos mercados.

La tendencia emergente de esta área de investigación a nivel mundial se ratifica, por el número de países que año tras año han venido integrándose en la investigación sobre aprovechamiento del jugo de las agaváceas y que han aumentado el número de sus publicaciones. Para el año 2001 se registraban seis países sobresalientes por el número de publicaciones sobre el área (México, China, Japón, Estados Unidos, Reino Unido y Alemania) y el total de investigaciones no superaba las 34; no obstante, para el año 2007 existió un

²¹ GÓMEZ, M y VANEGAS, E. Op. Cit., p. 44.

significativo número de publicaciones de los países líderes incluyendo Brasil y Canadá y un aumento en la participación de otros países como Egipto, Francia, Cuba, África, Corea, Rusia, Holanda, entre otros; alcanzándose para este año un total de 63 publicaciones.

México constituye el país líder en número de publicaciones de investigación científica sobre el aprovechamiento de los jugos de las agaváceas a nivel mundial, con temas referentes a la producción de alcohol, bioplaguicidas (hongos, insectos), inulina y medios de cultivo. En Suramérica, Brasil constituye un país de referencia con investigación sobre producción de bioplaguicidas (insectos), saponina, hecogenina, saponinas esteroidales (relacionadas con hormonas), saponinas esteroidales bioactivas (relacionadas con los efectos beneficiosos o adversos en la salud humana), derivados de diferentes especies de agaváceas^{22, 23, 24}.

Al comparar las temáticas de las publicaciones científicas con la de las patentes se tiene que la obtención de saponinas y azúcar a partir del jugo de las agaváceas, así como el aprovechamiento de sus propiedades para tratar enfermedades es de importancia en el sector. Adicional a estas temáticas las patentes se enfocan a la producción de preparaciones o cosméticos para el cuidado de la piel y a la producción de productos alimenticios, temas no tan notorios en las publicaciones científicas pero definitivamente relevantes en la explotación industrial y económica de los derivados del jugo de Agaváceas.²⁵

2.2 ANTECEDENTES

Barbosa Edwin²⁶, en la Universidad Nacional de Colombia, realizó la evaluación de la calidad de jugo de fique en la obtención de hecogenina y análisis fitoquímico del extracto heptánico del jugo hidrolizado de *Furcraea macrophylla*, variedad Negra Común, en donde desarrolló un método espectrofotométrico para evaluar el contenido de hecogenina y tigogenina a partir de saponinas extraídas del jugo hidrolizado separadas por cromatografía en capa preparativa.

Preciado Dora, *et al*²⁷, en la Universidad Pontificia Bolivariana realizaron la extracción de un biofungicida a partir del jugo de fique (*Furcraea spp*), en donde

²² CASTELLANOS, O. *et al*. Op. Cit., p. 107.

²³ *Ibíd.*, p. 107.

²⁴ *Ibíd.*, p. 108.

²⁵ *Ibíd.*, p. 108.

²⁶ BARBOSA, E. Evaluación de la calidad de jugo de fique en la obtención de hecogenina y análisis fitoquímico del extracto heptánico del jugo hidrolizado de *Furcraea macrophylla*, variedad Negra Común. Bogotá, 2002. p. 7. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad Nacional. Facultad de Ciencias. Departamento de Química.

²⁷ PRECIADO, D y RANGEL, E. Extracción de un biofungicida a partir del jugo de fique (*Furcraea spp*), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Pontificia Bolivariana, 2006. p. 55-58.

desarrollaron la caracterización fisicoquímica del jugo de fique empleando métodos estandarizados para obtener el extracto orgánico y realizaron pruebas de sensibilidad mediante el método de difusión por disco en microorganismos *Fusarium solana* y *Phytophthora infestans*. Además, realizaron pruebas de sensibilidad del extracto orgánico en plantas de papa *in vitro* con aplicación foliar del extracto. A partir de esto, se obtuvieron resultados significativos en cuanto a la inhibición de crecimiento para microorganismos mediante la desactivación de la síntesis de varias enzimas a nivel de la célula fúngica.

Rojas, Miryam²⁸, en la Universidad de Nariño y en el año 2008, realizó una aproximación a la caracterización fisicoquímica del jugo de fique (*Furcraea spp*), así como la elaboración y evaluación de un biofungicida útil en el control agroecológico de la gota (*Phytophthora infestans*) en la papa. Evaluó la efectividad del biofungicida a diferentes concentraciones y comparó con el efecto de un fungicida comercial (Manzate), sin encontrar una diferencia significativa entre el biofungicida y el fungicida comercial. Sin embargo encontró que el jugo de fique se puede utilizar como biofungicida para el control de la gota de la papa por su efecto protector frente al hongo *Phytophthora infestans*, donde probablemente su efectividad biofungicida se deba a las saponinas, alcaloides y flavonoides que contiene.

Sin embargo, aún no ha sido comprobado cuál de los metabolitos ejerce el efecto biofungicida, o si está dado por la sinergia de ellos.

En la Universidad Pontificia Bolivariana en el año 2001, Gómez Mónica, *et al*²⁹, desarrollaron la evaluación de la producción de esteroides a partir de jugo de fique con *Cunninghamella spp*. En este estudio se determinó el crecimiento del microorganismo en el agar de jugo de fique mediante diferentes tiempos de incubación, y se encontró que el microorganismo es capaz de crecer en este medio, pero este medio influye en el desarrollo del hongo y no sintetiza proteínas, ácidos nucleicos entre otros, debido a la incapacidad de oxidar la nueva fuente de carbono.

Arias y Cano³⁰, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, realizaron una evaluación y determinación de la eficacia de las propiedades insecticidas del jugo de fique, a nivel de laboratorio y bajo invernadero, como controlador de cuatro plagas (*Frankliniella*

²⁸ ROJAS, M. Caracterización fisicoquímica del jugo de fique (*Furcraea spp.*), elaboración y evaluación de un biofungicida útil en el control agroecológico de la gota (*Phytophthora infestans*) en la papa. San Juan de Pasto. 2008. 35,47 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agroindustrial). Universidad de Nariño. Facultad de Ingeniería Agroindustrial.

²⁹ GÓMEZ M, VANEGAS E. Op. Cit., p. 44.

³⁰ COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO Y TERRITORIAL GUÍA AMBIENTAL DEL SECTOR FIQUERO. Cadena productiva Nacional del Fique – CADEFIQUE. Bogotá, 2006. p. 94.

occidentales, *Pergande*, *trialeurodes vaporiorum* Weswood, *Liriomyza trifolii* Burgess y *Myzus persicae* sulzer) reportadas en cultivos de flores. Así mismo, se determinó la actividad disuasiva o repelente sobre *Liriomyza trifolii* y *Trialeurodes vaporiorum*.

En la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia en Tunja- Boyacá, Camargo Sandra, *et al*³¹, realizaron la extracción e identificación de hecogenina a partir de bulbos semi-estériles de la especie *Furcraea macrophylla* cultivada en el Departamento de Boyacá, a los cuales se les extrajo el jugo y se lo dejó en proceso de autólisis, hidrólisis, purificación por recristalización y separación, obteniendo porcentajes de rendimiento de 0.08 % con 98 % de pureza, utilizando FT-IR y RMN para su identificación.

En el Grupo de Investigación en Química de Compuestos Bioactivos de la Universidad del Cauca, Campo Yuri, *et al*³², realizaron la evaluación de la actividad antioxidante del jugo de fique (*Furcraea spp*), donde encontraron que las fracciones extraídas de este jugo presentaron una baja capacidad de captura de radicales en comparación con BHT.

Gómez, H. *et al*³³, realizaron estudios *in vitro* del extracto de fique realizados para determinar la acción biocida de esta sustancia sobre las estructuras micelial y conidial de los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporoides* y *Sclerotinia sclerotiorum*, causantes de las enfermedades conocidas como “Pudrición Algodonosa del Lulo” (*Solanum quitoense*) y “Antracnosis del Tomate de Árbol” (*Solanum betaceae*), demostrando que esta sustancia inhibe el desarrollo micelial de *C. gloeosporoides* cuando la concentración del extracto de fique en medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) es superior al 5 % y afecta la germinación conidial cuando la concentración del extracto es superior a 1%. Estos resultados permiten concluir que el extracto de fique posee una acción biocida para el desarrollo de los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporoides* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

³¹ CAMARGO, S. Identificación de hecogenina del jugo de fique de la especie *Furcraea macrophylla* (Uña de águila) obtenido mediante cultivo de bulbos semi-esteriles como alternativa agroindustrial eficiente para el sector fiquero de Boyacá. En: Congreso Colombiano de Química y VI Congreso Colombiano de Cromatografía. (16: 27 de septiembre – 1 de octubre, 2010: Cartagena, Colombia).Memorias. Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia en Tunja, 2010. p. 119.

³² CAMPO, Y. Evaluación de la actividad Antioxidante del jugo de fique (*Furcraea spp*). En: Congreso Colombiano de Química y VI Congreso Colombiano de Cromatografía (16: 27 de septiembre – 1 de octubre, 2010: Cartagena, Colombia).Memorias. Grupo de Investigación en Química de Compuestos Bioactivos de la Universidad del Cauca. p. 114.

³³ GÓMEZ, J. Evaluación del extracto de fique en el desarrollo in-vitro de *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz) Penz & Sacc. y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.Corpioca. Popayán: 2001. p. 94.

Gnoatto, S. *et al*³⁴, realizaron la extracción y cuantificación de saponinas de la especie yerba mate (*Ilex paraguariensis*) por CLAE, cuantificadas como ácido ursólico, encontrando que el método es adaptable para la determinación de saponinas de otras plantas.

Hernández, S. *et al*³⁵, en la Universidad de Guadalajara en México, realizaron la extracción y cuantificación indirecta de las saponinas del Agave *Lechuguilla Torrey* mediante la aplicación de un método experimental factorial, evaluando el efecto de los solventes utilizados para determinar indirectamente el contenido de saponinas como factor de respuesta, para la cuantificación se utilizó el método Hiai variando el tipo de ácido y los tiempos de reacción para obtener la hidrólisis de la molécula, encontrando un alto índice de correlación de azúcares y la cantidad de saponinas presentes.

Ramírez, M. *et al*³⁶, en el Grupo de Investigación de Biotecnología de la Universidad Pontificia Bolivariana realizaron la caracterización del jugo y bagazo de fique, encontrando metales pesados, mientras que en la marcha fitoquímica se encontraron aminoácidos, flavonoides, esteroides, taninos, leucoantocianidinas, compuestos fenólicos y triterpenos.

Oleszet W.³⁷, realizó un estudio para establecer las ventajas y desventajas de la utilización de varias técnicas cromatográficas, tales como Cromatografía en capa delgada (CCD), Cromatografía gas-líquido (CGL), Cromatografía de alta resolución (CLAE), Electroforesis Capilar (EC), en el análisis de saponinas presentes en plantas. Según los estudios realizados, la CCD ofrece una excelente información cualitativa a cerca de la presencia de saponinas en extractos de plantas. Las saponinas pueden ser analizadas colorimétricamente y luego mediante CCD para confirmar su presencia en la muestra. La mayor desventaja de este método es que otros componentes pueden reaccionar con los reactivos empleados dando como resultado colores similares. Por otra parte son pocas las aplicaciones de la Cromatografía Gaseosa (CG) para el análisis de saponinas intactas. El paso determinante en esta clase de análisis es la hidrólisis, por tal razón, se debe optimizar, de manera precisa, las condiciones de hidrólisis de

³⁴ GNOATTO S, SCHENKEL P, BASSANI V. HPLC Method to Assay Total Saponins in *Ilex paraguariensis* Aqueous Extract. Universidade Federal do Rio Grande do Sul programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, J. Braz. Chem. Soc., Vol. 16, No. 4, 723-726, Brasil, 2005. p. 4.

³⁵ HERNÁNDEZ, R. LUGO, E. DÍAZ, L. VILLANUEVA, S. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de Agave Lechuguilla Torrey. Universidad de Guadalajara. Revista digital, científica y tecnológica e-Gnosis. (versión online): 1665-5745 www. e-gnosis.udg.mx, México. 2005.13 p. 2005, e- Gnosos (online), Vol, 3, Art. 11.

³⁶ RAMÍREZ, M., et al. Aprovechamiento integral del Fique: Usos alternativos y su potencial. Compañía de Empaques. Universidad Pontificia Bolivariana, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, USAID, Programa MIDAS, ISAGEN, 2010.

³⁷ OLESZEK, W. Chromatographic determination of plant saponins. El sevier. Journal of Chromatography. Polonia. 2002.

saponinas estructuralmente diferentes; además se hace necesaria la derivatización de las saponinas puesto que son poco volátiles.

La técnica de CLAE es la más empleada y la mejor para la determinación de saponinas; sin embargo la carencia de cromóforos limita la elección del gradiente y el método de detección³⁸.

2.3 ÁREA DE ESTUDIO

Teniendo en cuenta que esta investigación se desarrolló dentro del macroproyecto avalado por el Ministerio de Agricultura del Programa de Investigación: “Valoración de subproductos de la agroindustria del fique en el Departamento de Nariño”, las zonas donde se está llevando a cabo son los Municipios de El Tambo y Guaitarilla, por lo tanto, se escogieron estas dos zonas geográficas para la recolección de las muestras.

2.3.1 Municipio de El Tambo. Limita por el norte con el Peñol, por el este con Chachagüi y La Florida, por el sur con La Florida y Sandoná y por el Oeste con Linares y Los Andes Sotomayor³⁹.

Como en toda la región suroccidental colombiana, la base de la economía del Municipio de El Tambo es la producción agrícola, caracterizada por realizarse en pequeñas parcelas familiares o minifundios, con tecnología tradicional y una escasa capacitación y asistencia técnica que genera bajos niveles de producción e ingresos, con los cuales medianamente pueden suplir sus necesidades, dejándoles sin la posibilidad de reinvertir o diversificar su producción, además el difícil acceso al crédito por la excesiva tramitología ha sido un gran limitante para el desarrollo del sector⁴⁰.

2.3.2 Municipio de Guaitarilla. El Municipio de Guaitarilla limita al norte con el Municipio de Ancuya, al este con los Municipios de Consacá y Yacuanquer; al sur con el Municipio de Imués y al oeste, con los Municipios de Túquerres y Providencia. Este Municipio, basa su economía en la agricultura y la ganadería principalmente y se encuentra marginado por el olvido económico y social por parte del gobierno, ya que en gran medida podría aprovechar sus recursos para un mejor sostenimiento de la población⁴¹.

³⁸ OLESZEK, W. Op. Cit. p. 147–162.

³⁹ Municipio de El Tambo. [Citado en octubre 8 de 2010] Disponible en internet: <http://www.eltambo-narino.gov.co/nuestromunicipio.shtml?apc=mlxx-1-&m=f>

⁴⁰ CORPONARIÑO Esquema de ordenamiento territorial departamento de Nariño Municipio de El Tambo. Documento Técnico II Fundación Nariño 2000. p. 15-22.

⁴¹ Municipio de Guaitarilla. [citado en octubre 8 de 2010] Disponible en Internet: <http://www.guaitarilla.gov.co/>

Por lo anterior, por la cercanía a la ciudad de Pasto y porque en estos municipios hay centros de beneficio para obtener la fibra de fique, así como asociaciones organizadas de cultivadores de fique, se decidió realizar el estudio fitoquímico del jugo de fique proveniente de estos dos Municipios del Departamento de Nariño.

2.4 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

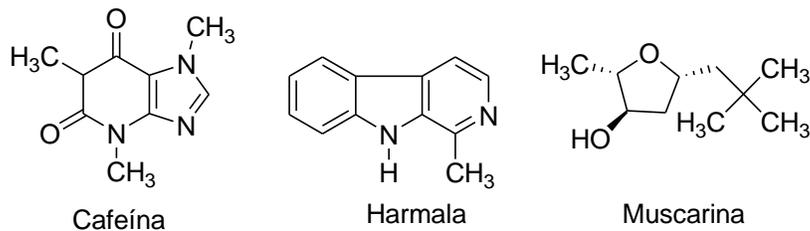
La presencia o ausencia de compuestos bioactivos que hacen parte de las plantas puede detectarse a través del estudio fitoquímico preliminar, en el cual se investigan de manera cualitativa los principales grupos de metabolitos secundarios que pueden estar asociados con acciones biológicas, como son: alcaloides, flavonoides, naftoquinonas y/o antraquinonas, taninos, saponinas, esteroides y/o triterpenoides, cumarinas, terpenlactonas y cardiotónicos⁴², con la ventaja que este tipo de estudio constituye una etapa previa al fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios mediante el uso de reactivos y solventes en baja cantidad y cuyas pruebas a desarrollar pueden arrojar resultados rápidos por detección colorimétrica e incluso pueden dar un indicio de la cantidad presente del metabolito. Además sus resultados pueden ser respaldados por análisis cromatográficos de capa delgada (CCD), con la ventaja que la información bibliográfica puede dar una posible identificación de los compuestos.

2.4.1 Alcaloides. Forman el grupo más grande y heterogéneo de los metabolitos secundarios que las plantas producen, siendo alrededor de 5000. No existe una definición exacta para los alcaloides, pero se puede considerar como “un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades biológicas importantes a bajas dosis y que responden a reacciones comunes de precipitación. (Ver figura 3)⁴³.

⁴² SANABRIA, A. Op .Cit., p.4.

⁴³ ARANGO, G, Alcaloides y compuestos nitrogenados. Facultad de química farmacéutica. Universidad de AntioquiaMedellín.2008. p. 3.

Figura 3. Estructuras de algunos alcaloides⁴⁴.



Fuente. ARANGO, G, Alcaloides y compuestos nitrogenados. 2008.

2.4.2 Cumarinas. Con el nombre de cumarinas se conoce a un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales y tienen en común una estructura química de *2H*-1-benzopirán-2-ona, denominada cumarina.

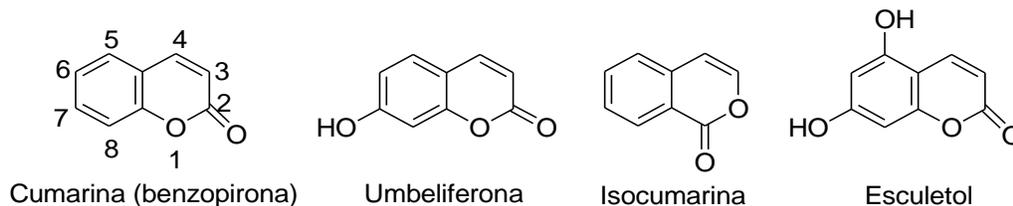
Prácticamente todas las cumarinas, a excepción de la cumarina propiamente dicha, poseen un sustituyente hidroxílico en posición 7, ya sea libre, como sucede en la umbeliferona, o combinado (metilo, azúcares, etc.). Las cumarinas sencillas pueden poseer además hidroxilos adicionales también libres o combinados. Ejemplo de ellas son el esculetol del castaño de Indias con dos hidroxilos libres sobre los carbonos C₅ y C₇ o el escopoletol presente en algunas Solanáceas (belladona) que posee un hidroximetilo en C₅ y un hidroxilo libre en C₇.

Son sustancias fluorescentes bastante fotosensibles y pueden hallarse en cualquier órgano de la planta raíces, frutos y flores. Como grupo, su interés farmacológico no es muy grande, sin embargo debemos mencionar sus efectos sobre el sistema vascular tanto en territorio arterial como venoso y su utilidad en el tratamiento de algunas alteraciones de la piel como por ejemplo la psoriasis debido a sus propiedades fotosensibilizantes⁴⁵. (Ver figura 4).

⁴⁴ ARANGO, G, Alcaloides y compuestos nitrogenados. Facultad de química farmacéutica. Universidad de AntioquiaMedellín.2008. p. 61.

⁴⁵ MURILLO, E. MÉNDEZ, J. Guía metodológica para detección rápida de algunos núcleos secundarios. Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima, Ibagué, 2007. p. 20.

Figura 4. Estructura química de la cumarina y sus derivados⁴⁶.

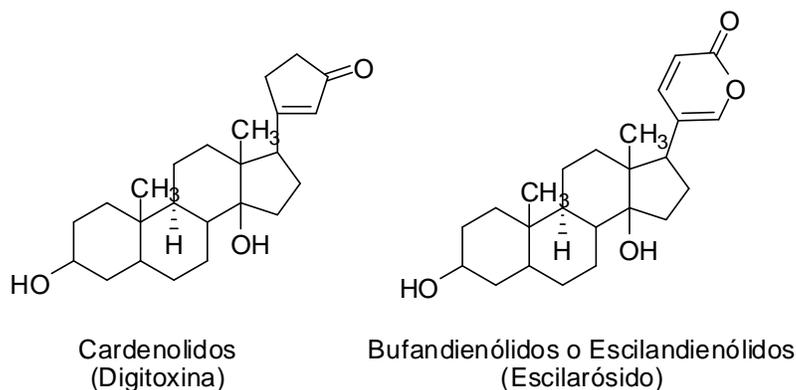


Fuente. VALENCIA, C. Fundamentos de fitoquímica. 1995.

2.4.3 Cardiotónicos. Son los más efectivos y útiles en el tratamiento de las enfermedades del corazón. Estas sustancias se encuentran naturalmente y se clasifican en dos grupos, cardenólidos y bufadienólidos (ver figura 5). Los cardenólidos son el grupo predominante en la naturaleza, son esteroides C₂₃ con un anillo de γ -lactona $\alpha:\beta$ no saturada (butenólido), mientras que los bufadienólidos son esteroides C₂₄ con una lactona de seis miembros doblemente no saturada (α -pirona o hexadienólido)⁴⁷.

Este grupo de compuestos son derivados del núcleo esteroideo general o núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno al cual pertenece el colesterol, los ácidos biliares, hormonas sexuales, vitamina D y hormonas coricoadrenales⁴⁸.

Figura 5. Estructura de los núcleos fundamentales de los cardenolidos y bufadienólidos⁴⁹.



Fuente. SANABRIA, A. Análisis Fitoquímico Preliminar. 1983.

⁴⁶ VALENCIA, C. Fundamentos de fitoquímica. Editorial trillas. México. 1995 p. 115,118.

⁴⁷ *Ibíd.*, p. 87, 88.

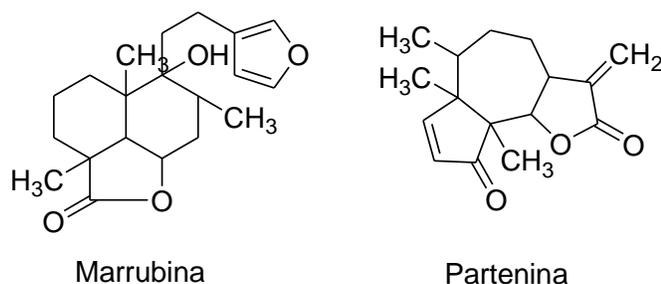
⁴⁸ MURILLO, E. *Op. Cit.*, p. 18.

⁴⁹ SANABRIA, A. *Op. Cit.*, p. 48.

2.4.4 Terpenlactonas. Las lactonas sesquiterpénicas poseen un esqueleto carbonado de 15 átomos, que teóricamente deriva de la unión de tres fragmentos de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), cabeza-cola, y algunos productos de transposición; parte del esqueleto es un anillo metilbutenólido. (Ver figura 6).

Son sustancias amargas, incoloras, relativamente estables, de farmacología poco estudiadas, pero provenientes de plantas usualmente reportadas como medicinales, por lo que es probable que sean los agentes medicinales^{50,51}.

Figura 6. Estructura de algunas terpenlactonas⁵².



Fuente. SANABRIA, A. Análisis Fitoquímico Preliminar. 1983.

2.4.5 Flavonoides. Se denominan como flavonoides a varias clases de sustancias naturales que contienen dos anillos aromáticos unidos mediante una cadena de tres átomos de carbono (compuestos C₆C₃C₆), como se indica en la figura 7 y se encuentran ampliamente distribuidas en los vegetales y que son biosintetizadas a partir del ácido shikímico y de la acetil-coenzima A vía malonil-CoA⁵³.

Son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en la naturaleza tanto libres como o-glicósidos o c-glicósidos, éstos últimos son los responsables de muchas coloraciones de las flores, frutos y hojas, además pueden presentar actividad biológica de importancia.

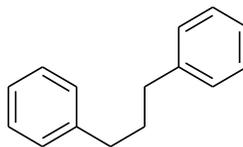
⁵⁰ MURILLO, E. Op. Cit., p.17.

⁵¹ BILBAO, M. Análisis Fitoquímico Preliminar. Química de Productos Naturales. Universidad del Quindío. Facultad de Ciencias Básicas y Tecnológicas. Programa de Química de Productos Vegetales. Armenia, 1997. p. 78.

⁵² SANABRIA, A. Op. Cit., p. 57.

⁵³ KURT B. G. Torssell, Natural Product Chemistry, second Edition, Sweden: Apotekarsocieten. 1997. p. 217.

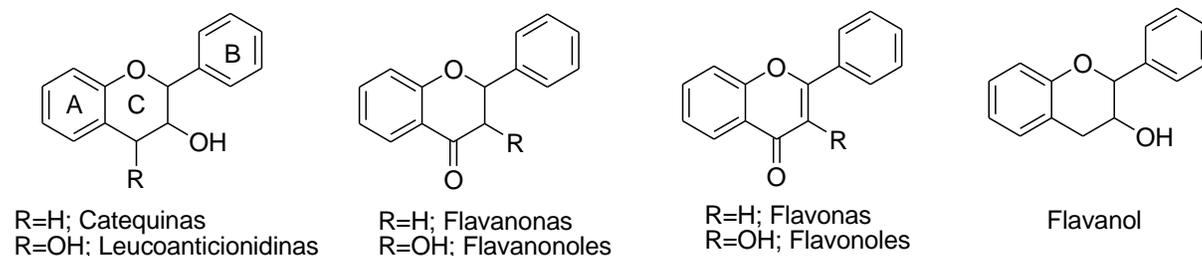
Figura 7. Estructura fundamentales a partir de las cuales derivan la mayoría de flavonoides⁵⁴.



Fuente. MARTÍNEZ, S. *Et al*, Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. 2002

Los flavonoides (ver figura 8), son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto; de donde, el anillo A proviene de la ruta de la maloni-ICoA y el anillo B proviene de la ruta del ácido shikímico. Un tricétido se cicla y se condensa con una molécula de ácido *p*-cumárico. La enolización del ciclo proveniente de la ruta de la malonil-CoA da origen al anillo aromático A en las chalconas y flavanonas⁵⁵.

Figura 8. Estructura básica de los flavonoides⁵⁶.



Fuente. MARTÍNEZ A. Flavonoides. 2005.

2.4.6 Naftoquinonas y Antraquinonas. Las quinonas son pigmentos que se encuentran en las plantas ya sea en forma libre o combinadas con azúcares formando glicósidos. Su color natural varía desde amarillo hasta presentar colores oscuros. Sus dicetonas insaturadas que por reducción se transforman en polifenoles, de los que por oxidación pueden regenerarse fácilmente a quinonas. Son sustancias reactivas, con capacidad para funcionar como sistemas redox, por lo que son sustancias naturales muy activas biológicamente. Todas son coloreadas y presentan el mismo cromóforo básico que es la benzoquinona, que consiste en dos grupos carbonilo conjugados con dos dobles enlaces carbono-carbono. (Ver figura 9)⁵⁷.

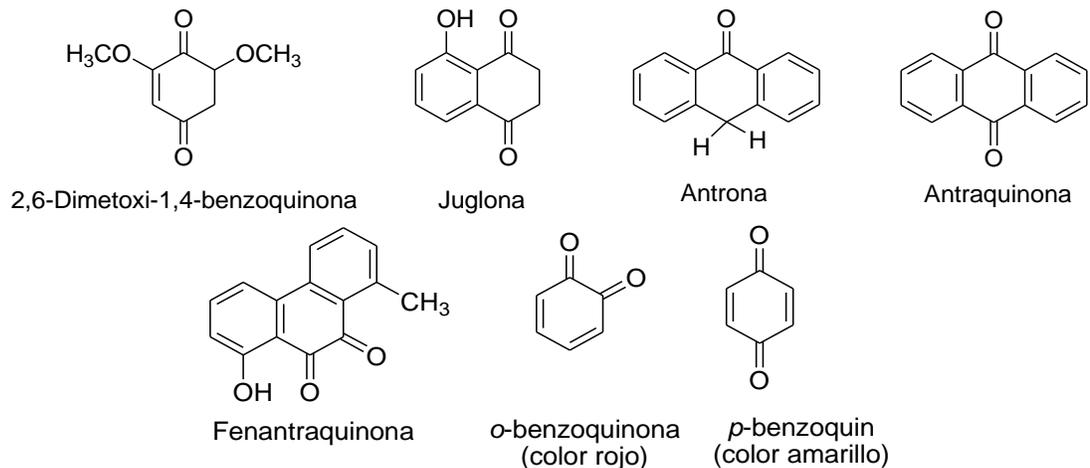
⁵⁴ MARTÍNEZ, S. *Et al*, Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, Universidad de León y Hospital de León, departamento de Fisiología. 17 (6), España. 2002. 17 (6). p. 271-278.

⁵⁵ DEWICK, P, Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach, second edition, John Wiley & Sons Inc, 2002. p. 149.

⁵⁶ MARTÍNEZ A. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín 2005. p. 8.

⁵⁷ VALENCIA, C. Op. Cit., p. 103.

Figura 9. Estructuras de naftoquinonas y antraquinonas⁵⁸.



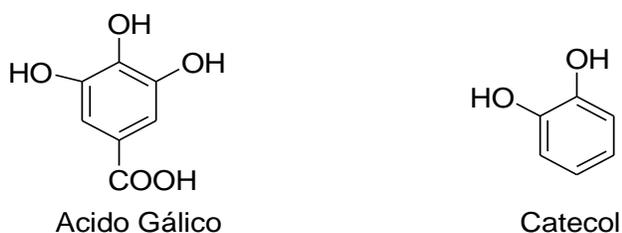
Fuente. VALENCIA, C. Fundamentos de fitoquímica. 1995.

2.4.7 Taninos. Son un grupo de constituyentes fenólicos (ver figura 10) de las plantas, poseen sabor astringente y la propiedad de convertir la piel en cuero. Se dividen en taninos condensados los cuales se hidrolizan y producen fenoles polihídricos simples como ácido gálico, y los taninos hidrolizables son ésteres donde el componente alcohólico es generalmente azúcar y que pueden reaccionar con ácido clorhídrico y a altas temperaturas se hidrolizan. Están ampliamente distribuidos en las plantas en partes específicas como hojas, corteza, frutos o tallos. Son sustancias químicas no cristalizables que forman soluciones coloidales con el agua, tienen reacción ácida. Estudios sugieren que los taninos tienen propiedades antisépticas se cree que previenen a las plantas de daños por insectos y hongos⁵⁹.

⁵⁸ VALENCIA, C. Op. Cit., p. 104, 108, 110.

⁵⁹ *Ibíd.*, p. 123, 125.

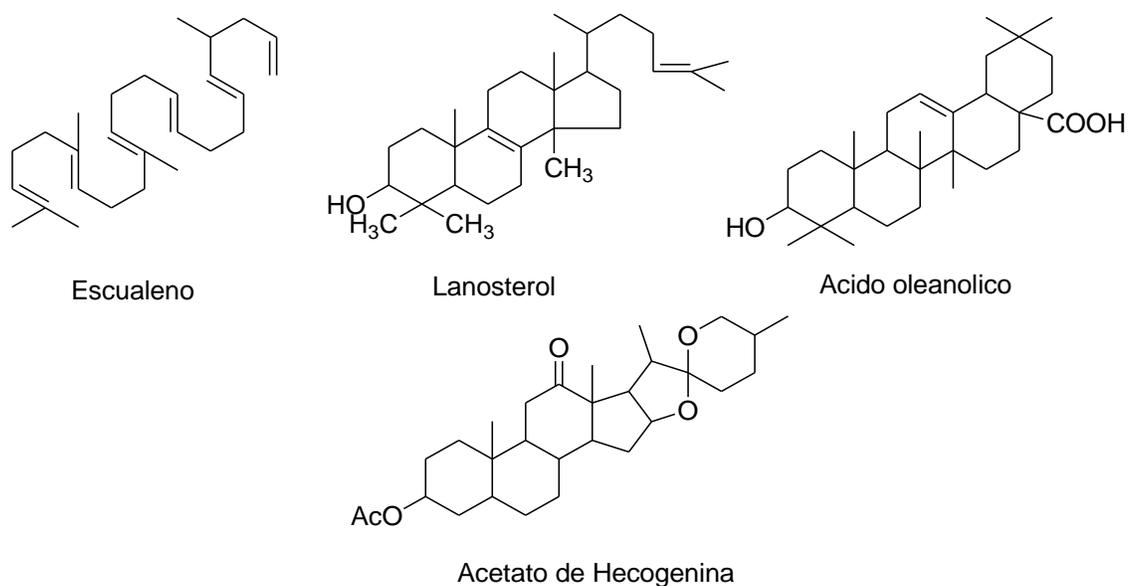
Figura 10. Estructuras químicas de taninos hidrolizables (izquierda) y condensados (derecha)⁶⁰.



Fuente. VALENCIA, C. Fundamentos de fitoquímica. 1995.

2.4.8 Esteroides y triterpenoides. Los triterpenos se encuentran distribuidos tanto en el reino vegetal como animal, en resinas y en la materia insaponificable de muchos aceites como el de oliva. Los triterpenos son compuestos cuyo esqueleto de carbono corresponde a seis unidades de isopreno y biosintéticamente derivan del escualeno. Pueden ser acíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos. El único triterpeno relevante es el escualeno, el cual es considerado como intermediario en la biosíntesis de los esteroides. (Ver figura 11)⁶¹.

Figura 11. Estructuras algunos esteroides y triterpenoides⁶².



Fuente. VALENCIA, C. Fundamentos de fitoquímica. 1995.

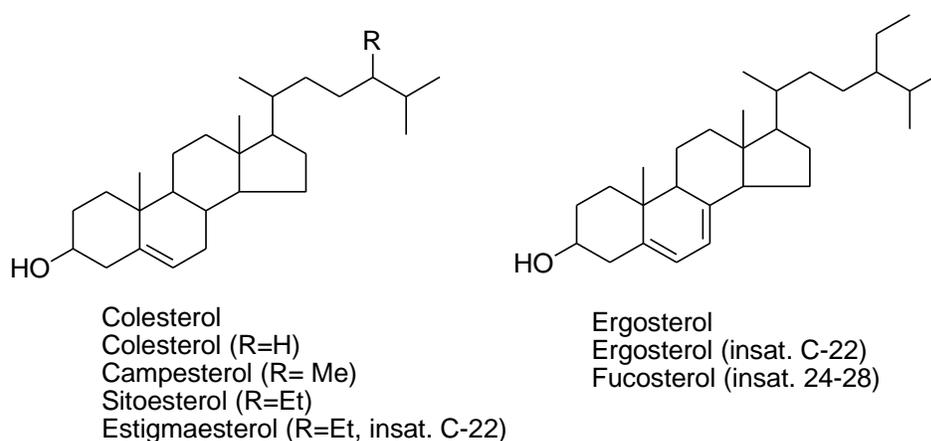
⁶⁰ VALENCIA, C. Op. Cit., p.123, 125.

⁶¹ *Ibíd.*, p. 194.

⁶² *Ibíd.*, p. 210.

Los esteroides son alcoholes secundarios policíclicos con estructura de ciclopentanofenantreno. El núcleo esteroidal es el mismo que presenta el lanosterol y otro tipo de terpenos tetracíclicos, pero solamente hay dos grupos metilo unidos a los anillos en las posiciones 10 y 13. La cadena lateral de ocho carbonos que presenta el lanosterol, también está en muchos esteroides, en especial los de origen animal, aunque muchos de los esteroides de las plantas tienen uno o dos átomos de carbono adicionales. El nombre de esteroles se aplica específicamente a los alcoholes esteroidales pero como casi todos los esteroides de las plantas son alcoholes con el grupo hidroxilo en posición 3, se les llama comúnmente esteroides⁶³. (Ver figura 12).

Figura 12. Estructura química de esteroides⁶⁴.



Fuente. MARTÍNEZ, A. Esteroides.2002.

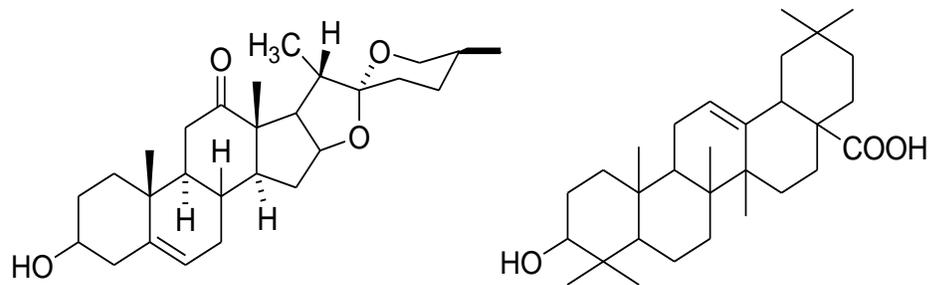
2.4.9 Saponinas. Las saponinas son un grupo de glicósidos solubles en agua, que tienen la propiedad de hemolizar la sangre y disminuir la tensión superficial del agua, formando espuma abundante. Las saponinas por hidrólisis se desdoblán en carbohidratos y una aglicona llamada sapogenina y son glicósidos que derivan fundamentalmente de dos núcleos. La sapogenina puede tener el sistema anular esteroidal o el de un triterpenopentacíclico. El enlace glicosídico siempre se forma con el oxígeno del carbono 3 (ver figura 13 y 14). En la mayoría de casos, tanto las sapogeninas esteroidales como las triterpénicas se unen a uno o varios azúcares por hidroxilos en el carbono 3 generando las diferentes saponinas⁶⁵.

⁶³ VALENCIA, C. Op. Cit., p.195, 198.

⁶⁴ MARTÍNEZ, A. Esteroides. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, 2002. p. 4.

⁶⁵ MARTÍNEZ A. *Et al*, Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica Universidad de Antioquia facultad de química farmacéutica departamento de farmacia. Medellín, 2008. p.7.

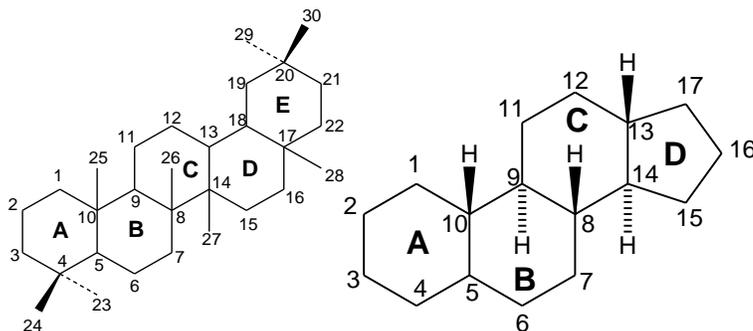
Figura 13. Estructuras de saponinas esteroidales y triterpénicas pentacíclicas⁶⁶.



Sapogenina esteroidal (diosgenina) Sapogenina triterpénica (hederagenina)

Fuente. VALENCIA, C. Fundamentos de fitoquímica. 1995.

Figura 14. Sapogenina triterpénica (izquierda), sapogenina esteroidal (derecha)⁶⁷.



Fuente. DEWICK, P, Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach. 2002.

2.4.9.1 Ruta biosintética de saponinas esteroidales a partir del ácido mevalónico. La porción esteroide de las saponinas esteroides (también denominada sapogenina o aglicona esteroide) se origina por la ruta de la acetil-coenzima A vía ácido mevalónico y escualeno. La Figura 16 resume esquemáticamente el proceso. Una vez formado un precursor esteroide con 27 átomos de carbono (p.ej. colesterol), este es deshidrogenado para originar 3-colestanona. La colestano es hidroxilada en los carbonos 16, 22 y 27. Este intermedio altamente hidroxilado en la cadena lateral puede sufrir una deshidratación entre los hidroxilos 16 y 22, lo que origina 3-furostanona; o puede sufrir además otra deshidratación entre los hidroxilos 22 y 27 restantes, lo que da lugar al anillo espirostanano propiamente dicho. La 3-espirostanona puede ser reducida a 3-espirostanol, el cual puede sufrir procesos enzimáticos de glicosilación para originar las saponinas esteroides⁶⁸.

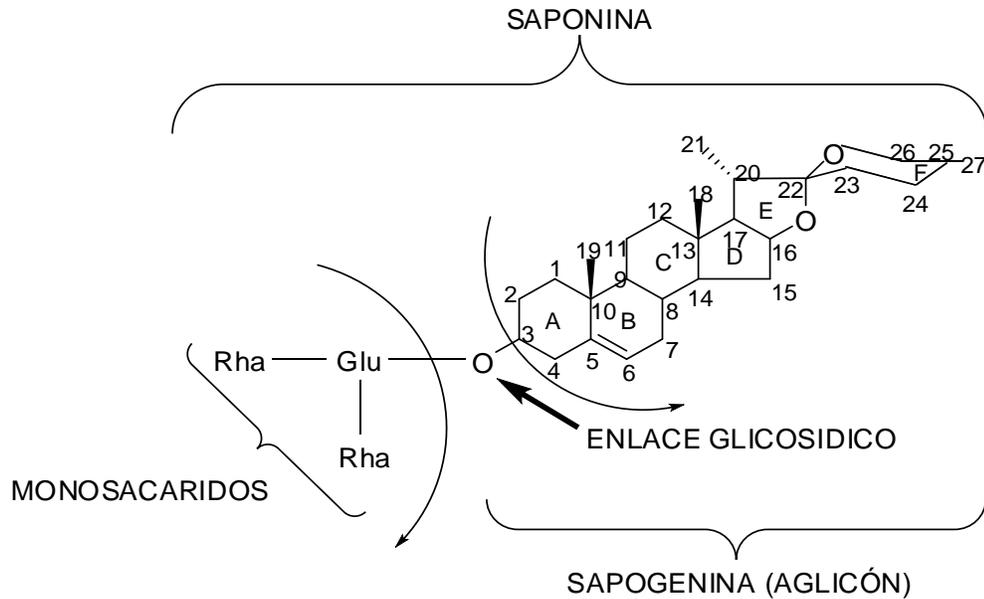
⁶⁶ VALENCIA C. Op. Cit., p. 216, 217.

⁶⁷ DEWICK, P. Op. Cit., p.221.

⁶⁸ MARTÍNEZ, A. Saponinas Esteroides. Universidad de Antioquia, Facultad de Química, Medellín 2001. p. 4.

Las saponinas son glicósidos (ver figura 15) en los cuales varias unidades de monosacáridos se enlazan mediante un enlace glicosídico a un resto denominado sapogenina (aglicón). Este último puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidal y en función de esto las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales respectivamente⁶⁹. (Ver figura 14).

Figura 15. Ejemplo de saponina esteroidal⁷⁰.



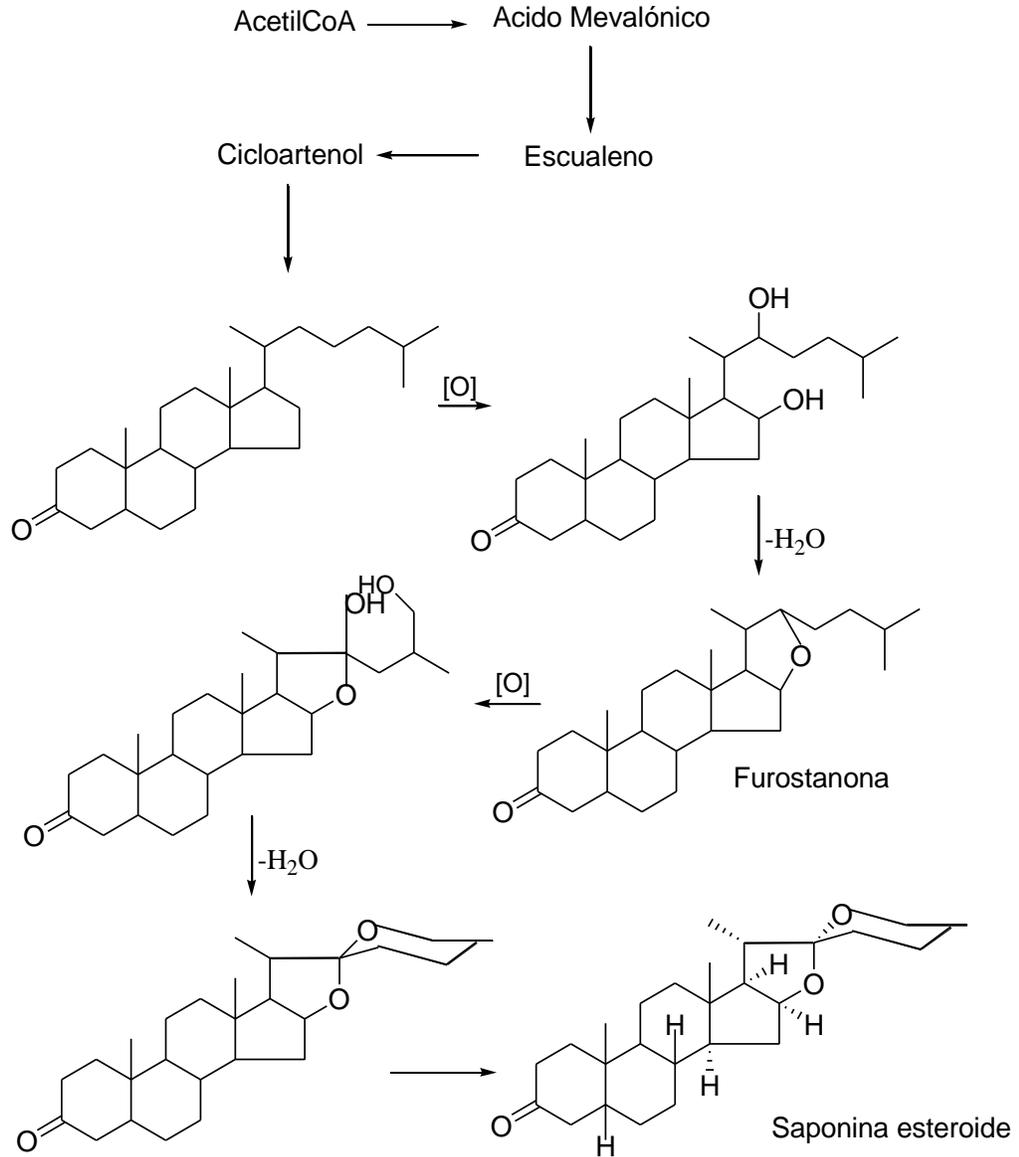
Fuente. ORESTES, J. Las saponinas y sapogeninas esteroidales. 1984.

⁶⁹ ORESTES, J. Las saponinas y sapogeninas esteroidales. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba, Santa Clara, 1984. p. 2.

⁷⁰ *Ibíd.*, p. 2.

En la figura 16 se muestra la ruta biosintética de las saponinas esteroidales.

Figura 16. Origen biogénico de saponinas y saponinas esteroides⁷¹.

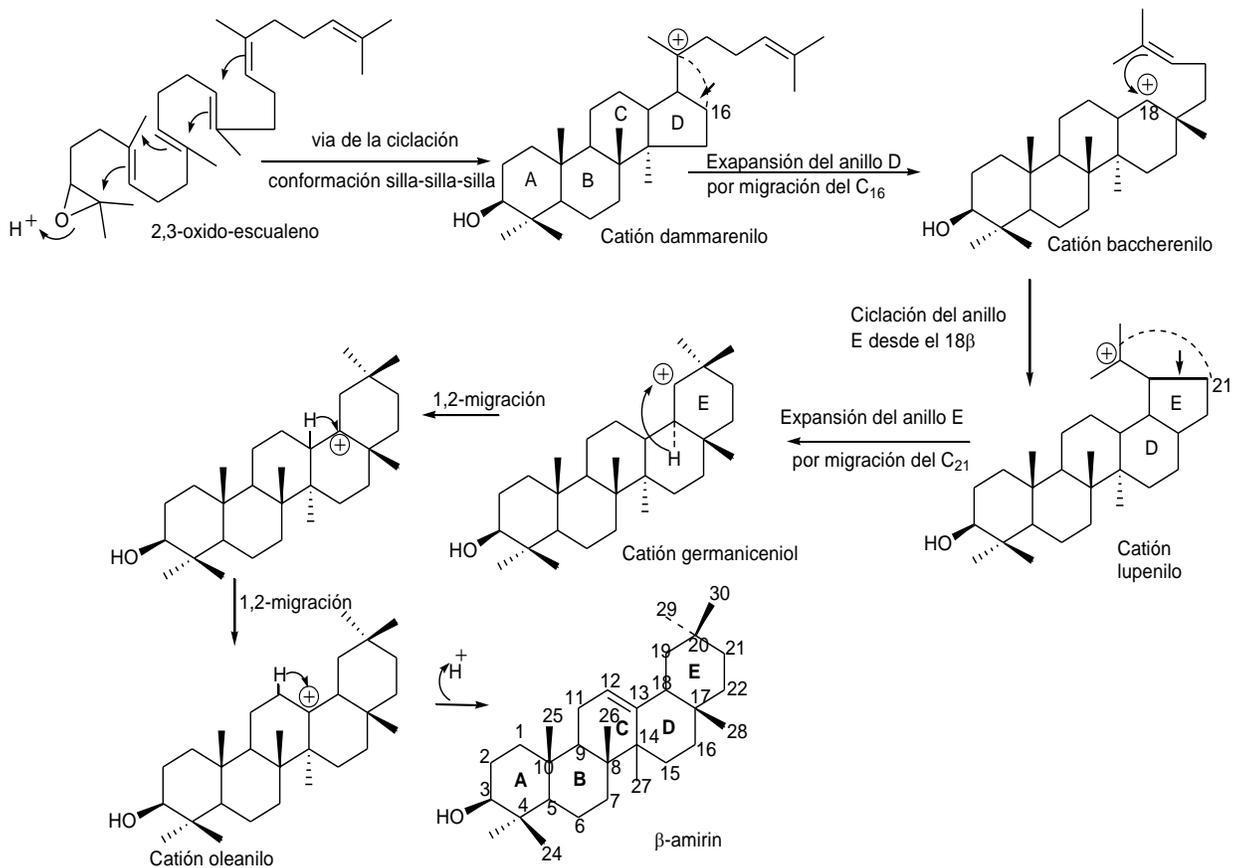


Fuente. Martínez, A. Saponinas esteroides. 2001.

En la figura 17 se muestra la ruta biosintética de las saponinas triterpénicas.

⁷¹ MARTÍNEZ, A. Saponinas esteroides. Op. Cit., p. 4.

Figura 17. Origen biogénico de sapogeninas triterpénicas⁷².



Fuente. TAVA, A. *et, al.* Biosynthesis of saponins in the genus *Medicago*. 2010.

2.5 TÉCNICAS PARA AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS.

Cuando se desea separar un componente que se encuentra en una mezcla tan compleja de sustancias, se necesita acudir a técnicas de separación para lograr su posterior análisis. Hay que tener en cuenta la naturaleza de las sustancias a extraer y se pueden utilizar diferentes técnicas de extracción para cada familia de interés, logrando su reconocimiento por medio de técnicas de coloración como CCD (cromatografía de capa delgada), por la técnica analítica para separar y detectar compuestos químicos, CLAE (cromatografía líquida de alta eficiencia), y la CG-EM (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).

La cromatografía es un método muy utilizado y que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas

⁷² TAVA, A., SCOTTI, C., AVATO, P. Biosynthesis of saponins in the genus *Medicago*. *Phytochem Rev* DOI. 10.1007/s 11101-010-9169-x. 2010. p. 3

complejas. Ningún otro método de separación es tan efectivo y de aplicación tan general como la cromatografía.

Todos los métodos de cromatografía tienen en común el uso de una fase estacionaria y una fase móvil. Los componentes de una mezcla son transportados a través de la fase estacionaria por el flujo de una fase móvil y las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración entre los distintos componentes. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido⁷³.

Todos los sólidos finamente pulverizados tienen el poder de adsorber en mayor o menor grado otras sustancias sobre su superficie; y, similarmente, todas las sustancias pueden ser adsorbidas, unas con más facilidad que otras. Este fenómeno de adsorción selectiva es el principio fundamental de la cromatografía⁷⁴.

2.5.1 Cromatografía en capa delgada. Esta técnica, es un procedimiento rápido y sencillo para separar mezclas de sustancias, para identificar/caracterizar o para determinar semicuantitativamente componentes individuales. La separación se basa en que las sustancias contenidas en la muestra a analizar o analito se reparten de modo diferencial entre las fases. En la CCD la fase móvil se desplaza por una fina capa de fase estacionaria, transportando así los componentes individuales de una mezcla dependiendo de la solubilidad y de su comportamiento frente a la adsorción. El recorrido particular de cada sustancia (Rf) se emplea para su identificación. Las separaciones por CCD se realizan introduciendo el borde inferior de la placa cromatográfica en el solvente y por capilaridad se desplaza sobre la superficie de la placa⁷⁵.

- Relación de frente (Rf). La constante Rf es una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente y se define como:

La distancia recorrida por el compuesto, la cual se mide generalmente desde el origen al centro de la mancha. Para que los Rf sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones (espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de la muestra). El máximo valor de Rf que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un Rf entre 0.65 y 0.7⁷⁶.

2.5.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Esta técnica analítica de separación es ampliamente utilizada, ya que presenta las ventajas de tener una

⁷³ SKOOG, D. *et al.* Fundamentos de Química Analítica. 8ª Edición. Editorial Thomson 2005. p. 93.

⁷⁴ CLEMENT, B. Organic Chemistry Laboratory Manual. Texas A&M University, USA, 2002. p. 143-146.

⁷⁵ HAMILTON, R. HAMILTON, S. Thin Layer Chromatography. New York: Wiley, 1987.p. 61.

⁷⁶ SKOOG D. Op. Cit., p. 687.

alta sensibilidad, fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicación a sustancias que son de primordial interés en las industrias y en muchos campos de la ciencia.

Los límites de detección por masa más bajos se obtienen con los detectores de espectrometría de masa y arreglos de diodos (DAD). Estos tienen las ventajas de tener un amplio rango de respuesta, es decir, un amplio rango de concentración, una excelente sensibilidad, permitiendo determinar compuestos en el orden de los nanogramos (ng). No destruye la muestra y puede emplearse en sistemas de gradientes. Además presenta una buena estabilidad y reproducibilidad, una alta respuesta para todos los solutos⁷⁷.

Los detectores de arreglos de diodos pueden elegir varios modos operacionales. Por ejemplo, se puede obtener el cromatograma completo a una sola longitud de onda o alternativamente, cuando los picos que eluyen están suficientemente separados, se puede elegir diferentes longitudes de onda para cada pico. Estos detectores espectrofotométricos de ultravioleta (PAD) son los más eficientes, ya que permiten recoger los datos de un espectro completo en aproximadamente un segundo. De esta forma los datos espectrales para cada pico cromatográfico se pueden recoger y almacenar a medida que salen de la columna. Además, las formas de presentación de los datos resulta útil para la identificación de los compuestos y para elegir las condiciones de la determinación cuantitativa, consisten en un gráfico tridimensional que permite obtener los espectros en intervalos de 5 segundos⁷⁸.

2.5.3 Método de calibración. La determinación de la relación entre el detector y la concentración de la muestra es designada por el método de calibración. Hay dos tipos de métodos para el análisis cuantitativo en una muestra: los métodos de estándar interno y de estándar externo.

El estándar externo es, sin lugar a dudas, el método de cuantificación más utilizado en CLAE. Consiste en la preparación de estándares de concentración semejante al analito en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambas, muestra y estándar, en las mismas condiciones operativas. La concentración del analito en la mezcla se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia. Es decir:

$$(Ecuación 1) \quad P = \frac{A_m C_s}{A_s} D100$$

⁷⁷ QUINTELA, O. *et al.* Metodología LC–MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. Instituto de Medicina Legal de Santiago de Compostela. Servicio de Toxicología Forense. 2004. p. 67

⁷⁸ *Ibíd.*, p. 67.

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra A_m y A_S son las áreas de la muestra y el estándar respectivamente, C_S es la concentración del estándar y D es un factor de dilución.

Este método requiere, obviamente, la utilización de un estándar de referencia y su exactitud dependerá ampliamente de la calidad de estándar utilizado. La precisión de los datos que se obtienen depende tanto de la preparación de la muestra y el estándar como de la inyección de ambos, ya que utilizando esta modalidad de trabajo, ninguna de las dos operaciones se compensa. De hecho, la precisión de esta metodología es muy sensible a los errores de inyección. Por ello, para mejorarla se suelen realizar varias inyecciones, típicamente 3 inyecciones de estándar y dos inyecciones de cada muestra. Además, para evitar la falta de precisión originada en las variaciones ambientales se pueden correr alternativamente muestra y estándar o intercalar estándares después de un grupo de unas 5 o 6 muestras.

La concentración de analito en la muestra puede obtenerse matemáticamente utilizando la ecuación 1, o bien gráficamente utilizando la curva de calibración. En el primer caso para obtener resultados cuantitativos válidos es necesario que el método sea lineal y proporcional⁷⁹.

2.5.4 Cromatografía de gases (CG). La cromatografía de gases es una de las técnicas más utilizadas en análisis cualitativos y cuantitativos. En la cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia de su reparto entre una fase móvil gaseosa y otra fase estacionaria líquida o sólida mantenida en una columna, al realizar una separación cromatográfica de gases, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se logra mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de muchos otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, sino que su única función es transportar el analito a lo largo de la columna⁸⁰.

2.5.5 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Uno de los detectores más eficientes en cromatografía de gases es el espectrómetro de masas. La combinación de estas dos técnicas se conoce como cromatografía de gases/masas (CG-EM). En este caso, la muestra está vaporizada y entra al espectrómetro de masas donde se ioniza generalmente por bombardeo de electrones (originando cationes) y se separan de acuerdo a su masa. El proceso de ionización suministra suficiente energía para que las molécula se rompan en diferentes fragmentos, por lo que el espectro de masas es

⁷⁹ QUATTROCCHI, O. ANDRIZZI, S. LABA, R. Introducción a la HPLC. Capítulo 10 Análisis Cuantitativo. Laboratorios Dr Gador, Buenos Aires, Argentina 1992. p. 262 -263.

⁸⁰ SKOOG, D. Op. Cit., p. 959.

un gráfico que muestra la abundancia relativa de cada fragmento que choca con el detector de un espectrómetro de masas⁸¹.

⁸¹ HARRIS, D. Análisis Químico Cuantitativo, Segunda Edición. Editorial Reverté S.A. 2001. p. 678.

3. METODOLOGÍA

3.1 DETERMINACIÓN DEL SITIO DE RECOLECCIÓN.

3.1.1 Municipio de El Tambo. La recolección de las muestras se realizó en la vereda de Trojayaco, Municipio de El Tambo, Departamento de Nariño el cual está localizado a 01° 24' 47" de latitud norte y a los 77° 23' 53" de longitud este, a una altura sobre el nivel del mar de 2.250 m, con una humedad relativa del 60% y una precipitación media anual de 1.199 mm. Se encuentra localizado a 37 kilómetros al noroccidente de la capital del Departamento. Su temperatura es de 18 grados centígrados. Está ubicado en su mayoría sobre territorio montañoso, destacándose como accidentes orográficos La Cuchilla de El Tambo y el Cerro de La Espada. Los pisos se distribuyen en térmicos cálidos, medios y fríos.

La vereda Trojayaco se ubica como punto de partida el morro El Copete en la división de aguas a 2700 m.s.n.m. tomando el camino que conduce al sector urbano del Municipio, continua por este camino hasta alcanzar la quebrada Llano Largo sobre la cabecera municipal, hasta la desembocadura de la quebrada Minas; asciende por esta quebrada hasta alcanzar el camino que conduce a la carretera intermunicipal que lleva a Linares, continua por ésta hacia el sur hasta encontrar la vía interveredal que conduce al Tambillo, continua por ésta hasta alcanzar el camino de la loma el Guarango, el cual continua hasta encontrar el punto de partida. (Ver figura 18)⁸².

⁸² CORPONARIÑO. Esquema de ordenamiento territorial departamento de Nariño, Municipio de El Tambo. Op. Cit., p. 15-22.

Figura 18. Vereda Trojayaco, Municipio de El Tambo, Departamento de Nariño.



Fuente. Esta investigación.

3.1.2 Municipio de Guaitarilla. La recolección de muestras se realizó en el Municipio de Guaitarilla, Departamento de Nariño, el cual dista 74 kilómetros al sur occidente de la capital San Juan de Pasto y limita por el norte con Samaniego, Ancuya y Consacá, por el sur con Imués y Providencia, por el oriente con Consacá y Yacuanquer y por el occidente con Túquerres y Providencia. Su altura sobre el nivel del mar es de 2.650 metros, la temperatura media es de 14 °C, el área municipal es de 131 kilómetros cuadrados y una precipitación media anual de 1.140 milímetros. Está a 1°08'0" de latitud norte 77°33'23" de longitud este. (Ver figura 19).

De su relieve forma parte del Nudo de Los Pastos, por lo que una parte es montañosa y cuenta con grandes extensiones planas. Sus tierras presentan pisos térmicos templados, fríos y páramos; lo baña el Río Guáitara y varias corrientes menores como las quebradas Guaramuez, Bazal, Chorillo, Ahumada, Guacal y San Benito⁸³.

⁸³ CORPONARIÑO, Esquema de ordenamiento territorial departamento de Nariño Municipio de Guaitarilla, documento técnico II fundación Nariño 2000.

Figura 19. Vereda Villa Nueva, Municipio de Guaitarilla, Departamento de Nariño.



Fuente. Esta investigación.

3.2 RECOLECCIÓN DE LAS PENCAS Y EXTRACCIÓN DEL JUGO.

Las pencas de fique de las especies Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*) y Negra Común (*Furcraea gigantea*), se recolectaron en los Municipios de El Tambo, en la Vereda de Trojayaco a 2700 m.s.n.m. y en la Vereda Villa Nueva de Guaitarilla, durante los meses de Octubre del año 2008 y Junio de 2009. En cada Municipio se recolectaron pencas de las dos especies. Luego, las pencas se llevaron a las instalaciones de la Universidad de Nariño en el Municipio de San Juan de Pasto, a la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial. En la Planta Piloto se procedió a la extracción del jugo en el molino que se adquirió para este propósito (ver figura 20 y tabla 3). Se recolectó el jugo de las pencas en un balde colocado en la parte inferior de la máquina y luego se empacó en bolsas Ziploc® herméticamente cerradas y esterilizadas. Se realizó el mismo procedimiento para cada una de las especies de fique, teniendo en cuenta que se lavó muy bien el molino entre cada extracción para evitar la mezcla del jugo y se conservaron en cadena de frío hasta su utilización.

Se seleccionaron cultivos donde la edad promedio de las plantas era de 4-15 años, el tamaño promedio de las pencas de Negra Común era de 1-1,20 m, las de Uña de Águila entre 1.5-2,0 m, revisando en lo posible que no contengan plagas. Las horas de recolección estaban sujetas a la hora del corte realizado por los campesinos al amanecer y en horas de la mañana.

Tabla 3. Características del molino extractor de jugo.

Modelo	Molino exprimidor de pencas
Potencia	3 HP (Horse Power)
Rodillos	2
Transmisión	Piñones
Motor	Eléctrico
Marca	Zutta Hermanos

Fuente. Esta investigación.

Figura 20. Molino para la extracción del jugo de la Universidad de Nariño, Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial.



Fuente. Esta investigación.

Cada una de las muestras se identificó con el nombre de la especie, el sitio de recolección (Municipio y ubicación geográfica), número de muestra, fecha de recolección y fecha de extracción del jugo. La codificación según la zona geográfica, la especie y el estado de fermentación se realizó según la tabla 4.

Tabla 4. Codificación de las muestras para la investigación.

Guaitarilla			El Tambo		
Negra Fresco	Común	1G	Negra Fresco	Común	1T
Negra Fermentado	Común	1FG	Negra Fermentado	Común	1FT
Uña de Águila Fresco		2G	Uña de Águila Fresco		2T
Uña de Águila Fermentado		2FG	Uña de Águila Fermentado		2FT

Fuente. Esta investigación.

En la figura 21 se observan las características morfológicas generales que a simple vista presentan las dos especies.

Figura 21. Planta de fique especies Uña de Águila (izquierda) y Negra Común (derecha).



Fuente. Esta investigación.

Para diferenciar las especies se puede observar que las espigas de la Uña de Águila son rojas y en su base coloración amarillo, pronunciadas y se bifurcan, mientras que las espigas de la especie Negra Común son mucho más pequeñas, de color café oscuro y van en un solo sentido. (Ver figura 22).

Figura 22. Diferencias entre las especies Uña de águila (superior) y Negra Común (Inferior).



Fuente. Esta investigación.

3.3 ESTABILIZACIÓN QUÍMICA DEL JUGO DE FIQUE FERMENTADO Y SIN FERMENTAR.

Para realizar el análisis fitoquímico de detección cualitativa del jugo de fique para las dos especies provenientes de El Tambo y Guaitarilla se realizó el siguiente procedimiento: se midieron muestras de 250 mL de jugo de fique previamente descongelado, correspondientes a las dos especies (Uña de águila y Negra común), provenientes de las zonas geográficas de El Tambo y Guaitarilla. Para obtener la muestra de jugo fermentada de cada especie y de cada zona geográfica, se dejó a temperatura ambiente la muestra correspondiente (en un recipiente cerrado, no hermético y esterilizado) por un periodo de 6 días, para que sufra un proceso fermentativo natural. Al final se obtuvieron ocho muestras: Jugo de fique fresco Negra Común de El Tambo (1T), jugo de fique fermentado Negra Común de El Tambo (1FT), jugo de fique fresco Uña de Águila de El Tambo (2T), jugo de fique fermentado Uña de Águila de El Tambo (2FT), jugo de fique fresco Negra Común de Guaitarilla (1G), jugo de fique fermentado Negra Común de Guaitarilla (1FG), jugo de fique fresco Uña de Águila de Guaitarilla (2G), jugo de fique fermentado Uña de Águila de Guaitarilla (2FG).

Antes de realizar el análisis fitoquímico, se realizó un proceso de estabilización química del jugo de fique para cada una de las muestras tanto para el fermentado como para el jugo no fermentado, realizando un proceso de pasteurización lenta

en el cual se colocó el jugo en un recipiente a baño maría a 65 °C por 30 min y luego se lo pasó a frío en baño de hielo, con el fin de interrumpir el proceso de fermentación (ver figuras 23 y 24)⁸⁴.

Después de realizada la estabilización, las muestras de jugo de fique fermentado y no fermentado se sometieron a análisis fitoquímicos de detección por reacciones de coloración.

Figura 23. Jugo de fique de las especies Negra Común de El Tambo y Uña de Águila de El Tambo después de 6 días de fermentación.



Fuente. Esta investigación.

⁸⁴ ROJAS, M. Op. Cit., p. 23,35.

Figura 24. Jugo de fique de las especies Negra Común de Guaitarilla y Uña de Águila de Guaitarilla sin fermentar.



Fuente. Esta investigación.

3.4 CONDICIONES DE LIOFILIZACIÓN DEL JUGO SIN FERMENTAR DE LA ESPECIE NEGRA COMÚN DEL MUNICIPIO DE EL TAMBO.

Se realizó la extracción de sapogeninas a partir de las muestras de jugo de fique de la especie Negra Común del Municipio de El Tambo. Se escogió esta especie, debido a que es la más cultivada en los Municipios de El Tambo y Guaitarilla. Además, las sapogeninas son metabolitos secundarios con importante actividad biológica y aplicabilidad industrial. Sin embargo fue necesario liofilizar el jugo, ya que de esta manera se garantizó una mejor estabilidad de los metabolitos para el análisis por CLAE y CG-EM.

Las condiciones de del equipo se muestran en la tabla 5.

Se liofilizaron dos litros de jugo fresco de la especie Negra Común del Municipio de El Tambo (JL1T) en las instalaciones de la Universidad de la Sabana.

Tabla 5. Condiciones de liofilización del jugo.

Equipo	Labconco de bandejas. Capacidad 2L
Presión de trabajo	Menor a 0,8 mm Hg
Temperatura de muestra	Menor a -18°C
Temperatura de las bandejas escalonadas	-35°C – 20°C
Tiempo	48 horas

Fuente. Universidad de la Sabana.

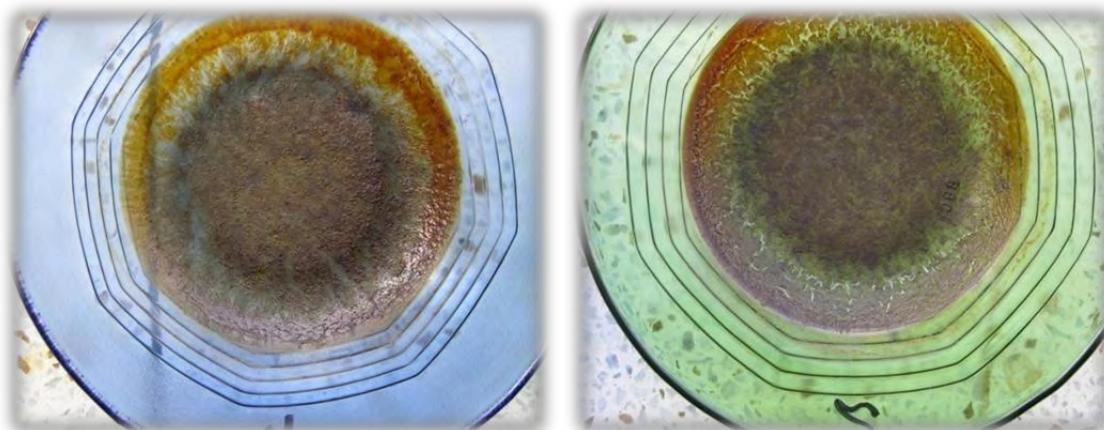
3.5 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO.

Se midieron 250 mL de jugo (fermentado y sin fermentar de cada especie y zona geográfica), el cual se extrajo por maceración química a temperatura ambiente empleando 200 mL de alcohol etílico al 95 %. Se colocó el alcohol en cada recipiente con la muestra y se dejó por un periodo de 30 h. Luego se maceró en un mortero utilizando arena pulverizada y desinfectada. Posteriormente, se filtró sobre lienzo para eliminar partículas de gran tamaño y luego a través de papel filtro cualitativo donde posteriormente se lavó con 50 mL de etanol. Finalmente, el filtrado se evaporó a 36 °C hasta obtener la consistencia adecuada durante 30 h. De este filtrado sin evaporar se dejó 30 mL para realizar el análisis de lactonas triterpénicas, cumarinas y glicósidos cardiotónicos, el cual se denominó (Extracto III)⁸⁵. Al final se obtuvo aproximadamente 4,6 g de cada residuo concentrado. (Ver figura 25).

Este procedimiento se realizó para cada una de las muestras (1T, 1FT, 2T, 2FT, 1G, 1FG, 2G, 2FG).

⁸⁵ BILBAO, M. Op. Cit., p.19.

Figura 25. Residuo después de la concentración del extracto etanólico de las especies Negra Común (Izquierda) y Uña de Águila (Derecha).



Fuente. Esta investigación.

3.6 ANÁLISIS FITOQUÍMICO POR COLORIMETRÍA.

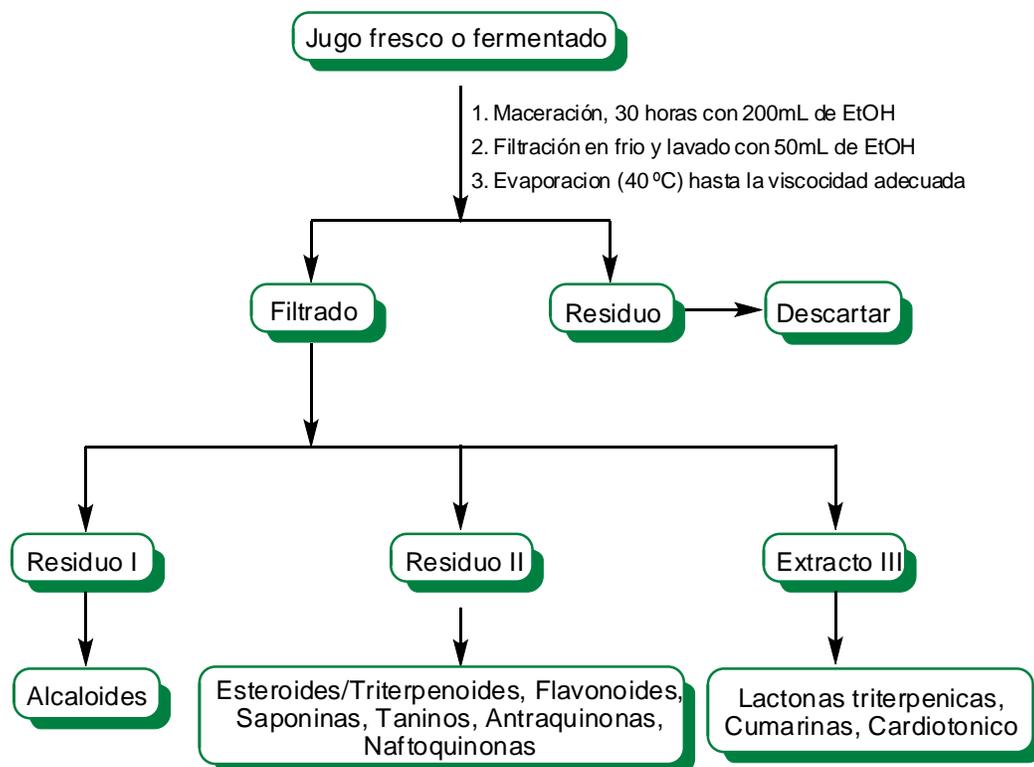
Las pruebas de reconocimiento de metabolitos secundarios mediante reacciones de coloración, se realizaron en el jugo fermentado y sin fermentar de las dos especies de fique provenientes de El Tambo y Guaitarilla. Se registró cualquier cambio de coloración o cambio de tonalidad por las características propias de la composición química del jugo. Igualmente, se tabuló la información recolectada para el análisis de resultados⁸⁶.

Se obtuvieron las fracciones de acuerdo a la metodología reportada (ver diagrama 1), con las cuales se realizaron las diferentes pruebas de reconocimiento para taninos, flavonoides, quinonas, glicósidos cardiotónicos, esteroides, saponinas, cumarinas y alcaloides⁸⁷.

⁸⁶ SANABRIA, A. Op. Cit., p. 88.

⁸⁷ *Ibíd.*, p. 88.

Diagrama 1. Metodología general para el análisis fitoquímico y el fraccionamiento de la muestra⁸⁸.



Fuente. SANABRIA, A. Análisis Fitoquímico Preliminar. 1983.

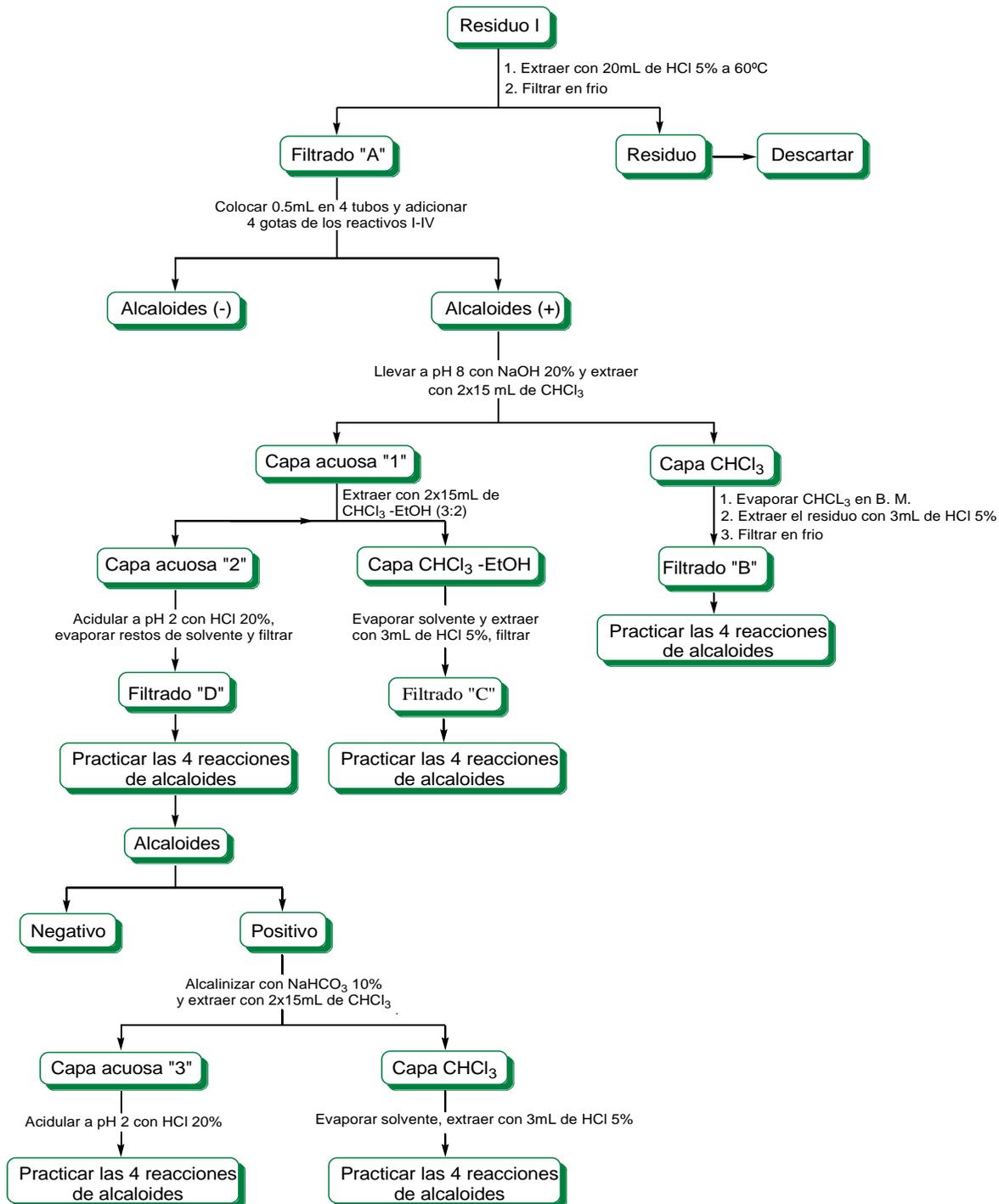
El filtrado se dividió en tres fracciones: para analizar alcaloides (Residuo I), para analizar esteroides, flavonoides, saponinas, taninos y quinonas (Residuo II) y para cumarinas, lactonas y glicósidos cardiotónicos (Extracto II)⁸⁹.

3.6.1 Análisis preliminar de alcaloides. Para el análisis de los alcaloides se siguió la metodología del diagrama 2. (Ver figura 26).

⁸⁸ SANABRIA, A. Op. Cit., p. 64.

⁸⁹ *Ibíd.*, p. 88.

Diagrama 2. Marcha fitoquímica para alcaloides⁹⁰.



Fuente. SANABRIA, A. Análisis Fitoquímico Preliminar. 1983.

⁹⁰ SANABRIA, A. Op. Cit., p. 66.

Como patrón para el análisis de alcaloides se utilizó cafeína.

Figura 26. Separación de las fases clorofórmicas (Inferior) y capa acuosa (superior) en la extracción de alcaloides.



Fuente. Esta investigación.

Al residuo I se le agregaron 20 mL de HCl al 5 % y se calentó a 60 °C extrayendo totalmente la masa formada, se dejó enfriar y se filtró. El filtrado obtenido se denominó filtrado A (FA).

3.6.1.1 Prueba de Dragendorff. Se tomaron 0.5 mL del FA en un tubo de ensayo y se agregaron 0.5 mL del reactivo de Dragendorff⁹¹. La aparición de una coloración marrón oscura indica prueba positiva.

3.6.1.2 Prueba de Hager⁹². Se tomaron 0.5 mL del FA en un tubo de ensayo y se agregaron 0.5 mL del reactivo de Hager⁹³. Al aparecer un precipitado amarillo se considera prueba positiva.

3.6.1.3 Prueba de Reineckato de amonio. Se tomaron 0.5 mL del FA en un tubo de ensayo y se agregaron 0.5 mL del reactivo de Reineckato de amonio⁹⁴. Al

⁹¹ BILBAO, M. Op. Cit., p. 95.

⁹² LÓPEZ, E. Estudio Fitoquímico y aproximación genética en especies de la sección Plinthine del género arenaria (*Caryophyllaceae*). Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Departamento de Botánica, Granada, 2007. p. 70.

⁹³ BILBAO, M. Op. Cit., p. 91.

⁹⁴ DOMÍNGUEZ, X. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México. 1973. p. 218.

aparecer una coloración oscura y un precipitado color rosa oscuro se considera la prueba positiva.

3.6.1.4 Prueba de Ehrlich⁹⁵. Se tomaron 0.5 mL del filtrado A en un tubo de ensayo y se agregaron 0.5 mL del reactivo de Ehrlich. Al aparecer una coloración rojo salmón se considera la prueba positiva.

El FA se alcalinizó hasta pH 8 con NaOH al 20 % y se extrajo con 15 mL de cloroformo (CHCl₃), dejando separar la fase orgánica de la inorgánica por un periodo de 24 h para lograr una buena separación. Este procedimiento se realizó por duplicado. Se unieron las fases orgánicas y evaporó hasta sequedad a 48 °C. El residuo se extrajo con 3 mL de HCl al 5% y se filtró, obteniendo el filtrado B (FB), al cual se le realizaron las pruebas de detección de alcaloides, siguiendo el mismo procedimiento del apartado 3.6.1.1 hasta el 3.6.1.4.

Ya que hay alcaloides que no son solubles en cloroformo, la capa acuosa I (CA1) se extrajo con dos porciones de 15 mL de una mezcla CHCl₃-EtOH (3:2) respectivamente. Dejando separar la fase orgánica de la inorgánica por un periodo de 24 h para lograr una buena separación. Se separó la capa acuosa II (CA2) y se unieron las fases orgánicas, esta última se evaporó hasta sequedad y se extrajo con 3 mL de HCl 5 %, se filtró y se obtuvo en Filtrado C (FC), al cual se le realizaron las pruebas de detección de alcaloides, siguiendo el mismo procedimiento del apartado 3.6.1.1 hasta el 3.6.1.4.

La capa acuosa II tiene alcaloides fenólicos, alcaloides de amonio cuaternario y óxidos de aminas. Por lo tanto, se necesita que este en medio ácido, para lo cual se acidificó hasta pH 2 con HCl al 20 % y se evaporaron los restos de solvente en estufa a 40 °C, se dejó enfriar, se filtró y se obtuvo el Filtrado D (FD), al cual se le realizaron las pruebas de detección de alcaloides, siguiendo el mismo procedimiento del apartado 3.6.1.1 hasta el 3.6.1.4.

3.6.2 Análisis de glicósidos cardiotónicos, cumarinas y lactonas terpénicas.

Los 30 mL del Extracto III se colocaron con 30 mL de solución de acetato de plomo al 4% que contenía 0.5% de ácido acético (ver figura 27). Se dejó en reposo durante 15 min hasta la formación del precipitado y se filtró. El filtrado obtenido se concentró a $\frac{3}{4}$ partes del volumen original en una mufla a 40 °C⁹⁶.

Se dejó enfriar y se extrajo con 30 mL de CHCl₃ por duplicado. Se combinaron las capas clorofórmicas y se adicionaron 0.5 g de sulfato de sodio anhidro. Se filtró, y el filtrado se concentró hasta un volumen de 3 mL en la mufla a 40 °C

⁹⁵ MARTÍNEZ, A. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Op. cit., p. 66.

⁹⁶ SANABRIA, A. Op. Cit., p. 78.

denominando este filtrado como Solución H (SH), el cual se utilizó para realizar las pruebas de glicósidos cardiotónicos⁹⁷.

Figura 27. Extracto III (Filtrado madre) para análisis de glicósidos cardiotónicos, cumarinas y lactonas terpénicas.



Fuente. Esta investigación.

3.6.2.1 Análisis de cumarinas.

3.6.2.1.1 Prueba de la fluoresceína. Se colocó unas gotas de la SH en un tubo de ensayo y se tapó la parte superior con papel filtro impregnado con solución diluida de NaOH 5%. Se calentó el tubo de ensayo a baño maría durante 10 min y luego se observó bajo luz UV el papel, la presencia de cumarinas es positiva al aparecer manchas amarillo-verdosas⁹⁸.

3.6.2.1.2 Prueba de Ehrlich. Se tomaron 0.5 mL del extracto de la SH con 0.5 mL del reactivo de Ehrlich. La presencia de cumarinas se evidencia por la aparición de una coloración naranja⁹⁹.

⁹⁷ SANABRIA, A. Op. Cit., p. 78.

⁹⁸ BILBAO, M. Op. Cit., p. 82.

⁹⁹ *Ibíd.*, p. 95.

3.6.2.2 Análisis de glicósidos cardiotónicos.

3.6.2.2.1 Prueba de Baljet. Se midieron 0.5 mL de la SH y se agregaron 0.5 mL del reactivo de Baljet. La prueba es positiva al presentarse una tonalidad anaranjada o roja oscura. El anillo lactónico se determinó por las pruebas de Baljet y Kedde¹⁰⁰.

3.6.2.2.2 Prueba de Kedde. Se tomó 0.5 mL de la SH y se agregó 0.5 mL del reactivo de Kedde. La prueba es positiva al presentarse una tonalidad azul o violeta para cardenólidos y la prueba negativa indica la presencia de bufadienólidos¹⁰¹.

3.6.2.2.3 Prueba de Keller-Killiani. Se tomaron 20 gotas de la SH y se agregaron 20 gotas de la solución 1 del reactivo de Keller-Killiani, y luego 20 gotas de la solución 2 del reactivo de Keller-Killiani, agitando ligeramente. La prueba es positiva al presentarse una tonalidad verde dentro de los siguientes 20 min. El desoxiazúcar, se determina mediante esta prueba.

3.6.2.2.4 Prueba de Tollens. A 5 mL de la SH se agregaron 5 gotas de piridina y 4 gotas del reactivo de Tollens, se calentó el tubo de ensayo en baño maría durante 5 minutos. La prueba es positiva al presentarse una película de plata en la pared del tubo¹⁰².

3.6.2.3 Análisis de lactonas terpénicas

3.6.2.3.1 Prueba del hidroxamato férrico. Se colocó 5 gotas de la solución SH en un tubo de ensayo y se agregó una gota de solución metanólica de clorhidrato de hidroxilamina 1N y una gota de solución 2N de KOH. Se calentó durante un minuto, se dejó enfriar y se aciduló con HCl 0.5 N hasta pH 3. Finalmente se agregó una gota de FeCl₃ 10%. La presencia de una coloración violácea o azul se considera como resultado positivo¹⁰³.

3.6.2.3.2 Prueba de Tollens. Se colocó 1ml de la SH en un tubo de ensayo y se agregó 1mL del reactivo de Tollens. La presencia de un espejo de plata se considera como resultado positivo¹⁰⁴.

3.6.3 Análisis de esteroides y/o triterpenoides libres, naftoquinonas y/o antraquinonas, taninos y saponinas.

¹⁰⁰ BILBAO, M. Op. Cit., p. 65.

¹⁰¹ *Ibíd.*, p. 65.

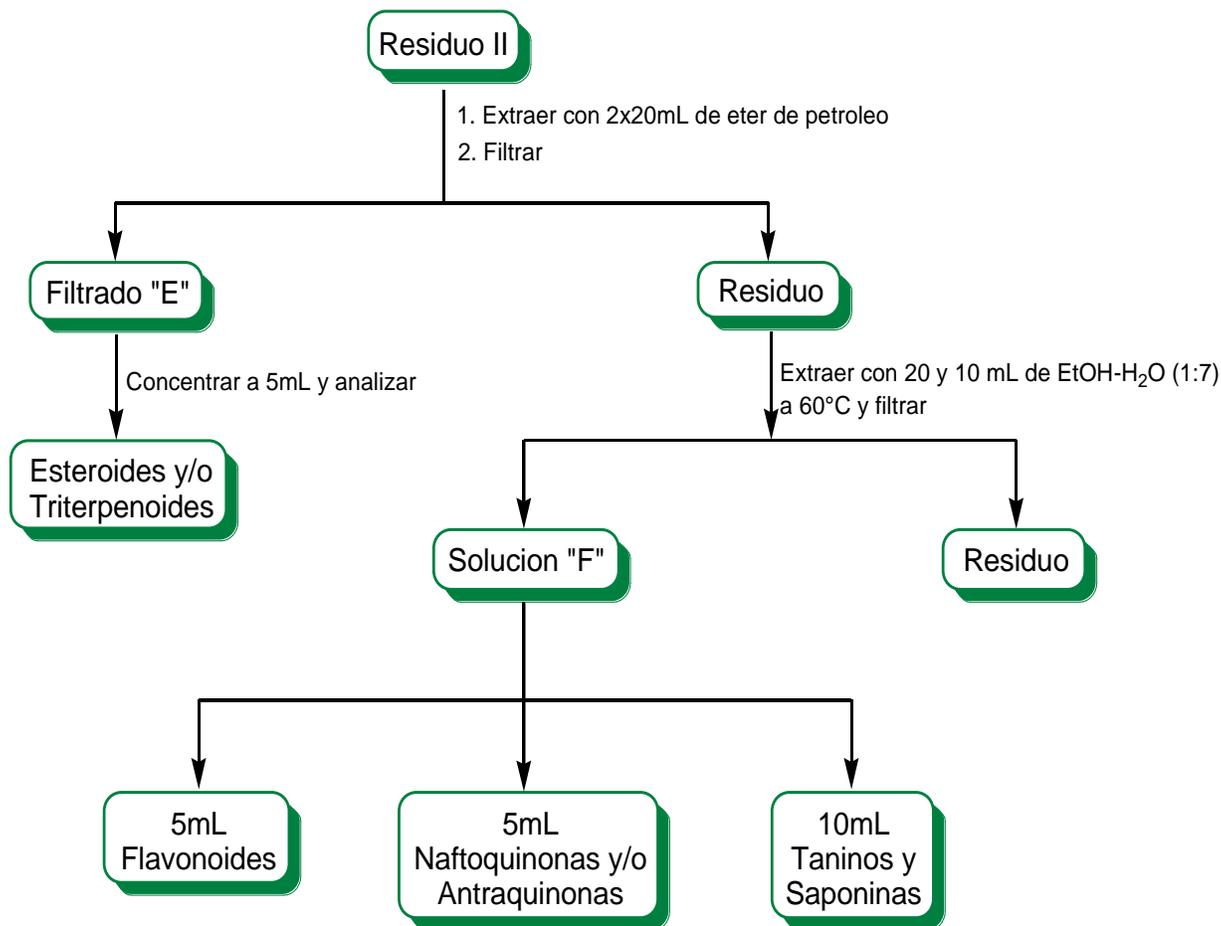
¹⁰² *Ibíd.*, p. 66.

¹⁰³ *Ibíd.*, p. 80.

¹⁰⁴ *Ibíd.*, p. 81.

Para el análisis de esteroides y/o triterpenoides libres, naftoquinonas y/o antraquinonas, taninos y saponinas se siguió la metodología presentada en el diagrama 3.

Diagrama 3. Metodología para el análisis de esteroides y/o triterpenoides, flavonoides, naftoquinonas y/o antraquinonas, taninos y saponinas¹⁰⁵.



Fuente. SANABRIA, A. Análisis Fitoquímico Preliminar. 1983.

El residuo II, de apariencia altamente viscosa (ver figura 28) se extrajo por agitación y calentamiento a 30 °C con 20 mL de éter de petróleo por duplicado. El extracto etéreo se separó del residuo y se obtuvo el Filtrado E (FE), con el cual se realizaron las pruebas para esteroides y/o triterpenoides.

¹⁰⁵ SANABRIA, A. Op .Cit., p. 70.

Figura 28. Residuo II en extracción con éter de petróleo.



Fuente. Esta investigación.

3.6.3.1 Análisis de flavonoides.

3.6.3.1.1 Prueba de Shinoda. Se colocó en un tubo de ensayo 0.5 g de magnesio en polvo, 1 mL de SF y 3 gotas de HCl concentrado hasta total desprendimiento de hidrógeno. Una coloración rosa, roja o naranja indica prueba positiva.¹⁰⁶

3.6.3.1.2 Prueba de Rosenhein. Se colocó 1 mL de SF y 0.5 mL de HCl concentrado en un tubo de ensayo y en baño maría durante 4 min. Se enfrió y se agregó 0.4 mL de alcohol amílico y se agitó. Una coloración roja, carmesí o naranja en la fase amílica indica prueba positiva. Esta prueba es específica para flavonoides con esqueleto de flavilio¹⁰⁷.

3.6.3.2 Análisis de quinonas.

3.6.3.2.1 Prueba de dicetonas cíclicas insaturadas. En medio ácido, se midieron 0.2 mL de la solución SF y se les agregó una pequeña cantidad de zinc en polvo junto con unas gotas de HCl concentrado. La presencia de antraquinonas es positiva al presentar una coloración amarilla¹⁰⁸.

¹⁰⁶ SANABRIA, A. Op. Cit., p. 36.

¹⁰⁷ *Ibíd.*, p. 37.

¹⁰⁸ BILBAO, M. Op. Cit., p. 46.

3.6.3.2.2 Prueba de Antraquinonas. Se evaporó 1 mL de la solución SF a baño maría y se le agregó 1 gota de NaOH 5 N y 0.01 g de hidrosulfito de sodio. La aparición de una coloración roja indica prueba positiva para antraquinonas¹⁰⁹.

3.6.3.2.3 Prueba de Rodamina. A un 1 mL de la solución SF se le agregó 1 mL de solución acuosa saturada de rodamina y 0.5 mL de amoníaco, se agitó ligeramente. La aparición de una coloración violeta determina la prueba como positiva¹¹⁰.

3.6.3.3 Análisis de taninos.

Se utilizó solución de ácido tánico al 5% como patrón para las pruebas de taninos.

3.6.3.3.1 Prueba del FeCl₃. Se tomaron 0.2 mL de la solución SF y se agregó 1 gota de solución acuosa de FeCl₃ al 1%. La reacción se considera positiva al presentarse una coloración verdosa¹¹¹.

3.6.3.3.2 Prueba del acetato de plomo. Se tomó 1 mL de acetato de plomo al 10 % y se agregó 1 mL de la solución SF. La reacción se considera positiva al presentarse un precipitado blanco¹¹².

3.6.3.3.3 Prueba de la gelatina-sal. Se tomó 1 mL de reactivo de gelatina-sal y 1 mL de la solución SF, se calentó a baño maría hasta ebullición. La mezcla se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 15 min. Se filtró y se adicionaron 2 mL de solución 10 M de urea y 3 gotas de solución de FeCl₃ al 10%. La prueba se considera positiva al presentarse una coloración verde – azul¹¹³.

3.6.3.4 Análisis de esteroides y/o triterpenoides.

El FE se concentró hasta un volumen de 5 mL. Se mezcló con 10 mL de una mezcla metanol-agua (90:10). Se agitó fuertemente y se dejó en reposo hasta que se logró una separación de las fases. De la fase etérea se tomaron 1-2 mL y se denomina solución E₁¹¹⁴.

3.6.3.4.1 Prueba de Fieser: Se tomó 1 mL del extracto E₁ y se agregó 1 gota de tolueno y 1 gota del reactivo de Fieser. La aparición de una coloración roja se considera como prueba positiva para esteroides¹¹⁵.

¹⁰⁹ BILBAO, M. Op. Cit., p. 46.

¹¹⁰ *Ibid.*, p. 47.

¹¹¹ SANABRIA, A. Op. Cit., p. 33.

¹¹² *Ibid.*, p. 33.

¹¹³ *Ibid.*, p. 35.

¹¹⁴ *Ibid.*, p. 71.

¹¹⁵ BILBAO, M. Op. Cit., p. 60.

El residuo se extrajo con 20 mL de una mezcla de etanol-agua (1:7) a 60 °C, se filtró y el residuo nuevamente se lavó con 10 mL de la mezcla. A partir de esto se obtuvo la solución F (SF), con la cual se realizaron las pruebas para flavonoides, naftoquinonas y/o antraquinonas, tanino y saponinas¹¹⁶.

3.6.3.4.2 Prueba para leucoantocianidinas. Se colocó 1 mL de la solución SF en baño maría durante 20 min. La aparición de una coloración roja indica prueba positiva¹¹⁷.

3.6.3.5 Análisis de saponinas.

3.6.3.5.1 Prueba de Rosenthaler. Se tomó 1 mL de la solución SF y 1 mL del reactivo de Rosenthaler. La aparición de una coloración violeta se considera prueba positiva¹¹⁸.

3.6.3.5.2 Prueba de la espuma. Se aciduló 1 mL de la solución SF con HCl al 20 % hasta pH 1 y se agitó fuertemente. La prueba se considera positiva si se genera una espuma que permanece estable por un lapso igual o mayor a media hora. Se repitió el procedimiento utilizando medio básico de NaOH al 20% hasta pH 13 donde igualmente se midió el tiempo de permanencia de la espuma¹¹⁹.

3.6.3.5.3 Prueba de hemólisis. Se midió 1 mL de solución de suero fisiológico y glóbulos rojos y 1 mL de solución SF. Se incubó a baño maría durante 1 h a 37 °C. En un tubo se colocó la solución de suero fisiológico y glóbulos rojos la cual fue sometida a incubación y sirvió como testigo. El oscurecimiento de la solución indica la presencia de saponinas por lisis de los glóbulos rojos¹²⁰.

3.6.3.5.4 Prueba de reconocimiento de saponinas triterpénicas y/o esteroidales. Se disolvieron 0.5 g de muestra (Residuo II) en 10 mL de CHCl₃ y se los calentó durante 10 min. Se filtró la solución y al filtrado se le aplicó una dilución 1:10 en CHCl₃. Se agregó 1 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de H₂SO₄ 98 %. La presencia de saponinas esteroidales es positiva al aparecer una coloración verdosa en la fase superior, mientras que las saponinas triterpénicas se revelan por la aparición de un anillo rojizo en la interfase¹²¹.

Se registró el cambio de coloración durante cada reacción química y se tabuló la información según el convencionalismo de la tabla 6.

¹¹⁶ SANABRIA, A. Op. Cit., p. 71.

¹¹⁷ *Ibíd.*, p. 37.

¹¹⁸ *Ibíd.*, p. 74.

¹¹⁹ *Ibíd.*, p. 74.

¹²⁰ BILBAO, M. Op. Cit., p. 74.

¹²¹ DELPORTE, Carla. Farmacognosia. Departamento de ciencias químicas y farmacéuticas. Universidad de Chile. 2010. p. 31.

Tabla 6. Convencionalismo usado para indicar la abundancia relativa o la ausencia de metabolitos secundarios¹²².

Convencionalismo	Significado
+++	Prueba positiva con certeza
++	Prueba positiva con alguna duda
+	Prueba positiva dudosa
-	Prueba negativa

Fuente. BILBAO, M. 1997.

En las pruebas que no se utilizó patrón de comparación, no fue posible adquirirlo, sin embargo se tuvo en cuenta la información bibliográfica para detectar el cambio de coloración¹²³.

3.7 EXTRACCIÓN DE SAPOGENINAS PARA ANÁLISIS EN CLAE Y CG-EM.

Se realizó una extracción sólido – líquido con 15 g de JL1T y agua HPLC en relación 1,5:10 m/v muestra: solvente. La mezcla se sometió a ebullición durante 15 minutos.

Se filtró la solución anterior, el residuo se desechó y el filtrado acuoso se sometió a hidrólisis con 1,5 mL de HCl 37% por cada 10 mL del filtrado durante 4 horas a 60°C.

Luego se realizaron cuatro extracciones con CHCl₃ en relación 1:1(10 mL de CHCl₃: 10 mL de filtrado). Seguido a esto, se extrajo la capa orgánica y se rotavaporó a 30°C hasta sequedad, lo cual corresponde al crudo de sapogeninas.

El residuo se disolvió en 50 mL metanol grado HPLC con ayuda de ultrasonido durante 30 minutos, se dejó enfriar y se agregaron 0,29 g de carbón activado y se calentó a 60 °C durante 30 minutos. Se dejó enfriar y se filtró al vacío, lavando la torta con 10 mL de metanol, obteniendo un filtrado de color amarillo, el cual se rotavaporó hasta obtener 20 mL aproximadamente¹²⁴¹²⁵.

Este filtrado se refrigeró a 4°C hasta que se cristalizó. Se filtró al vacío y se obtuvo el residuo que corresponde a las sapogeninas cristalizadas. (Ver figura 29)¹²⁶¹²⁷.

¹²² BILBAO, M. Op. Cit., p. 147.

¹²³ *Ibíd.*, p. 147.

¹²⁴ SHARAPIN N. (2000). Sapogeninas esteroideas: Materia prima para la fabricación de hormonas esteroideas. En: Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Pinzón R. Colombia. 96-98.

¹²⁵ GNOATTO, S. *Et al.* Op. Cit., p. 724.

¹²⁶ SHARAPIN N. Op. Cit., p. 96-98.

¹²⁷ GNOATTO, S. *Et al.* Op. Cit., p. 724.

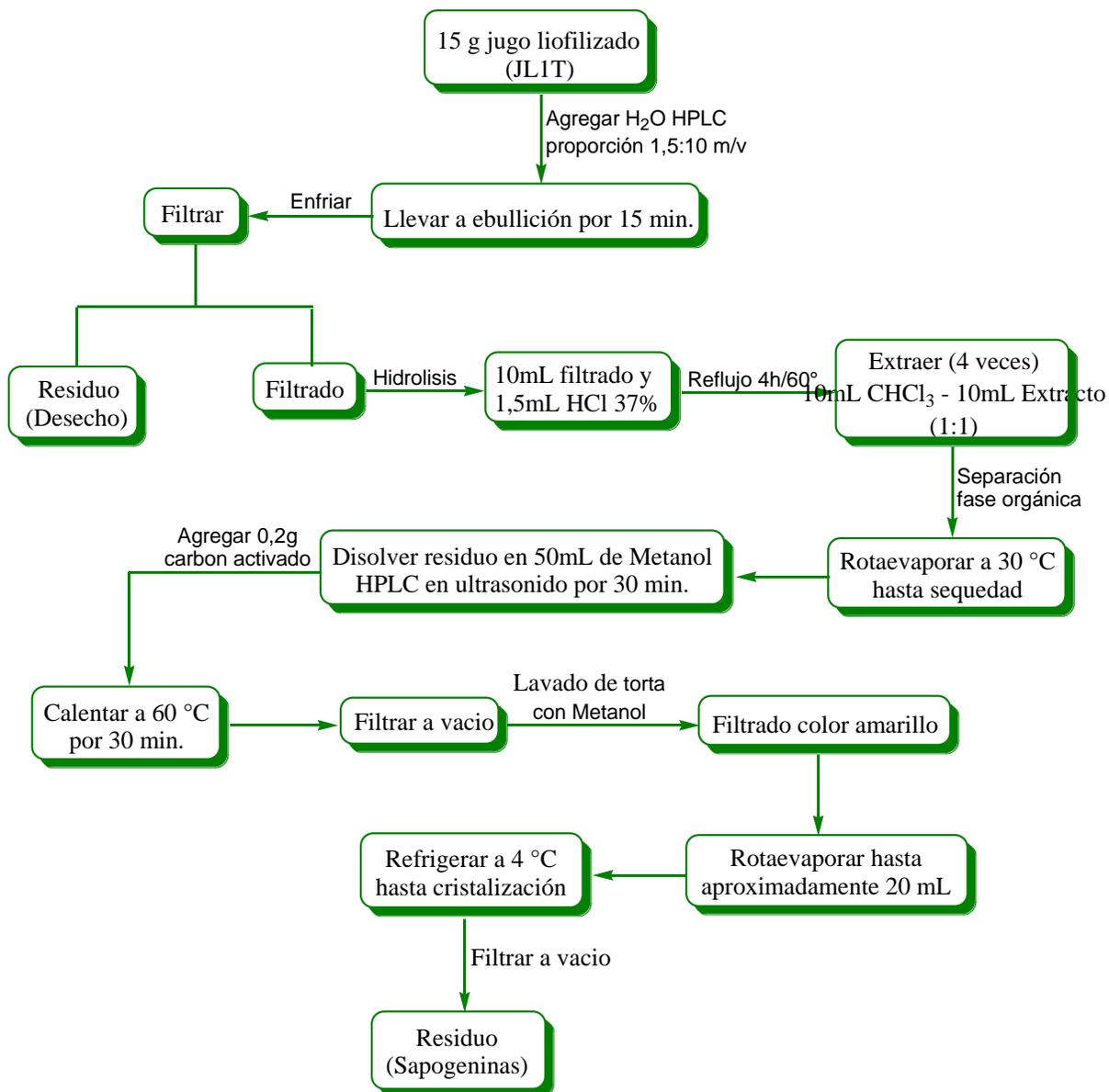
Figura 29. Sapogeninas cristalizadas.



Fuente. Esta investigación.

La metodología empleada para la extracción de sapogeninas y posterior cuantificación se muestra en el diagrama 4.

Diagrama 4. Metodología para extracción y cuantificación de sapogeninas¹²⁸¹²⁹.



Fuente. GNOATTO S, *et al.* HPLC Method to Assay Total Saponins in *Ilex paraguariensis* Aqueous Extract. 2005.

¹²⁸ GNOATTO, S. *Et al.* Op. Cit., p. 724.

¹²⁹ SHARAPIN N. Op. Cit., p. 96-98.

3.8 PRUEBAS DE RECONOCIMIENTO DE SAPOGENINAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (CCD).

Se realizaron pruebas por CCD de las sapogeninas de la especie Negra Común (*Furcraea gigantea*) para las muestras sin fermentar del jugo de fique liofilizado proveniente de El Tambo. Solo se empleó esta especie para el análisis debido a que presenta mayor facilidad de obtención, además de ser la especie más cultivada en El Tambo y Guaitarilla, ya que la especie Uña de Águila está siendo erradicada poco a poco de estos Municipios.

3.8.1 Pruebas de reconocimiento de sapogeninas por CCD.

Las sapogeninas hidrolizadas y cristalizadas según el numeral 3.7 (ver página 72) se sembraron en cromatofolios de aluminio recubiertos de sílica gel F₂₅₄ de dimensiones 8 cm x 2 cm con indicador fluorescente para detección por luz UV. La mezcla de solventes empleados para la elución se reporta en la tabla 7^{130,131}.

Tabla 7. Solventes utilizados en análisis de sapogeninas en CCD^{132,133}.

Nº	Solventes	Relación
1	Cloroformo – Acetona	9:1
2	Benceno – Acetona	9:1
3	Benceno - Metanol	9:1
4	Cloroformo – Etanol	95:5
5	Cloroformo – Tolueno	9:1
6	Tolueno - Acetato de Etilo	6:4

Fuente. Domínguez, X. 1973. Barbosa, E. 2002.

3.9 IDENTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS ESTEROIDALES (TIPO SAPOGENINA) POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

La muestra liofilizada de jugo de fique fresco de la especie Negra Común del Municipio de El Tambo fue enviada a la Universidad de Antioquia, quien se reservó las especificaciones de análisis, y donde se le realizó el análisis

¹³⁰ HARBONE, Op. Cit., p. 7.

¹³¹ BILBAO, M. Op. Cit., p.112-124.

¹³² DOMÍNGUEZ, X. Op. Cit., p.153.

¹³³ BARBOSA, E. Op. Cit., p. 24.

cromatográfico para la identificación de las sapogeninas, con un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas modelo CG 7890^a. (Ver figura 30 y tabla 8).

Figura 30. Equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) 7890^a FID/MSD 5975C.



Fuente. Universidad de Antioquia.

Tabla 8. Especificaciones del equipo de CG.

Equipo	Cromatógrafo de gases Agilent CG 7890A FID/MSD 5975C
Detector	MSD (Mass Selective Detector)
Calificación operacional	Khymos código: Kh09cjb071 de Octubre 2 de 2009

Fuente. Universidad de Antioquia.

El instrumento se configuró en modo automático (Atune), al inicio y durante el desarrollo de los análisis.

3.9.1 Tratamiento de las muestras para análisis por CG-EM. Una muestra de 50 μ L del líquido se adicionó en un inserto y a su vez éste se colocó en un vial ámbar de encapsulamiento. Se realizó una secuencia de análisis con inyección

automática por duplicado. Los eventos de integración de la señal de cada analito se optimizaron y se mantuvieron para evitar la pérdida de exactitud y precisión¹³⁴.

3.10 CUANTIFICACIÓN DE SAPOGENINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE).

Se realizó un análisis tipo analítico y la cuantificación de sapogeninas se llevó a cabo en el equipo CLAE WATERS que se encuentra en la Universidad de Nariño y que fue adquirido mediante el Programa de Investigación: “Valoración de subproductos de la agroindustria del fique en el Departamento de Nariño” (ver figura 31). Este equipo cuenta con una bomba binaria 1525 y detector DAD WATERS 2998. Para la cuantificación, se utilizó la columna analítica Spherisorb® C8 4.6x100 mm; 5 µm id equipada con pre-columna Spherisorb® C₈ 4.6x100 mm.

El detector DAD WATERS 2998 con el que cuenta el equipo de la Universidad de Nariño cuantifica impurezas traza a niveles de 0.004% con una relación señal-ruido baja, una alta resolución óptica y digital, ofrece una transmisión de luz eficaz para una sensibilidad máxima, permite el funcionamiento simultáneo en 2D y 3D en el software Empower 2, longitudes de onda de 190 a 500 nm y hasta 2.0 AU sin sacrificar la linealidad, desviación de 1.3% a 2.0 AU, desviación de 5.0% a 2.8 AU¹³⁵. (Ver figura 31).

Los estándares de sapogeninas utilizados fueron ácido oleanólico al 98% y acetato de hecogenina al 90% marca Sigma (Sigma Aldrich, USA).

¹³⁴ Universidad de Antioquia.

¹³⁵ WATERS, Detector PDA 2996 de Waters *Guía de funcionamiento*. 2009. p. 57.

Figura 31. Equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) con bomba binaria 1525 y detector DAD WATERS 2998.



Fuente. Esta investigación.

Las sapogeninas cristalizadas se disolvieron en 15 mL de acetonitrilo grado HPLC con ultrasonido durante 30 min y se purificaron mediante SPE C₁₈, para eliminar posibles contaminantes. Finalmente se filtró con acrodisk de 0.45µm y se inyectó en el equipo de CLAE Waters con bomba binaria 1525 y Detector PDA 2998 operado con el software Empower 2,0 (Waters, USA). Las condiciones de equilibrio de la columna se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de acondicionamiento de la columna CLAE.

Activación de SPE	1mL de MetOH
Equilibrio	1 mL de agua grado HPLC
Lavado 1	MetOH 5%
Lavado 2	MetOH 100%

Fuente. Esta investigación.

3.10.1 Método de análisis de sapogeninas por CLAE-DAD. Las condiciones para el análisis cromatográfico de sapogeninas se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Condiciones de análisis para la cuantificación de saponinas por CLAE.

Equipo	HPLC WATERS con bomba binaria 1525
Detector	DAD WATERS 2998
Columna Analítica	Spherisorb® C8 4.6x100 mm; 5 µm id
Fase móvil	ACN: H2O (60:40), modo isocrático
Flujo	0.75 ml/min.
Detección	203nm y 235nm
Inyección	20 µL loop.
Temperatura	30°C
Diluyente	acetonitrilo y metanol

Fuente. Gnoatto, B. 2005. Esta investigación.

Para la cuantificación se utilizó el método de patrón externo utilizando como estándares ácido oleanólico al 98 % y acetato de hecogenina al 90 %. La curva de calibración se realizó con cinco concentraciones diferentes dos inyecciones para cada concentración como se reporta en la tabla 11.

Tabla 11. Concentración de los estándares para las curvas de calibración.

Solución	Ácido oleanólico (ppm) λ = 203 nm	Acetato de hecogenina (ppm) λ = 235
1	20	10
2	60	20
3	80	40
4	100	60
5	120	100

Fuente. Esta investigación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 REACCIONES COLORIMÉTRICAS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA.

Los resultados del estudio fitoquímico cualitativo del jugo de fique fermentado y sin fermentar, de las especies Uña de Águila y Negra Común, de los Municipios de El Tambo y Guaitarilla se presentan en las tablas 13 y 14. Este análisis fue realizado por duplicado.

Las muestras fueron codificadas de acuerdo a la siguiente simbología:

1T: Muestra de Negra Común de El Tambo.

1FT: Muestra de Negra Común, fermentada de El Tambo.

2T: Muestra de Uña de Águila de El Tambo.

2FT: Muestra de Uña de Águila, fermentada de El Tambo.

1G: Muestra de Negra Común de Guaitarilla.

1FG: Muestra de Negra Común, fermentada de Guaitarilla.

2G: Muestra de Uña de Águila de Guaitarilla.

2FG: Muestra de Uña de Águila, fermentada de Guaitarilla.

Además, se realizó una determinación del pH general del jugo de fique de las dos variedades en sus estados fresco y fermentado, donde se tomó el pH de cada muestra por triplicado y se sacó un promedio, el cual se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Datos de la determinación de pH y apariencia física del jugo de fique fermentado y sin fermentar.

	pH	Color y apariencia
1T	5.25	Verde claro
1FT	4.5	Verde oscuro con precipitación con fase acuosa amarilla
2T	5.15	Verde oscuro
2FT	4.4	Verde oscuro con precipitación
1G	5.2	Verde claro
1FG	4.4	Verde oscuro con precipitación con fase acuosa amarilla
2G	5.18	Verde claro
2FG	4.43	Verde oscuro con precipitación y fase acuosa amarilla

Fuente. Esta investigación.

Los datos de pH reportados son variables al aumentar el proceso de fermentación. La apariencia física también es variable, ya que presenta la sedimentación de las geninas a medida que aumenta el proceso fermentativo, presentando dos fases características.

En la figura 32 se observa el jugo fresco de la especie Negra Común al realizar la determinación del pH.

Figura 32. Jugo de fique fresco de la especie Negra Común Tambo.



Fuente. Esta investigación.

Tabla 13. Resultados de la Marcha Fitoquímica Cualitativa para el jugo de fique proveniente del Municipio de El Tambo.

PRUEBA FITOQUÍMICAS		MUESTRA			
Metabolito	Prueba	1T	1FT	2T	2FT
Alcaloides	Dragendorff	++	++	++	++
	Ehrlich	+	-	+	-
	Reineckato	++	+	++	+
	Hager	++	++	++	++
Cumarinas	Ehrlich	+	+	+	+
	Fluorescencia	+	+	+	+
Glicósidos	Baljet	+	+	+	+
	Kedde	+	+	+	+
	Keller-Killiani	-	-	-	-
	Tollens	-	-	-	-
Terpenlactonas	Hidroxamato	-	-	-	-
	Tollens	-	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	+	-	+	+
	Rosenhein	++	++	++	+
Quinonas	Dicetonas	+	-	+	-
	NaOH	-	-	-	-
	Rodamina	-	-	-	-
Taninos	FeCl ₃	+	+	+	+
	Ac plomo	+++	+++	+++	++
	Gelatina	-	-	-	-
Esteroides	Fieser	++	++	++	++
Saponinas	Espuma H ⁺	+	+	+	+
	Espuma OH ⁻	++	++	++	++
	Hemólisis	+++	+++	+++	+++
	Reconocimiento	++	++	++	++

Fuente. Esta investigación.

Tabla 14. Resultados de la Marcha Fitoquímica Cualitativa para el jugo de fique proveniente del Municipio de Guaitarilla.

PRUEBA FITOQUÍMICAS		MUESTRA			
Metabolito	Prueba	1G	1FG	2G	2FG
Alcaloides	Dragendorff	++	++	+	++
	Ehrlich	+	-	-	-
	Reineckato	+	+	++	++
	Hager	+	+	+	++
Cumarinas	Ehrlich	+	+	+	+
	Fluorescencia	+	+	+	+
Glicósidos	Baljet	+	+	+	+
	Kedde	+	+	+	+
	Keller-Killiani	-	-	-	-
	Tollens	-	-	-	-
Terpenlactonas	Hidroxamato	-	-	-	-
	Tollens	-	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	+	+	+	+
	Rosenhein	+	++	-	+
Quinonas	Dicetonas	+	-	+	-
	NaOH	-	-	-	-
	Rodamina	-	-	-	-
Taninos	FeCl ₃	+	+	+	+
	Ac. Plomo	+++	+++	+++	++
	Gelatina	-	-	-	-
Esteroides	Fieser	++	++	++	++
Saponinas	Espuma H ⁺	++	++	++	++
	Espuma OH ⁻	++	++	++	+
	Hemólisis	+++	+++	+++	+++
	Reconocimiento	++	++	++	++

Fuente. Esta investigación.

Para alcaloides se realizó el análisis por etapas dentro de la marcha fitoquímica para dichos compuestos, y se utilizó cafeína analítica como patrón de referencia (ver figuras 33 y 34).

Figura 33. Pruebas de Reineckato, Dragendorff y Hager con patrón de cafeína.



Fuente. Esta investigación.

Figura 34. Pruebas para alcaloides positivas de Dragendorff, Reineckato, Hager y Erlich con FB jugo fresco Negra Común El Tambo.



Fuente. Esta investigación.

En la figura 35, la prueba de fluoresceína para cumarinas de la SH 2G es positiva, ya que se evidencia bajo luz UV las cumarinas volátiles presentes en la muestra. También se observa que la prueba de Ehrlich es positiva ya que presenta la coloración naranja debido a la presencia del grupo furano¹³⁶.

Figura 35. Prueba de fluoresceína positiva para cumarinas con SH 2G (izquierda). Prueba de Ehrlich positiva para SH 1T (derecha).



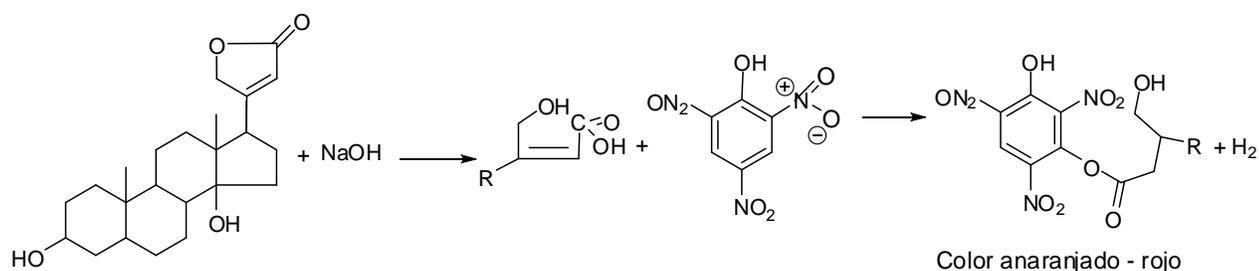
Fuente. Esta investigación.

En la figura 36, se describe la reacción general para los glicósidos. La prueba de Baljet con la solución SH 2G es positiva, ya que la coloración es roja, debido al anillo lactónico presente. El anillo lactónico de los glicósidos cardiotónicos reacciona con compuestos aromáticos nitrados, generando con previa ruptura de la lactona y por sustitución electrofílica en el anillo aromático, compuestos coloreados, válidos para caracterización¹³⁷.

¹³⁶ BILBAO, M. Op. Cit., p. 82.

¹³⁷ *Ibíd.*, p. 65.

Figura 36. Reacción general de glicósidos cardiotónicos con el reactivo de Baljet¹³⁸.



Fuente. BILBAO, M. 1997.

La prueba de Kedde resultó negativa para reconocimiento de cardenólidos y sus agliconas, porque no se evidenció una reacción, debido a que se esperaba una coloración azul-violeta. Sin embargo, se especifica que la muestra puede contener bufadienólidos, por lo tanto se la toma como positiva (+) pero con incertidumbre¹³⁹.

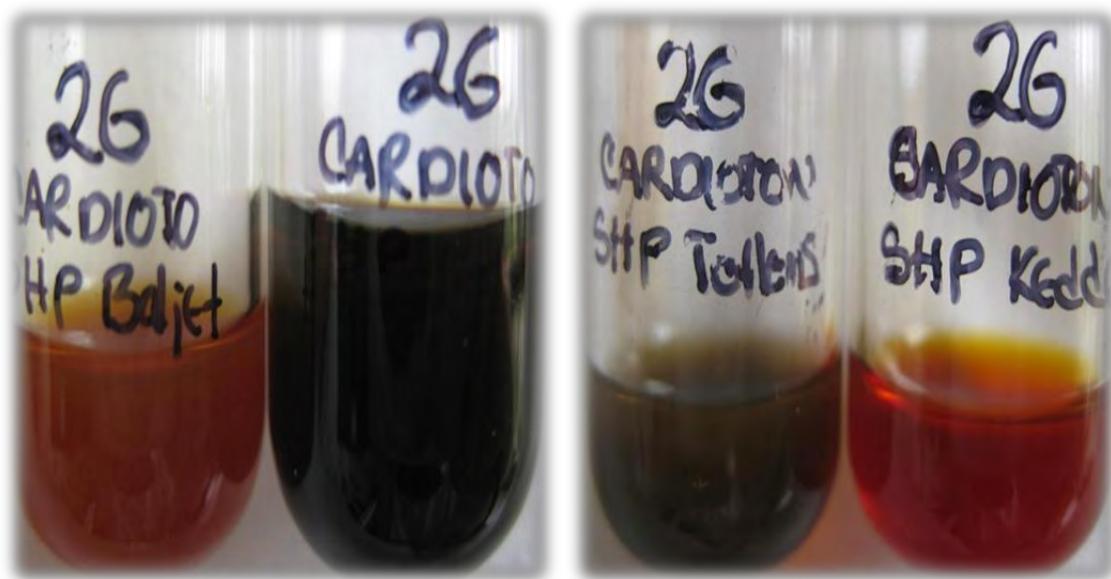
La prueba de Tollens fue negativa, pues no se evidenció el espejo de plata, debido a la posible ausencia del grupo aldehídico de los azúcares de la aglicona cardenólida (ver figura 37). De igual manera, la prueba de Keller – Killiani fue negativa, pues no se evidenció la coloración verdosa característica, ya que no hubo reacción de desoxiazúcares¹⁴⁰.

¹³⁸ BILBAO, M. Op. Cit., p. 66.

¹³⁹ *Ibíd.*, p. 65.

¹⁴⁰ *Ibíd.*, p. 66, 67.

Figura 37. Prueba positiva para Glicósidos Cardiotónicos: Prueba positiva para Baljet y Kedde. Negativa para Tollens y Keller – Killiani con SH 2G.

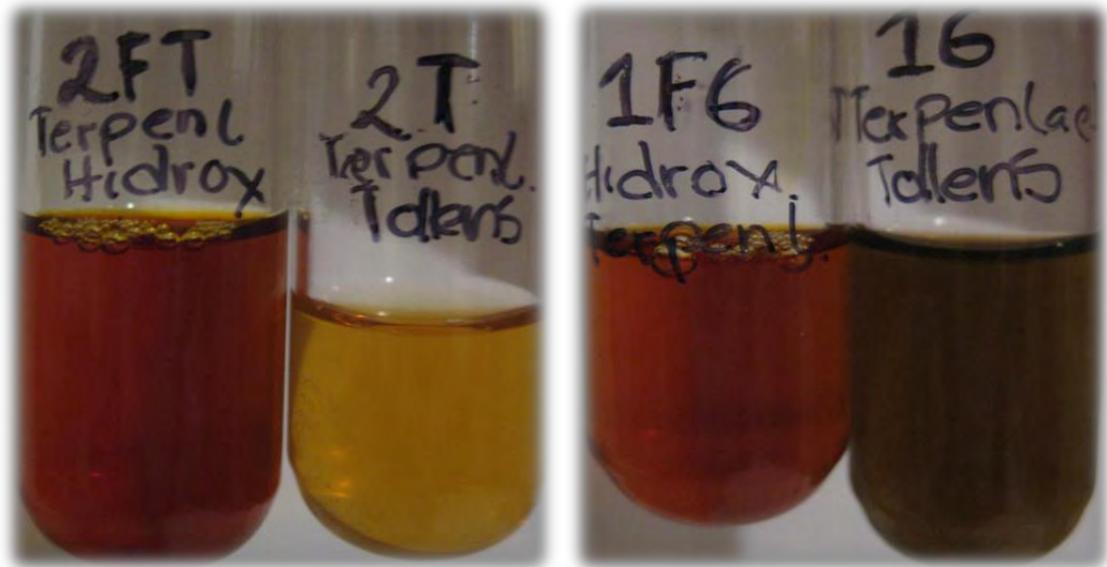


Fuente. Esta investigación.

La prueba de hidroxamato férrico para detectar lactonas terpénicas resulto negativa (ver figura 38), ya que la coloración esperada era violeta, por lo tanto no se formó el ácido hidroxámico respectivo. En la prueba de Tollens se alcanza a observar levemente el cambio de color, pero no se forma el espejo de plata para evidenciar las lactonas terpénicas, ya que esta prueba evidencia la presencia de lactonas $\alpha - \beta$ insaturadas y las lactonas $\beta - \gamma$ insaturadas con hidróxido de sodio respectivamente¹⁴¹.

¹⁴¹ BILBAO, M. Op. Cit., p. 78-85.

Figura 38. Prueba negativa para latonas terpénicas. En pruebas de hidroxamato férrico y Tollens.



Fuente. Esta investigación.

Se observa la coloración ideal para la prueba de Shinoda con el patrón de quercetina (ver figura 39 izquierda), que indica la presencia de flavonoides. Las pruebas realizadas de Rosenhein y Shinoda (ver figura 39 derecha), con la solución F (SF) del jugo de fique fresco de la especie Uña de Águila del Municipio de El Tambo (2T), evidencian resultado positivo, ya que se presentó un cambio de coloración durante la reacción.

Figura 39. Prueba de Shinoda con patrón de quercetina (izquierda). Prueba positiva para flavonoides con la prueba de Rosenhein y Shinoda con SF de 2T (Derecha).

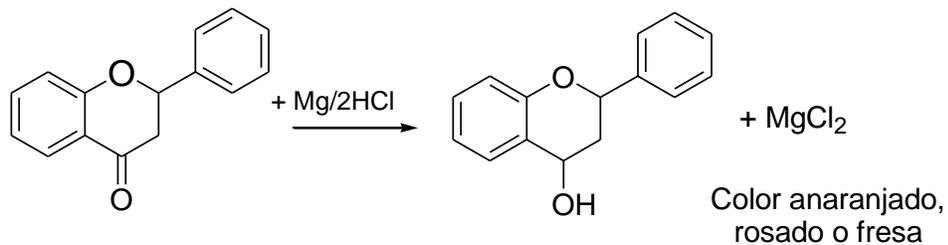


Fuente. Esta investigación.

La reacción general que presentan los flavonoides frente a la prueba de Shinoda se presenta en la figura 40, donde los flavonoides con anillo de gammabenzopirona reaccionan en presencia de ácido clorhídrico concentrado y magnesio y el oxígeno del grupo carbonilo se reduce a -OH, produciendo coloración anaranjada, rosa o fresa¹⁴².

¹⁴² BILBAO, M. Op., Cit. p. 36.

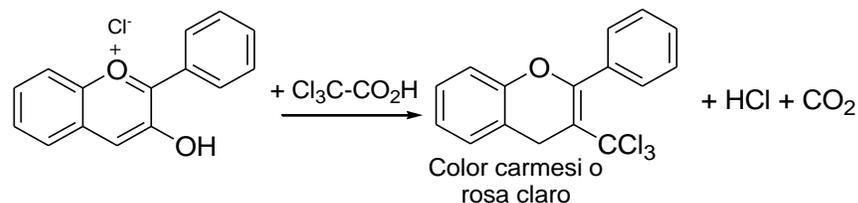
Figura 40. Reacción general de los flavonoides con el reactivo de Shinoda¹⁴³.



Fuente. BILBAO, M. 1997.

La reacción general que presentan los flavonoides frente a la prueba de Rosenhein se presenta en la figura 41. Flavonoides con anillo de flavilio resultan positivos para esta prueba, por tener un anillo carbonado en sistema de dieno conjugado. De esta manera se producen colores desde el carmesí hasta rosado claro¹⁴⁴.

Figura 41. Reacción general de los flavonoides con el reactivo de Rosenhein¹⁴⁵.



Fuente. BILBAO, M. 1997.

Para las pruebas de dicetonas, tanto en el jugo de fique fresco como fermentado, se evidencio la presencia de quinonas (ver figura 42), donde la SF 2G y SF 1T presentan reacción positiva para dicetonas cíclicas, ya que la coloración de la solución en reacción con ácido y zinc fue amarilla. Las pruebas de quinonas (NaOH) y rodamina saturada fueron negativas en ambos casos.

¹⁴³ BILBAO, M. Op., Cit. p. 36.

¹⁴⁴ *Ibíd.*, p. 37.

¹⁴⁵ *Ibíd.*, p. 37.

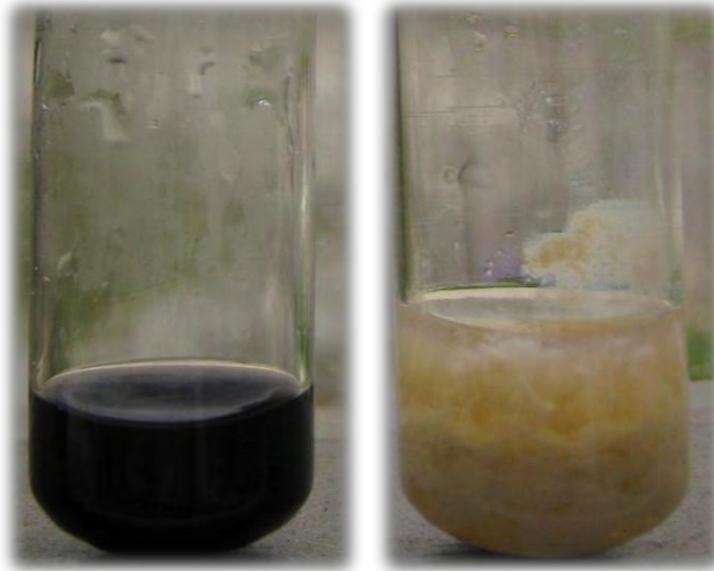
Figura 42. Prueba positiva para dicetonas cíclicas insaturadas y antraquinonas, prueba negativa para prueba de rodamina con SF 2G (izquierda) y con SF 1T (derecha).



Fuente. Esta investigación.

El resultado positivo para las pruebas de taninos de 1T se muestra en la figura 43 y 44, siendo evidente el precipitado blanco en la prueba del el acetato de plomo. La prueba del cloruro férrico es positiva, pues se observa ligeramente la coloración verde en la parte superior del tubo. La prueba para gelatina sal se encontró negativa.

Figura 43. Prueba del FeCl_3 con ácido tánico (izquierda) y acetato de plomo con ácido tánico (derecha).



Fuente. Esta investigación.

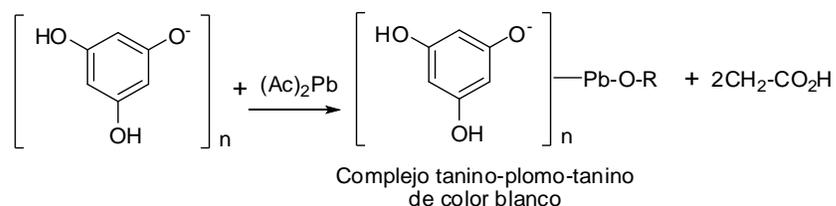
Figura 44. Prueba positiva para taninos: prueba del acetato de plomo (centro), FeCl_3 (izquierda) y prueba negativa para gelatina sal con SF 1T (Derecha).



Fuente. Esta investigación.

La reacción general que presentan los taninos con el acetato de plomo se describe en la figura 45, donde al reaccionar forman un complejo tanino-plomo-tanino de color blanco y es el que precipita en la reacción, además se forma acetaldehído¹⁴⁶.

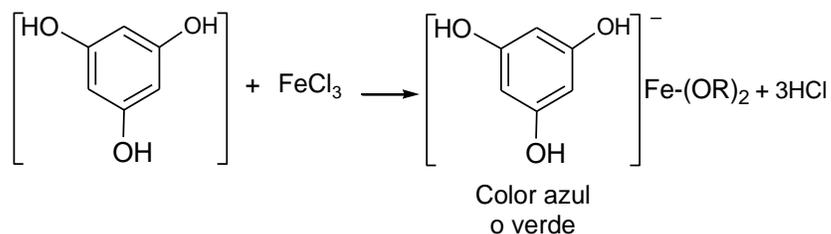
Figura 45. Reacción general de los taninos con acetato de plomo¹⁴⁷.



Fuente. BILBAO, M. 1997.

La reacción general que presentan los taninos con el cloruro férrico se describe en la figura 46, ya que la reacción sirve para reconocer fenoles, los taninos reaccionan con la solución acuosa del tricloruro férrico al 1%, dando coloración azul (taninos derivados del ácido gálico) o verde (taninos derivados del ácido procatéquico)¹⁴⁸.

Figura 46. Reacción general de los taninos con cloruro férrico¹⁴⁹.



Fuente. BILBAO, M. 1997.

Para compuestos esteroides se realizó la prueba de Fieser (ver figura 47), y para todas las muestras analizadas se obtuvo un resultado similar.

¹⁴⁶ BILBAO, M. Op. Cit., p. 33.

¹⁴⁷ *Ibíd.*, p. 33.

¹⁴⁸ *Ibíd.*, p. 33.

¹⁴⁹ *Ibíd.*, p. 33.

Figura 47. Prueba de Fieser positiva para esteroides con SF de 1G y 2FG.



Fuente. Esta investigación.

En la figura 48, se observan los resultados positivos para saponinas de la SF 1G, donde la prueba de espuma en medio ácido y básico es positiva, debido a la disminución de la tensión superficial y la permanencia de la espuma durante un lapso de tiempo considerable. La prueba de hemólisis es positiva, ya que la lisis de los glóbulos rojos es completa después de la incubación a 37 °C durante unos minutos¹⁵⁰.

¹⁵⁰ BILBAO, M. Op. Cit., p. 74.

Figura 48. Resultado positivo de saponinas para la prueba de espuma ácida, básica y hemólisis con SF 1G y 2G. Tubo de referencia para hemólisis.



Fuente. Esta investigación.

Además de las pruebas del reconocimiento de saponinas, se determinó la presencia de saponinas triterpénicas y/o esteroidales (ver figura 49), donde se evidencio claramente el anillo verde superior que corresponde a las saponinas esteroidales, mientras que la coloración rojiza en la interfase corresponde a las saponinas triterpénicas¹⁵¹. Esta prueba se realizó para cada una de las muestras.

¹⁵¹ DELPORTE, C. Op. Cit., p. 32.

Figura 49. Prueba de reconocimiento de saponinas triterpénicas y/o esteroidales. Residuo II, especie Negra Común El Tambo.



Fuente. Esta investigación.

Ya que las saponinas esteroidales son compuestos que poseen estructura compleja formada por el núcleo esteroidal hidrofóbico y una parte hidrofílica conformada por unidades de monosacáridos¹⁵², lo que les proporciona más apolaridad, se encuentran en la fase orgánica superior (color verde), mientras que las triterpénicas están en la parte polar inferior (color rojizo).

Mediante la realización del análisis fitoquímico cualitativo total del jugo de fique fermentado y sin fermentar de las especies Negra Común y Uña de Águila provenientes de los Municipios de El Tambo y Guaitarilla, se evidencia por primera vez la presencia de metabolitos secundarios como cumarinas, quinonas y glicósidos cardiotónicos y se confirma la presencia de saponinas, taninos, flavonoides, esteroides, triterpenos y alcaloides.

En general, las dos especies de fique presentan una composición química similar cuando se analizan fermentadas o sin el proceso de autólisis. Esto se lo puede observar en las tablas de los resultados fitoquímicos (ver tabla 13 y 14), donde, al menos, 2/3 de los resultados de los análisis realizados a cada metabolito, no cambiaron (salvo en los alcaloides), por lo que se concluye que la composición química de las muestras no cambia de forma relevante al someterla al proceso de la fermentación.

¹⁵² ORESTES, J. Op. Cit., p. 1.

En los resultados de los alcaloides de las muestras de El Tambo (ver tabla 13), se observa que hay un cambio entre las muestras fermentadas y no fermentadas, en donde las muestras 1T y 2T, presentan resultados más certeros en la presencia de estos metabolitos, mientras que en las muestras 1FT y 2FT, algunos colores que determinan las pruebas, fueron menos intensos, dando así, resultados más inseguros, asociados a la especie de la planta, la edad, el tiempo de recolección, las condiciones atmosféricas, el suelo y zona geográfica entre otras.

Al observar los resultados de alcaloides en las muestras 2G y 2FG (ver tabla 14), se puede decir que dichos metabolitos se encuentran presentes en éstas, con cierta variación en cuanto a los resultados para las especies de El Tambo. Sin embargo, la muestra fermentada (2FG) tiene resultados más confiables que la muestra sin fermentar por la coloración esperada según el patrón de cafeína. (2G). También según la marcha fitoquímica de alcaloides, en general se puede deducir que los alcaloides presentes son solubles en cloroformo, pero los de tipo fenólico, amonio cuaternario y óxidos de aminas están en menor proporción debido a que las pruebas realizadas a los extractos que los contenían no fueron positivas.

Los resultados de alcaloides y en general de todas las muestras de El Tambo y Guaitarilla, varían por las condiciones atmosféricas, agua y nutrientes presentes en el suelo, plagas y enfermedades a las que están expuestas las plantas y/o fecha de recolección, debido a que el municipio de El Tambo está ubicado a una altura de 2250 m.s.n.m., presenta una precipitación media anual de 1.199 mm y temperatura de 18 °C, mientras que el municipio de Guaitarilla está ubicado a una altura de 2650 m.s.n.m., con precipitación media anual de 1.140 mm y una temperatura promedio de 14 °C.

Ya que dentro de las diferencias más marcadas dentro del análisis fitoquímico es la presencia de alcaloides, y como consecuencia de su exposición al proceso de fermentación, se puede deducir que al ser sustancias con volatilidad alta, pueden perderse dentro del proceso de autólisis al que se somete la muestra de jugo.

En la tabla 15, se observa una diferencia en las pruebas colorimétricas realizadas para detectar la presencia de los metabolitos, esto probablemente se debe a la diferencia entre las condiciones anteriormente mencionadas. (Ver anexo A).

Ya que se determinaron los análisis más representativos los resultados del análisis fitoquímico para los diferentes metabolitos se indica en el Anexo D.

Tabla 15. Pruebas con variaciones colorimétricas.

Prueba	Especie	Especie
Shinoda	1FG (+)	1FT(-)
Rosenhein	2T (++)	2G (-)
Acetato de plomo	2FT (+++)	2FG(++)
Dragendorff	2T(++)	2G(+)
Erlich	2T(++)	2G(-)
Reineckato	1T(++)	1G(+)
	2FT(+)	2FG(++)
Hager	1T(++)	1G(+)
	1FT(++)	1FG(+)
	2T(++)	2G(+)

Fuente. Esta investigación.

4.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA DE SAPOGENINAS.

Los resultados de los análisis cromatográficos se presentan en la tabla 16. Comparando los resultados con los reportados en la bibliografía (ver tabla 17), se puede deducir que la hecogenina y la tigogenina se encuentran presentes en la muestra de sapogeninas crudas recristalizadas, ya que los valores de R_f con la mezcla de solventes 6 los valores encontrados, son cercanos a los reportados para condiciones similares, debido a la polaridad media que presentan los solventes.

Para las demás mezclas de solventes, los valores difieren según la polaridad de los solventes utilizados y se puede observar que para solventes con baja polaridad como la mezcla 4, la muestra no eluye de manera significativa.

En la tabla 16, se puede observar que la mezcla de solventes 5 presento mayor separación de sapogeninas por la aparición de cuatro bandas. Las mezcla de solventes 2,3 y 6 presentaron 3 bandas cada una, siendo la mezcla 6 la que presento mejor resolución.

Las que no tuvieron buena separación fueron las mezclas 1 y 4, presentando una y dos bandas respectivamente.

Tabla 16. Valores de Rf Jugo Liofilizado Negra Común Tambo (JL1T).

Nº	Solventes	Relación	Rf			
			banda 1	banda 2	banda 3	banda 4
1	Cloroformo - Acetona	9:1	0,65			
2	Benceno - Acetona	9:1	0,3	0,22	0,7	
3	Benceno - Metanol	9:1	0,35	0,27	0,1	
4	Cloroformo - Etanol	95:5	0,2	0,09		
5	Cloroformo - Tolueno	9:1	0,8	0,57	0,45	0,06
6	Tolueno - Acetato de Etilo	6:4	0,7	0,50	0,32	

Fuente. Esta investigación.

En la tabla 17, se encuentran los valores de Rf reportados para tigogenina y hecogenina. En la figura 50 se observa el análisis cromatográfico para la mezcla No 5 de solventes, donde se evidenciaron cuatro bandas (Figura 50 superior), y se observa la separación de la mezcla de solventes 4 (Figura 50 inferior).

Tabla 17. Valores de Rf encontrados para Sapogeninas.

Banda No	Color en luz visible	Compuesto	Rf
1	Amarillo que cambia a violeta	Tigogenina	0,74
2	Amarillo que cambia a naranja	Hecogenina	0,51
3	Marrón claro	Desconocido	0,42
4	Amarillo verdoso	Desconocido	0,35

Fuente. Barbosa, R 2004.

Figura 50. Sapogeninas mezcla de solventes 6 (arriba), sapogeninas mezcla No 4 de solventes (abajo).



Fuente. Esta investigación.

4.3 IDENTIFICACIÓN DE SAPOGENINAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM).

Las muestras de sapogeninas recristalizadas obtenidas del proceso de hidrólisis del jugo liofilizado de la especie Negra Común de El Tambo (JL1T), se enviaron a la Universidad de Antioquía, donde se realizó la identificación por CG-EM. En la figura 51, se observa el cromatograma correspondiente a dicha muestra.

El paso crucial en el análisis de sapogeninas en CG es la hidrólisis, ya que de las condiciones de hidrólisis depende el resultado de la identificación. El tiempo y agente hidrolizante son claves para obtener el resultado deseado en la identificación de las agliconas¹⁵³.

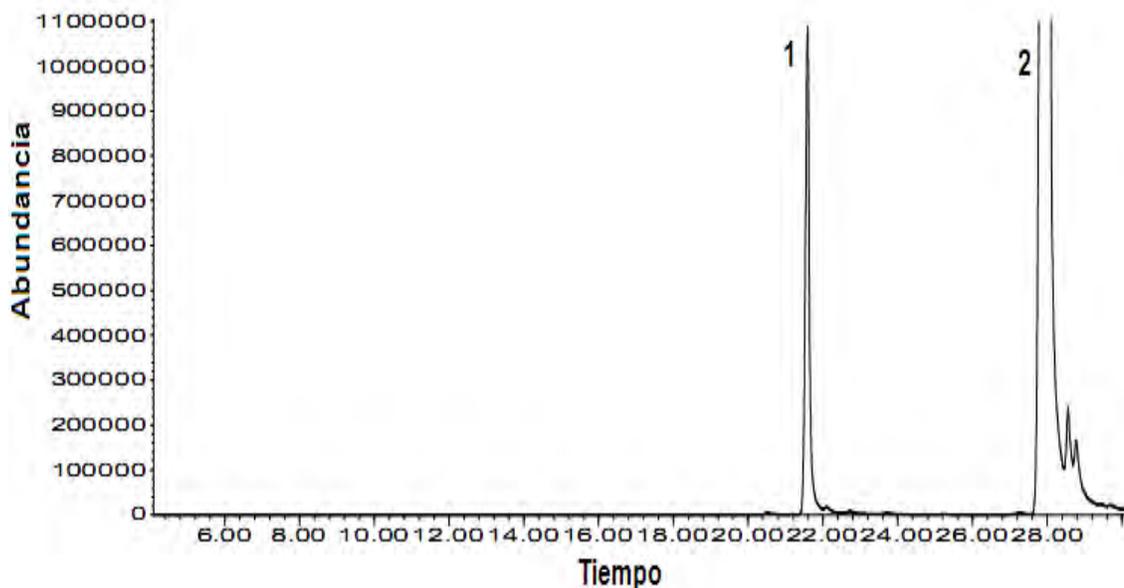
Según la base de datos de la Universidad de Antioquia, en el perfil cromatográfico, los compuestos presentes en la muestra JL1T corresponden a las agliconas de tigenina (pico 1) y hecogenina (pico 2) de la figura 51.

Para confirmar que estos picos corresponden a dichos compuestos, se realizó el análisis por espectrometría de masas, donde, el pico base es de m/z 139. (Ver figura 52 y 54).

¹⁵³ OLESZEK W, Chromatographic determination of plant saponins. Journal of Chromatography A. 2002. (967). p. 151.

Los tiempos de retención obtenidos en cromatografía de gases para los compuestos mayoritarios, según la base de datos de la Universidad de Antioquia corresponden a tigogenina y hecogenina. (Ver tabla 18).

Figura 51. Perfil cromatográfico de sapogeninas en la muestra JL1T.



Fuente. Esta investigación. Universidad de Antioquia.

Tabla 18. Identificación de las señales cromatográficas mayoritarias.

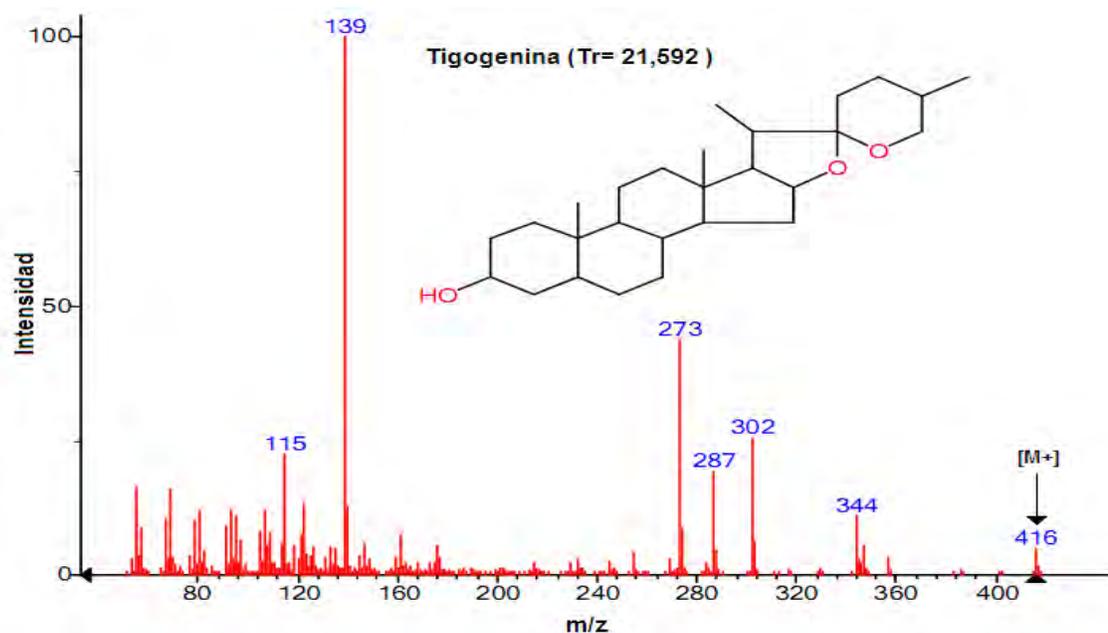
Pico	TR	Sustancia	% Relativo de Área
1	21,592	Tigogenina	46,16
2	28,050	Hecogenina	51,44

Fuente. Esta investigación. Universidad de Antioquia.

En la tabla 25 se especifican los porcentajes de tigogenina y hecogenina encontrados en la cuantificación mediante CLAE, siendo la proporción de hecogenina mayor que la de tigogenina, igual que en los resultados encontrados para los análisis mediante CG-EM.

Los espectros de masas para los compuestos se indican en las figuras 52 y 54. Las posibles fragmentaciones de tigogenina y hecogenina se muestran en las figuras 53 y 55 respectivamente.

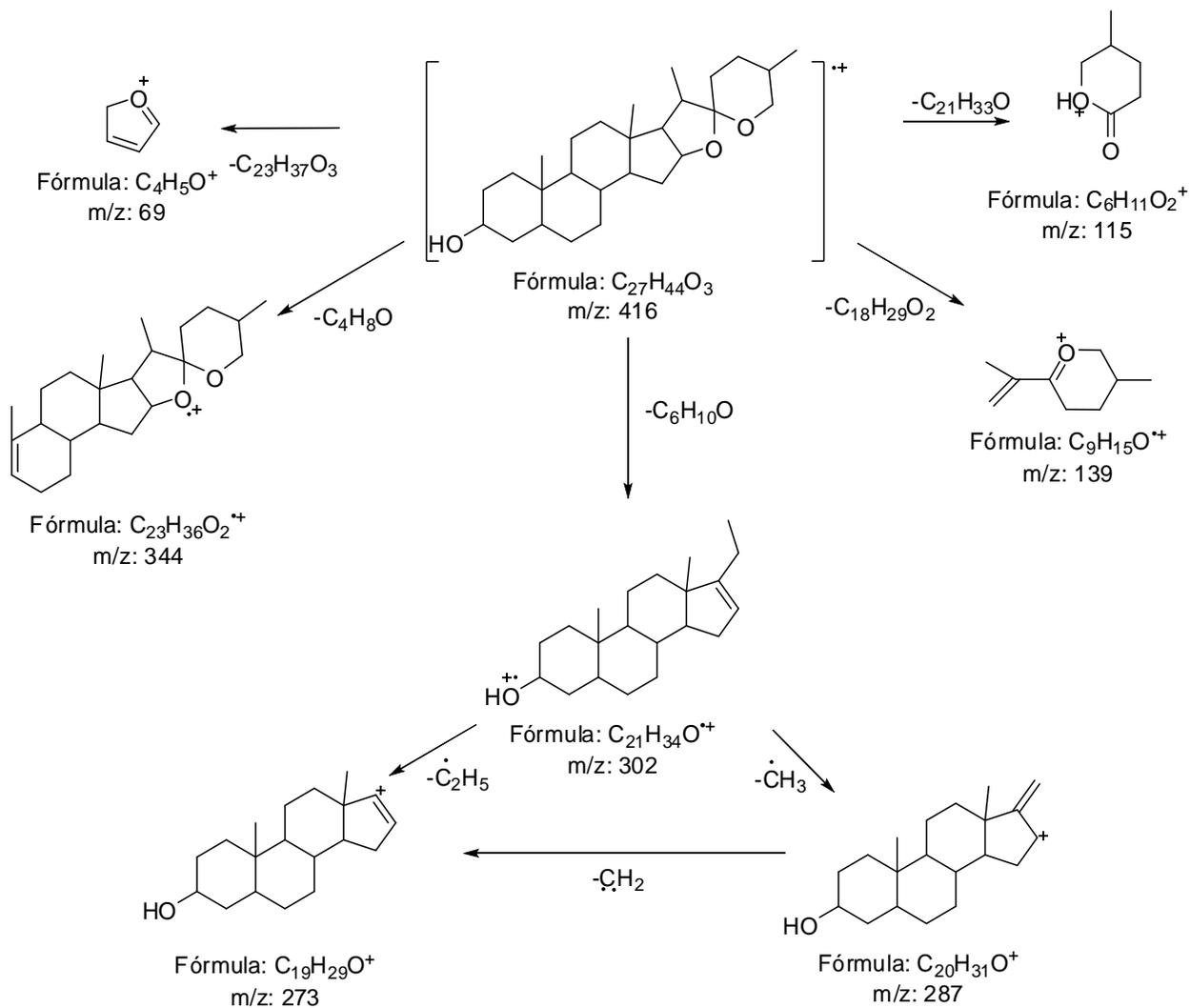
Figura 52. Espectro de masas de tigogenina.



Fuente. Esta investigación. Universidad de Antioquia.

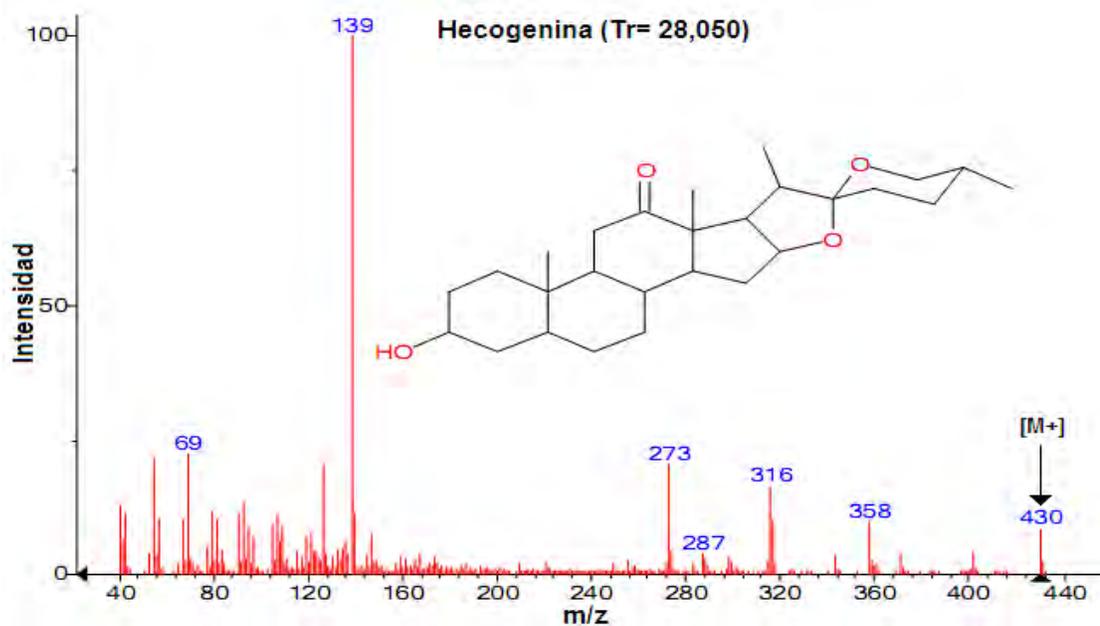
En el espectro de masas de tigogenina se observa el ion molecular a m/z 416 que corresponde a la formula molecular $C_{27}H_{44}O_3$, así como un conjunto de iones m/z: 344 [$M^+ - C_4H_8O$], 302 [$M^+ - C_6H_{10}O_2$], 287 [$M^+ - C_7H_{13}O_2$], 273 [$M^+ - C_8H_{15}O_2$], 139 [$M^+ - C_{18}H_{15}O_2$], 115 [$M^+ - C_{21}H_{33}O$], que son característicos para este tipo de compuestos. (Ver figura 53).

Figura 53. Posibles fragmentaciones de masas de tigogenina.



Fuente. Esta investigación.

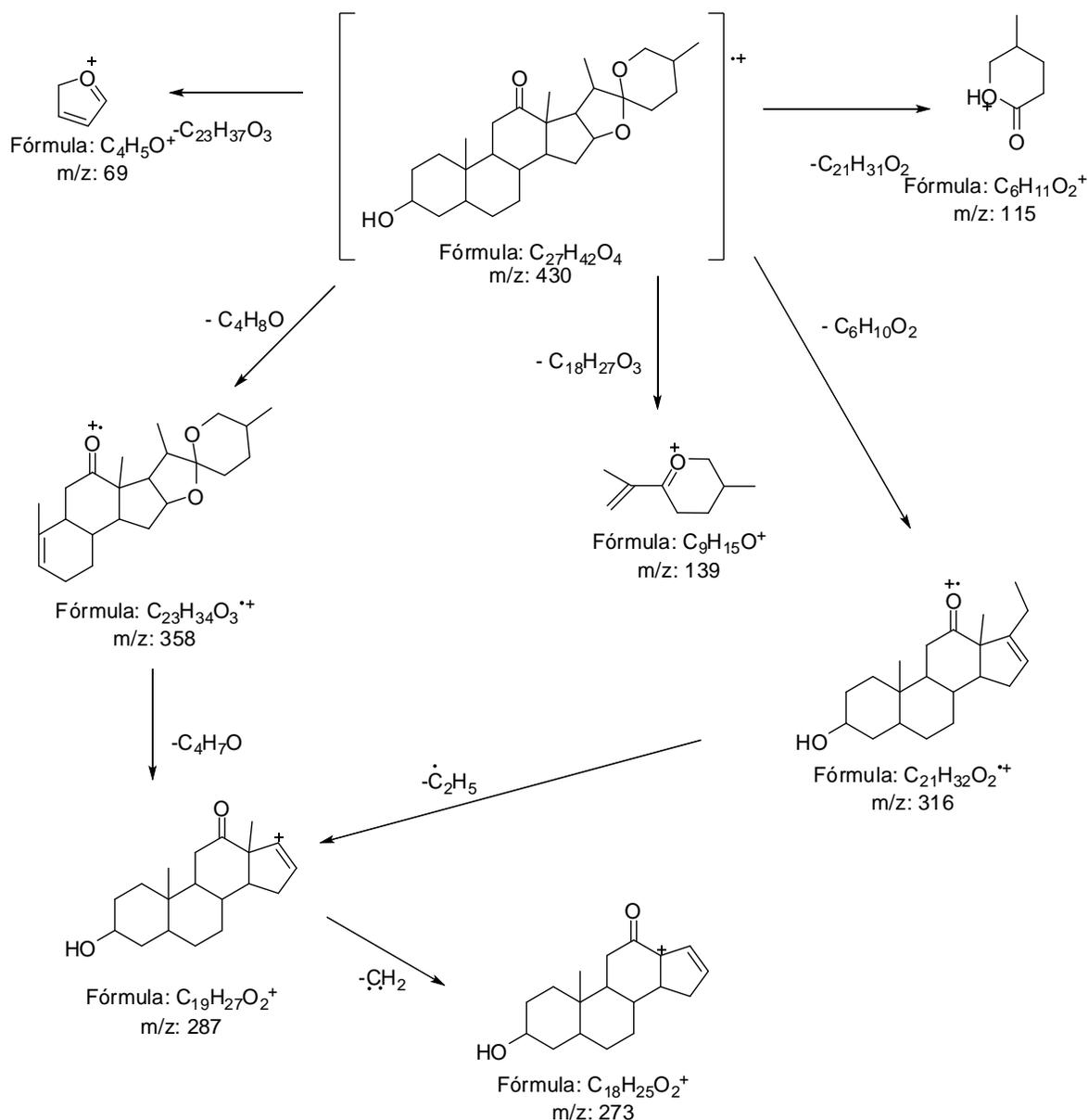
Figura 54. Espectro de masas de hecogenina.



Fuente. Esta investigación. Universidad de Antioquia.

En el espectro de masas de hecogenina (Figura 54,) se observa el ion molecular $[M^+] = 430$ que corresponde a la formula molecular $C_{27}H_{42}O_{24}$, así como un conjunto de iones m/z : 358 $[M^+ - C_4H_8O]$, 316 $[M^+ - C_6H_{10}O_2]$, 287 $[M^+ - C_8H_{15}O_2]$, 273 $[M^+ - C_9H_{17}O_2]$, 139 $[M^+ - C_{18}H_{27}O_3]$ y 69 $[M^+ - C_{24}H_{37}O_3]$, que son característicos para este tipo de compuestos. (Ver figura 55).

Figura 55. Posibles fragmentaciones de masas de hecogenina.

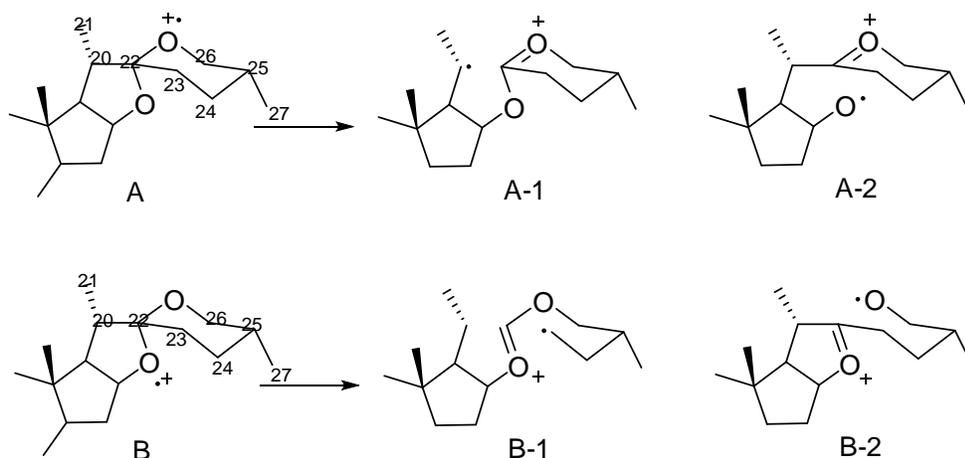


Fuente. Esta investigación.

Los estirostanos siguen un patrón de fragmentación en el que el sistema estiro es el que origina todos los fragmentos importantes, ya sea portando la carga o eliminándose como un fragmento neutro. En el caso específico de las sapogeninas, se puede considerar que en el ion molecular la carga se localiza sobre uno de los átomos de oxígeno del sistema estiro (ver figura 56 A y B), las

cuales pueden fragmentarse originando los iones oxonio (ver figura 56 A-1, A-2, B-1 y B-2)¹⁵⁴.

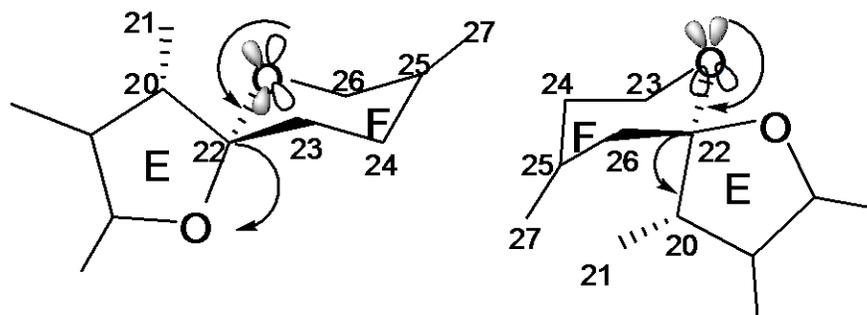
Figura 56. Fragmentación del ion molecular.



Fuente. ORESTES, J. 1984.

La formación de A-1 está favorecida por la existencia de un efecto estereoelectrónico en el cual, un orbital p del oxígeno F que está situado en posición antiperiplanar respecto al enlace $C_{20}-C_{22}$, asiste a su ruptura. Cuando el anillo F invierte su conformación, el otro orbital p de oxígeno F se sitúa en posición anti, respecto al enlace C_{22} -oxígeno E con lo que se favorece la formación de A-2 (ver figura 57). Un análisis similar puede realizarse con el ion molecular B¹⁵⁵.

Figura 57. Efectos estereoelectrónicos en la fragmentación del ion molecular.



Fuente. ORESTES, J. 1984.

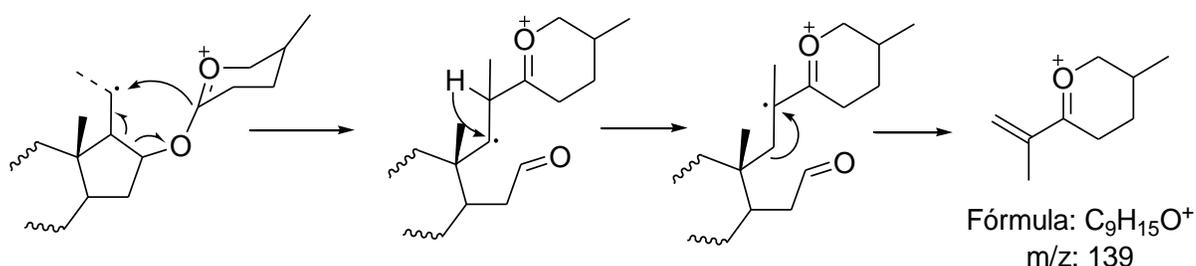
¹⁵⁴ ORESTES, J. Op. Cit., p. 2.

¹⁵⁵ *Ibíd.*, p. 2.

Las saponinas esteroidales como la diosgenina, hecogenina, tigogenina, sarsapogenina y deoxitigogenina presentan espectros de masas a 70 ev, en los cuales pueden apreciarse el ion molecular y los fragmentos m/z: 115 y 139, siendo alguno de estos, el pico base del espectro.

Las saponinas esteroides exhiben en su patrón de fragmentación el ion 139 (ver figura 58), que es característico del núcleo químico presente en un gran número de compuestos entre los que se encuentran la diosgenina, hecogenina, tigogenina, sarsapogenina y deoxitigogenina¹⁵⁶.

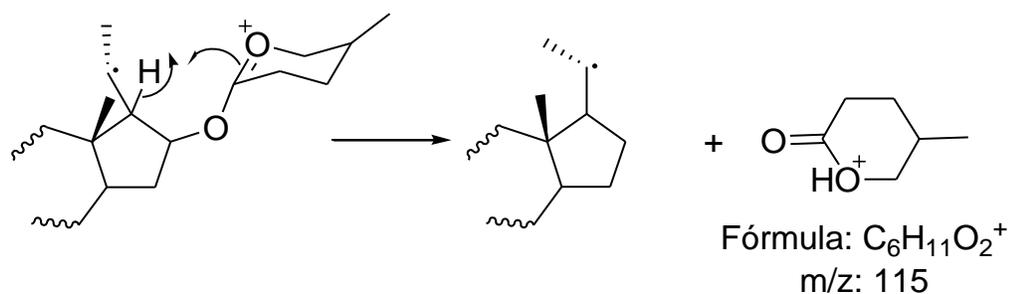
Figura 58. Mecanismo de fragmentación de las saponinas para dar la señal en m/z 139.



Fuente. Martínez, A. Saponinas esteroides. 2001.

La otra fragmentación importante conduce a una señal en m/z 115 (Ver figura 59)¹⁵⁷.

Figura 59. Mecanismo de fragmentación de las saponinas para dar la señal en m/z 115.



Fuente. ORESTES, J. 1984.

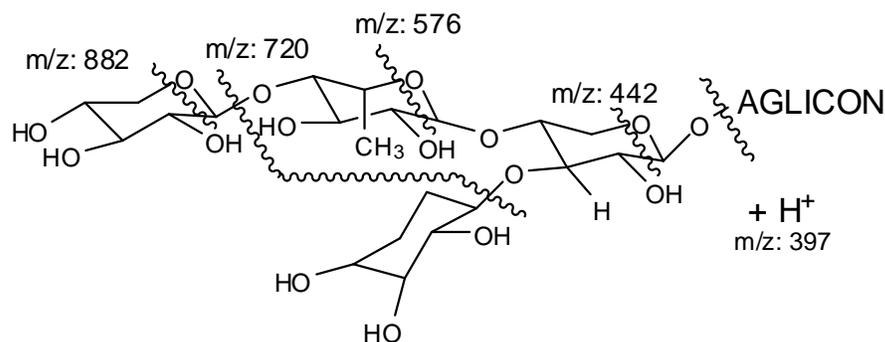
En ocasiones en los espectros de masa ordinarios hay señales que no se observan o aparecen con muy baja intensidad, lo que dificulta su identificación.

¹⁵⁶ MARTÍNEZ, A. Las saponinas. Op. Cit., p. 4.

¹⁵⁷ ORESTES, J. Op. Cit., p. 4, 5.

Actualmente, en muchos trabajos donde se reportan la caracterización de glicósidos, se emplea la ionización por bombardeo rápido de átomos (FAB-EM). Investigaciones donde se identificaron glicósidos en las raíces de *Solanum incanum* utilizando la técnica FAB-EM (modo positivo) se detectó un pico a m/z 986 que asignaron a $[M+H]^+$ y otros picos significativos a m/z 882 $[M-\text{Pentosa}+\text{CHO}]^+$, 72 $[m/z\ 882-\text{Pentosa}-\text{CHO}]^+$, 576 $[m/z\ 720-\text{Deoxihexosa}+\text{CHO}]^+$, 442 $[m/z\ 576-\text{Pentosa}]^+$ y 397 $[\text{Aglicón}+H]^+$, con lo cual se propuso la fragmentación de la figura 60.

Figura 60. Fragmentación de un glicósido.



Fuente. ORESTES, J. 1984.

4.4 CUANTIFICACIÓN DE SAPOGENINAS POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE).

La cantidad de jugo de fique fresco de la especie Negra Común liofilizado fue de 2 litros (densidad 1,027 g/mL). Se obtuvo 81,9 g de material seco. De estos se analizaron 15 g de liofilizado, con los cuales se realizó la extracción de saponinas y la posterior hidrólisis para obtener sapogeninas. Finalmente se obtuvieron 4,1 mg de sapogeninas recristalizadas para un rendimiento del 24,39 %. (Ver tabla 19).

Se cuantificó las sapogeninas identificadas, con el equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), mediante el método del estándar externo. Se cuantificó la tigogenina como ácido oleanólico y la hecogenina como acetato de hecogenina.

Para la curva de calibración (área vs concentración), en la cuantificación de tigogenina, se utilizó un estándar de ácido oleanólico (ver datos en anexo B), con una correlación (R^2) igual a 0,99791, garantizando la linealidad del método. (Ver gráfica 1).

Tabla 19. Pesos del jugo de fique liofilizado de la especie Negra Común, para el análisis cuantitativo.

	Cantidad
Total jugo fresco (Kg)	2,05
Total de jugo liofilizado (g)	81,9
jugo liofilizado analizados (g)	15
Sapogeninas recristalizado (g)	1,299
Crudo de sapogeninas recristalizadas (g)	0,0041 g

Fuente. Esta investigación.

Del barrido realizado para los estándares se encontró que la máxima absorbancia del ácido oleanólico es a 203 nm y del acetato de hecogenina es a 235 nm. Para las muestras se encontró un primer pico a 235 nm y el segundo a 203nm (ver tabla 20).

Tabla 20. Longitudes de onda de los estándares utilizados y las muestras¹⁵⁸.

Ácido Oleanólico	203 nm	Acetato de hecogenina	235 nm
Tigogenina	203 nm	Hecogenina	235 nm

Fuente. Esta investigación.

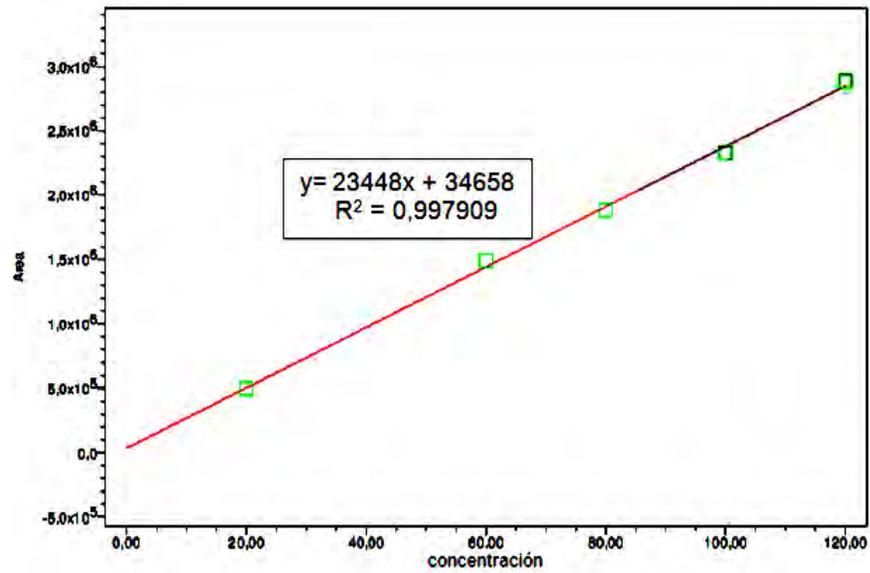
Según las longitudes, de onda se realizó la cuantificación de hecogenina y tigogenina de manera equivalente a los patrones de acetato de hecogenina y ácido oleanólico respectivamente. De esta manera, se logró realizar la cuantificación por CLAE, expresando las concentraciones de sapogeninas en acetato de hecogenina y ácido oleanólico, demostrando linealidad, determinada por la curva de calibración¹⁵⁹.

Para la realización de la curva de calibración (ver gráfica 1), se realizaron diferentes inyecciones del estándar a las concentraciones especificadas en el numeral 3.9, tabla 10. De estas inyecciones se escogió la realizada a 60 ppm para determinar la repetibilidad del método. (Ver figura 61 y tabla 21).

¹⁵⁸ GNOATTO, S. *Et al.* Op. Cit., p. 724.

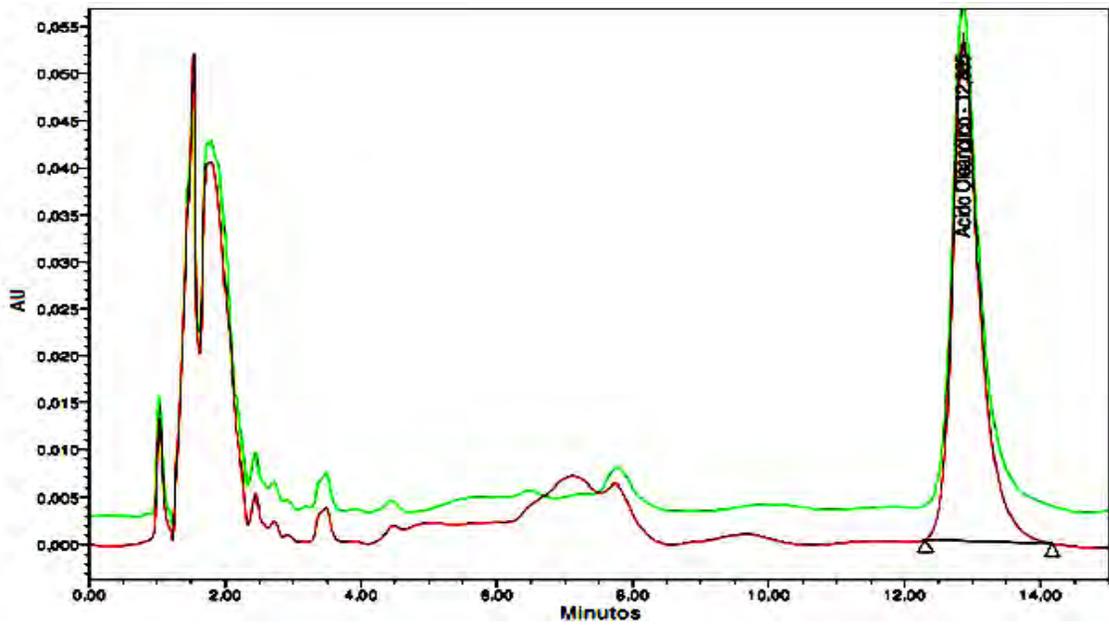
¹⁵⁹ *Ibíd.*, p. 724.

Gráfica 1. Curva de calibración para ácido oleanólico a 203 nm.



Fuente. Esta investigación.

Figura 61. Repetibilidad del ácido oleanólico a 203 nm.



Fuente. Esta investigación.

Tabla 21. Resultados de repetibilidad para ácido oleanólico a 203 nm.

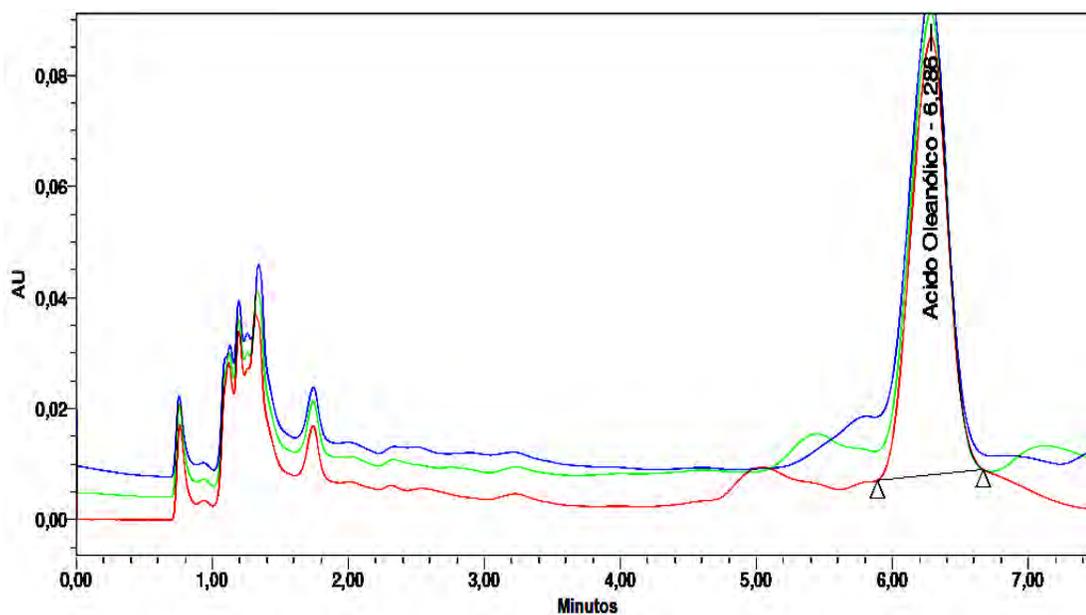
Inyección	Nombre de la muestra	Concentración (ppm)	Tiempo de retención (TR)	Área	% área	Cantidad (ppm)
1	Ácido oleanólico	60	12,865	1487874	100	60
2	Ácido oleanólico	60	12,865	1487511	100	60
Promedio			12,865	1487692,5		
Desviación estándar			0	256,7		
CV			0	0,0		

Fuente. Esta investigación.

Con los datos de la tabla 21, se pudo concluir que el método es preciso debido a las bajas desviaciones estándares y coeficientes de variación en el área.

La figura 62, muestra el cromatograma y la tabla 22 los datos de la muestra JL1T a 203 nm, para la cuantificación del analito como ácido oleanólico.

Figura 62. Cromatograma de la muestra JL1T a 203 nm cuantificada como ácido oleanólico.



Fuente. Esta investigación.

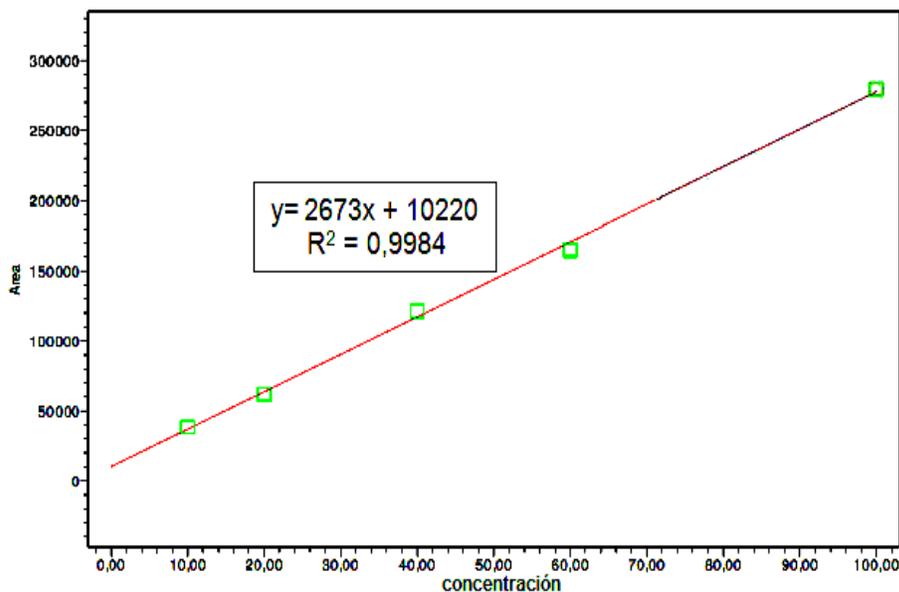
Tabla 22. Datos del cromatograma de la muestra JL1T a 203 nm.

Inyección	Nombre de la muestra	Tiempo de retención (TR)	Área	% área	Altura	Cantidad (ppm)
1	Ácido oleanólico	6,286	1477974	100	78691	61,934
2	Ácido oleanólico	6,283	1479682	100	80194	62,008
3	Ácido oleanólico	6,281	1471232	100	79656	61,645
Promedio		6,283	1476296		79513,7	61,862
Desviación estándar		0,003	4467,9		761,5	0,192
CV		0,04	0,3		1,0	0,31

Fuente. Esta investigación.

Para la curva de calibración (área vs concentración) en la cuantificación de hecogenina, se utilizó un estándar de acetato de hecogenina (ver datos en anexo C), con una correlación (R^2) igual a 0,9984, garantizando la linealidad del método. (Ver gráfica 2).

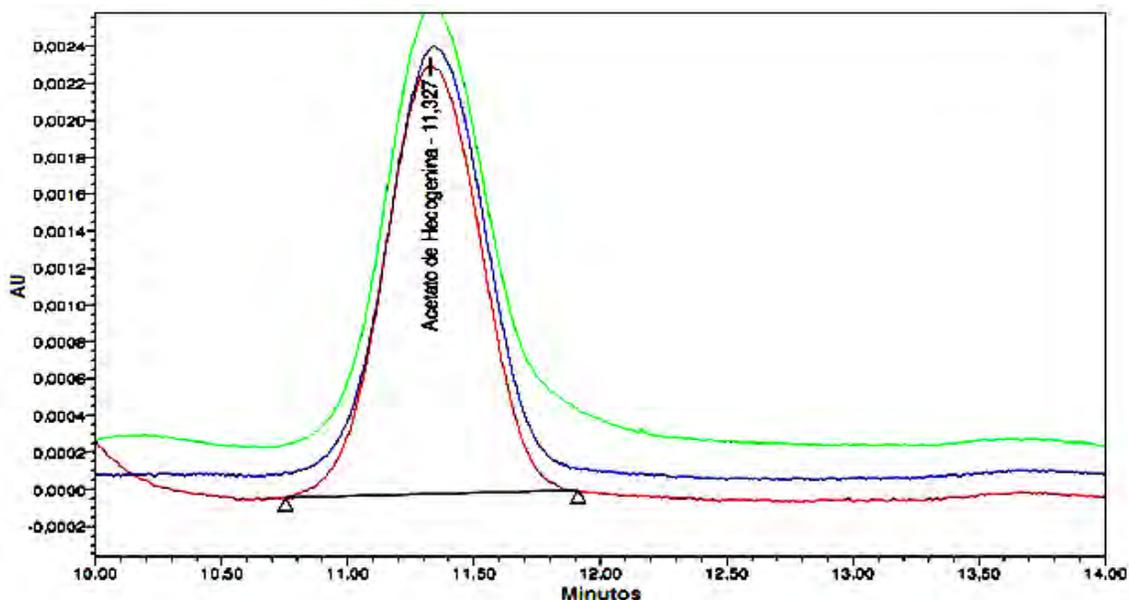
Gráfica 2. Curva de calibración para acetato de hecogenina a 235nm.



Fuente. Esta investigación.

Se realizaron 3 inyecciones del estándar para realizar la repetitividad del método. (Ver figura 63 y tabla 23).

Figura 63. Repetibilidad estándar acetato de hecogenina a 235 nm.



Fuente. Esta investigación.

Tabla 23. Datos de la repetibilidad estándar para acetato de hecogenina a 235 nm.

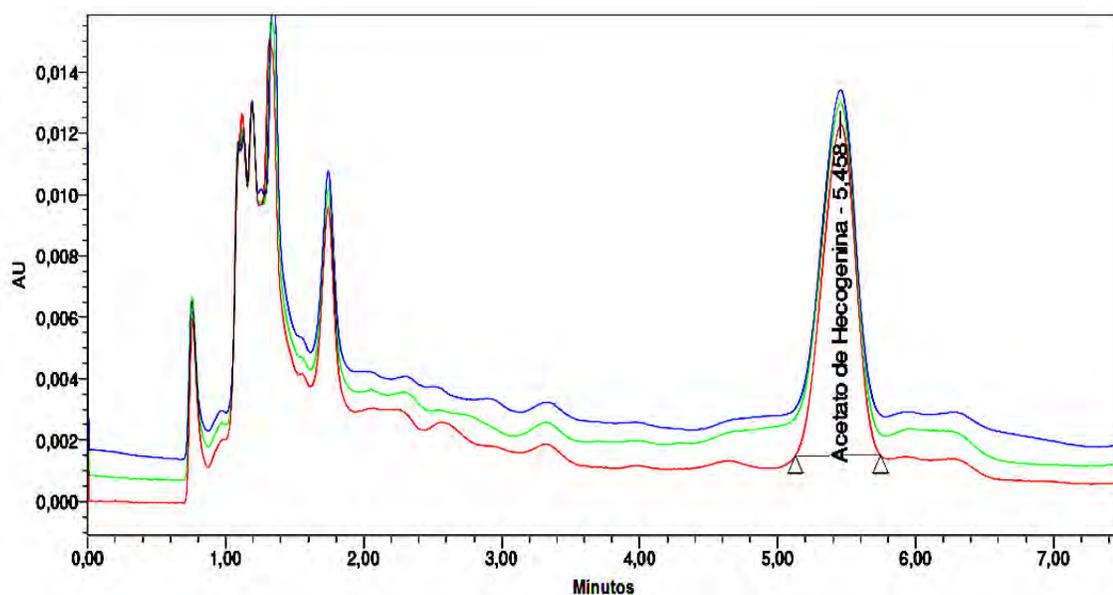
Inyección	Nombre de la muestra	Concentración (ppm)	Tiempo de retención (TR)	área	% área	Cantidad (ppm)
1	acetato de hecogenina	20	11,337	61280	100	20
2	acetato de hecogenina	20	11,327	61293	100	20
3	acetato de hecogenina	20	11,348	61374	100	20
Promedio			11,337	61315,7		
Desviación estándar			0,011	50,9		
CV (%)			0,1	0,1		

Fuente. Esta investigación.

Con los datos de la tabla 23, se pudo concluir que el método es preciso debido a las bajas desviaciones estándares y coeficientes de variación en el área (50,9 y 0,1 respectivamente).

La figura 64, muestra el cromatograma y la tabla 24 los datos de la muestra JL1T a 235 nm, para la cuantificación del analito como acetato de hecogenina.

Figura 64. Cromatograma de la muestra JL1T a 235 nm cuantificada como acetato de hecogenina.



Fuente. Esta investigación.

Tabla 24. Datos del cromatograma de la muestra JL1T a 235 nm.

Inyección	Nombre de la muestra	Tiempo de retención (TR)	Área	% área	Altura	Cantidad (ppm)
1	acetato de hecogenina	5,458	178963	100	10781	63,131
2	acetato de hecogenina	5,456	178448	100	10667	62,938
3	acetato de hecogenina	5,456	177317	100	10625	62,515
Promedio		5,457	178242,7		10691	62,861
Desviación estándar		0,001	842,0		80,7	0,3
CV		0,0	0,5		0,8	0,5

Fuente. Esta investigación.

Esta cuantificación fue posible debido a que los estándares presentaron absorción a la longitud de onda máxima para cada metabolito (203 nm para tigogenina y 235 nm para hecogenina). También hay que resaltar que es una cuantificación indirecta, es por eso que los tiempos de retención, en las mismas condiciones, no son iguales entre el estándar y el metabolito, por lo tanto, es importante la previa identificación, en este caso se la hizo con cromatografía de gases acoplada a

espectrometría de masas, pero es válida ya que las cuatro sustancias tienen el mismo núcleo esteroide básico¹⁶⁰.

La tabla 25, muestra la correlación que existe entre tigogenina y hecogenina.

Tabla 25. Correlación entre tigogenina y hecogenina expresados como ácido oleanólico y acetato de hecogenina respectivamente.

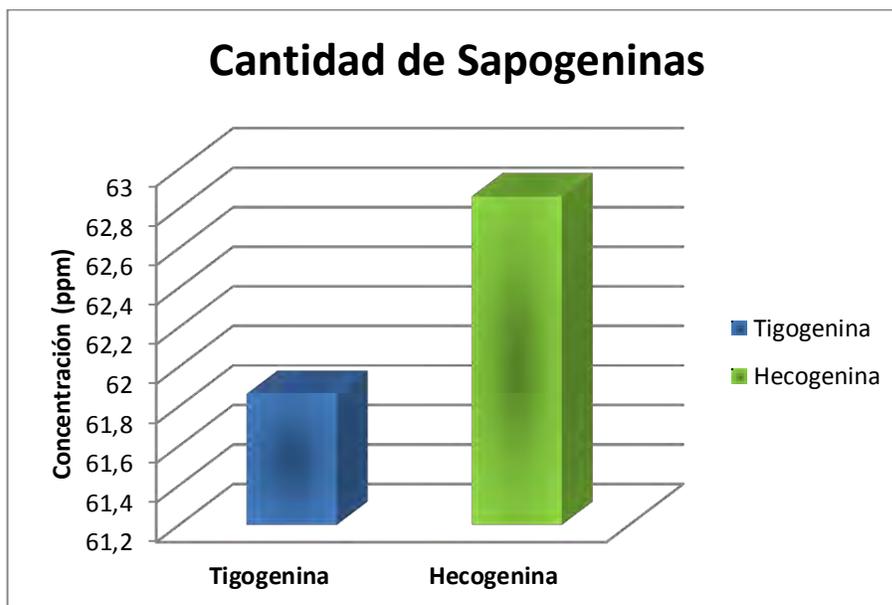
	Tigogenina	Hecogenina
Porcentaje	49,60%	50,40%
Cantidad cuantificada (mg/L)	61,862	62,861
Dilución (mL)	5	5
Cantidad total encontrada (mg)	0,309	0,314
Concentración de sapogeninas crudas (mg/g)	0,619	0,629
Contenido en el jugo recristalizado (mg)	0,804	0,817
Contenido total en el jugo liofilizado (mg/g)	0,054	0,055
Contenido total en el jugo liofilizado (mg)	4,389	4,460
Contenido en jugo fresco (mg/Kg) ppm	2,195	2,230
Contenido en jugo fresco (mg/L) ppm	2,254	2,290

Fuente. Esta investigación.

Según la tabla 25 y la gráfica 3, se puede observar que la diferencia entre las sapogeninas no es muy significativa, por lo que se podría decir que están en igual concentración. (Ver anexo E).

¹⁶⁰ GNOATTO, S. Op. Cit., p. 723.

Gráfica 3. Concentración de hecogenina y tigogenina en la muestra.



Fuente. Esta investigación.

Al no detectar más sapogeninas y/o saponinas en el jugo de fique de la especie Negra Común del Municipio de El Tambo (*Furcraea gigantea*), por los métodos de CLAE y CG-EM, se puede decir que la concentración total de estos compuestos en esta planta es de 124,723 ppm. Teniendo en cuenta que este análisis se lo realizó en jugo fresco liofilizado, la concentración de estos compuestos es relativamente pequeña, respecto a la encontrada por Gnoatto en la yerba mate (*Ilex paraguariensis*)¹⁶¹, la cual correspondía a 352 ppm. Se recomienda realizar un análisis del jugo en distintas etapas de fermentación para poder determinar la cantidad máxima, tanto en esta especie como en la Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*), ya que cuando el jugo de fique se somete a procesos de fermentación, el precipitado de las geninas hidrolizadas parcialmente se deposita en el fondo del recipiente constituyendo este procedimiento una manera natural de concentrar el material que contiene sapogeninas. Este depósito representa cerca de 1/7 del volumen original del jugo y contiene cerca del 80% de las sapogeninas originalmente presentes. El 20% restante está entre el sobrenadante que generalmente se desecha¹⁶².

La técnica de CLAE es la más usada para la determinación de saponinas y sapogeninas. Sin embargo, la falta de cromóforos que permite la detección en UV, limita la elección del gradiente y detección del método¹⁶³.

¹⁶¹ GNOATTO, S. Op. Cit., p. 723.

¹⁶² SHARAPIN, Op. Cit., p. 96.

¹⁶³ OLESZEK, W. Op. Cit. p. 147–162.

CONCLUSIONES

Se evidenció la presencia de algunos metabolitos secundarios como flavonoides, alcaloides, cumarinas, esteroides, saponinas, taninos y glicósidos cardiotónicos en el jugo de fique de las especies Negra Común (*Furcraea gigantea*) y Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*) provenientes de los Municipios de El Tambo y Guaitarilla.

Se determinó una variabilidad en la presencia de metabolitos secundarios como las quinonas, según el estado de fermentación de la muestra, ya que únicamente están presentes en el jugo de fique fresco de las especies Negra Común (1G y 1T) y Uña de Águila (2G y 2T) de los Municipios de Guaitarilla y de El Tambo. No se encontraron quinonas en el jugo fermentado de las especies Negra Común (1FT y 1FG) y Uña de Águila (2FT y 2FG) de los Municipios de Guaitarilla y de El Tambo.

Los resultados del análisis fitoquímico de flavonoides y alcaloides en las muestras del Municipio de El Tambo, fueron más confiables que en las muestras de Guaitarilla, por la coloración presentada en las pruebas.

El efecto de la fermentación de las muestras del jugo, incide en la identificación de los metabolitos secundarios como los alcaloides, debido a la volatilidad que los mismos presentan. Sin embargo no se encontraron variabilidades marcadas entre las especies analizadas de los Municipios de El Tambo y Guaitarilla.

Se identificaron por método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), la hecogenina y tigogenina del jugo fresco liofilizado de la especie Negra Común del Municipio de El Tambo; así mismo se cuantificaron por CLAE-DAD, estas sapogeninas resultando 62,861 ppm y 61,962 ppm respectivamente y al no encontrarse más sapogeninas en el jugo de fique, se puede decir que la hecogenina y tigogenina están, relativamente, en igual concentración.

Las pruebas más relevantes donde se puede observar la variabilidad entre especies se encuentra en flavonoides, taninos y alcaloides.

La variabilidad química general encontrada puede ser debida a cambios agroclimáticos como nutrientes presentes en el suelo, el agua que se encuentra en la raíz, las plagas y enfermedades de la planta, lo que causa que los metabolitos secundarios se encuentren en mayor o menor proporción.

RECOMENDACIONES

Debido a que el trabajo desarrollado hace parte de un macroproyecto con enfoque social, permite dar a conocer la composición química del jugo de fique de dos especies ampliamente cultivadas en el departamento de Nariño y en dos Municipios principales productores de la fibra, aportando información de metabolitos que pueden tener importancia comercial e industrial, debido a que el jugo de fique es un desecho de la producción de la fibra, siendo este nocivo para las fuentes hídricas principalmente y abriendo campo a la investigación se debe:

Realizar la extracción de cada una de los metabolitos secundarios presentes en el jugo de fique fresco y fermentado de las especies Negra Común (*Furcraea gigantea*) y Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*), provenientes de los Municipios de El Tambo y Guaitarilla, para realizar un análisis cuantitativo y su identificación.

Elaborar un diseño experimental con el fin de determinar de forma conceptual las variables significativas que inciden en el contenido de hecogenina y tigogenina en el jugo de fique.

APORTES A LA CIENCIA Y LA SOCIEDAD

El trabajo de Investigación que se realizó, tiene un gran impacto a nivel social e investigativo, ya que los resultados obtenidos indican la presencia de diferentes familias de metabolitos secundarios, los cuales tienen gran interés farmacológico, y los cuales pueden ser identificados y extraídos con fines industriales y farmacéuticos.

Además, el precedente que se deja, es que teniendo en cuenta que Nariño es un sector productor de fique por excelencia, se plantea el mejoramiento en el método de purificación y extracción de metabolitos secundarios de tipo sapogenina, y con esto, contribuir a que el sector fiquero aproveche estos subproductos del beneficio de la fibra de fique, disminuyendo el impacto ambiental y aumentando los ingresos de quienes subsisten de esta práctica.

El método de cuantificación por CLAE fue el primero realizado de este tipo en la Universidad de Nariño, contando con el equipo Waters 1525 que fue adquirido a raíz del macroproyecto, lo cual es de gran importancia y deja un gran interés en la comunidad educativa para incentivar la investigación desde este ámbito.

BIBLIOGRAFÍA

ARANGO, G. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Facultad de química farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín, 2008. 84. p.

ARROYAVE, P y VELÁSQUEZ, D. Aprovechamiento integral de *Furcraea macrophylla* Backer. Medellín: Universidad EAFIT. Departamento de Ingeniería de Procesos. 2000.

BARBOSA, E. Evaluación de la calidad de jugo de fique en la obtención de hecogenina y análisis fitoquímico del extracto heptánico del jugo hidrolizado de *Furcraea macrophylla*, variedad Negra Común. Bogotá, 2002. p. 7. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad Nacional. Facultad de Ciencias. Departamento de Química.

BILBAO, M. Análisis Fitoquímico Preliminar. Química de Productos Naturales.. Universidad del Quindío. Facultad de Ciencias Básicas y Tecnológicas. Programa de Química de Productos Vegetales. Armenia, 1997. 181. p.

CAMARGO, S. Identificación de hecogenina del jugo de fique de la especie *Furcraea macrophylla* (Uña de águila) obtenido mediante cultivo de bulbos semi-esteriles como alternativa agroindustrial eficiente para el sector figuero de Boyacá. En: Congreso Colombiano de Química y VI Congreso Colombiano de Cromatografía. (16: 27 de septiembre – 1 de octubre, 2010: Cartagena, Colombia).Memorias. Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia en Tunja, 2010.

CAMPO, Y. Evaluación de la actividad Antioxidante del jugo de fique (*Furcraea spp*). En: Congreso Colombiano de Química y VI Congreso Colombiano de Cromatografía (16: 27 de septiembre – 1 de octubre, 2010: Cartagena, Colombia).Memorias. Grupo de Investigación en Química de Compuestos Bioactivos de la Universidad del Cauca, 2010.

CLEMENT, B. Organic Chemistry Laboratory Manual. Texas A&M University, USA, 2002. 26. p.

CASTELLANOS, O. *et al.* Agenda de prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de fique en Colombia. Bogotá D.C. Proyecto Transición de la Agricultura. Universidad Nacional de Colombia. Grupo de investigación y desarrollo en gestión, productividad y competitividad Bio - Gestión 2009.

COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO Y TERRITORIAL GUÍA AMBIENTAL DEL SECTOR FIQUERO. Cadena productiva Nacional del Fique – CADEFIQUE. Bogotá, 2006. 122. p.

COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA, DESARROLLO TERRITORIAL Y MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Guía ambiental del sector fiquero. Segunda Edición. Departamento Nacional de Planeación, Bogotá, 2005. 222. p.

COMPAÑÍA DE EMPAQUES S.A., CORANTIOQUIA., ALCALDÍA DE BARBOSA. y COMITÉ DE FIQUEROS DE BARBOSA. Manual de Buenas Prácticas para el cultivo y beneficio del Fique. Medellín. 2004..

CORPONARIÑO, Esquema de ordenamiento territorial departamento de Nariño Municipio de Guaitarilla, documento técnico II fundación Nariño 2000.

CORPONARIÑO. Esquema de ordenamiento territorial departamento de Nariño Municipio de El Tambo. Documento Técnico II Fundación Nariño 2000.

DELPORTE, Carla. Farmacognosia. Departamento de ciencias químicas y farmacéuticas. Universidad de Chile.

DEWICK, P, Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach, second edition, John Wiley & Sons Inc, 2002. 515. p.

DOMÍNGUEZ, X. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México. 1973. 281. p.

DUQUE, J y GONZALEZ, L. Propuesta tecnológica para la producción de un agente tensoactivo biodegradable a partir del jugo del fique como desecho del proceso de desfibrado. Medellín, Universidad Pontificia Bolivariana de Facultad de Ingeniería Química. 1999.

ECOFIBRAS LTDA. & PADEMER FASE I y II (MADR). Proyecto de Tecnificación del Cultivo del Fique, Descontaminación de las Fuentes de Agua y Apoyo al Desarrollo Artesanal a través de Ecofibras en los municipios de Curití, Onzaga, San Joaquín, Mogotes y Aratoca, Años 2002-2004.

FERNÁNDEZ, L. Fitoquímica del *Agave salmiana*. Trabajo de grado. México, Puebla.: Universidad de Las Américas. Escuela de Ciencias. Departamento de Química y Biología. 2005.

GNOATTO S, SCHENKEL P, BASSANI V. HPLC Method to Assay Total Saponins in *Ilex paraguariensis* Aqueous Extract. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, J.

Braz. Chem. Soc., Vol. 16, No. 4, 723-726, Brasil, 2005.

GÓMEZ, J. Evaluación del extracto de fique en el desarrollo in-vitro de *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz) Penz & Sacc. Y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Corpoica, Popayán, 2001.

GÓMEZ, M y VANEGAS, E. Evaluación de la producción de esteroides a partir del jugo de fique con *Cunninghamella spp.*, Trabajo de Grado (Ingeniero Químico). Medellín. Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín Facultad de Ingeniería Química. 2001.

HAMILTON, R. HAMILTON, S. Thin Layer Chromatography. New York: Wiley, 1987.

HARBONE, J. Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman & Hall. USA 1998. 112. p.

HARRIS, D. Análisis Químico Cuantitativo, Segunda Edición. Editorial Reverté S.A. 2001. 981. p.

HERNÁNDEZ, R. LUGO, E. DÍAZ, L. VILLANUEVA, S. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de Agave Lechuguilla Torrey. Universidad de Guadalajara. Revista digital, científica y tecnológica e-Gnosis. (versión online): 1665-5745 www. e-gnosis.udg.mx, México. 2005.13 p. 2005, e- Gnosos (online), Vol, 3, Art. 11.

KURT B. G. Torssell, Natural Product Chemistry, second Edition, Sweden : Apotekarsocieten. 1997. 458. p.

LOPEZ, E. Estudio Fitoquímico y aproximación genética en especies de la sección Plinthine del género arenaria (*Caryophyllaceae*). Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Departamento de Botánica, Granada, 2007.

MARTÍNEZ A. *Et al*, Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica Universidad de Antioquia facultad de química farmacéutica departamento de farmacia. Medellín, 2008. 96. p.

MARTÍNEZ A. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín 2005. 76. p.

MARTÍNEZ, A y CAICEDO, T. Bioensayo de toxicidad de los jugos de fique en peces, en el Municipio de El Tambo (Nariño). Trabajo de grado en la Especialización de Salud Ambiental. Bogotá D.C.: Universidad el Bosque. 2002. 125. p.

MARTÍNEZ, A. Esteroles. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, 2002. 37. p.

MARTÍNEZ, A. Saponinas Esteroides. Universidad de Antioquia, Facultad de Química, Medellín 2001. 22. p.

MARTÍNEZ, S. *et al*, Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, Universidad de León y Hospital de León, departamento de Fisiología. 17 (6), España 2002. 17 (6). p. 271-278.

Municipio de El Tambo. [Citado en octubre 8 de 2010] Disponible en internet: <http://www.eltambo-narino.gov.co/nuestromunicipio.shtml?apc=mlxx-1-&m=f>

Municipio de Guaitarilla. [citado en octubre 8 de 2010] Disponible en Internet: <http://www.guaitarilla.gov.co/>

MOJICA, A y PAREDES, J. Informe de Coyuntura Económica Regional. Santander. 2003.

MURILLO, E. MÉNDEZ, J. Guía metodológica para detección rápida de algunos núcleos secundarios. Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima, Ibagué, 2007. 25. p.

OBREGÓN, L. En: Agricultura Tropical. N 11. Noviembre, 1965.

OLESZEK W, Chromatographic determination of plant saponins. Journal of Chromatography A. Polonia. 2002.

ORESTES, J. Las saponinas y sapogeninas esteroidales. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba, Santa Clara, 1984..

PRECIADO, D y RANGEL, E. Extracción de un biofunguicida a partir del jugo de fique (*Furcraea spp*), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Pontificia Bolivariana, 2006.

QUATTROCCHI, O. ANDRIZZI, S. LABA, R. Introducción a la HPLC. Capítulo 10 Análisis Cuantitativo. Laboratorios Dr Gador, Buenos Aires, Argentina, 1992. 405. p.

QUINTELA, O. *et al*. Metodología LC–MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. Instituto de Medicina Legal de Santiago de Compostela. Servicio de Toxicología Forense. 2004.

RAMIREZ, M., *et al*. Aprovechamiento integral del Fique: Usos alternativos y su potencial. Compañía de Empaques. Universidad Pontificia Bolivariana,

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, USAID, Programa MIDAS, ISAGEN, 2010.

ROJAS, M. Caracterización fisicoquímica del jugo de fique (*Furcraea spp.*), elaboración y evaluación de un biofungicida útil en el control agroecológico de la gota (*Phytophthora infestans*) en la papa. San Juan de Pasto. 2008. Trabajo de grado (Ingeniero Agroindustrial). Universidad de Nariño. Facultad de Ingeniería Agroindustrial.

SANABRIA, A. Análisis Fitoquímico Preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia *Compositae*. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. 1983. 113. p.

SEGURA DE CORREA, R. *et. al.* Ácidos grasos presentes en el extracto heptánico del jugo de fique (*Furcraea macrophylla*) variedades Uña de águila y Negra común. MADR, Corpoica & Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Productos Naturales Vegetales. Bogotá. D.C. 2004.

SEGURA DE CORREA, R. *et. al.* Azúcares constituyentes del hidrolizado del jugo de fique (*Furcraea macrophylla*) variedades Uña de águila y Negra común.. MADR, Corpoica & Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Productos Naturales Vegetales. Bogotá. D.C. 2004.

SHARAPIN N. (2000). Sapogeninas esteroidales: Materia prima para la fabricación de hormonas esteroidales. En: Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Pinzón R. Colombia. 247. p.

SKOOG, D. *et al.* Fundamentos de Química Analítica. 8ª Edición. Editorial Thomson 2005. 795. p.

SWADESH, J. HPLC: Practical and Industrial Applications, Second Edition Ed: CRC Press, 2001. 408. p.

TAVA, A., SCOTTI, C., AVATO, P. Biosynthesis of saponins in the genus *Medicago*. *Phytochem Rev* DOI. 10.1007/s 11101-010-9169-x. 2010.

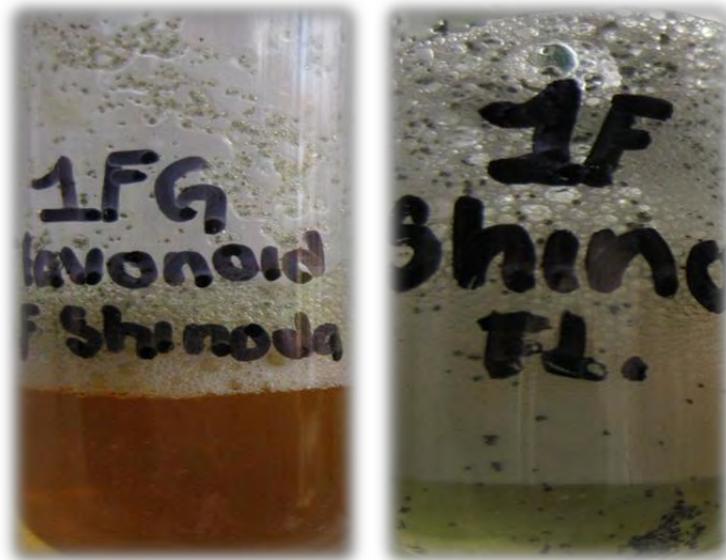
VALENCIA, C. Fundamentos de fitoquímica. Editorial trillas. México. 1995. 235. p.

WATERS, Detector PDA 2996 de Waters *Guía de funcionamiento*. 2009. 42. P.

ANEXO A

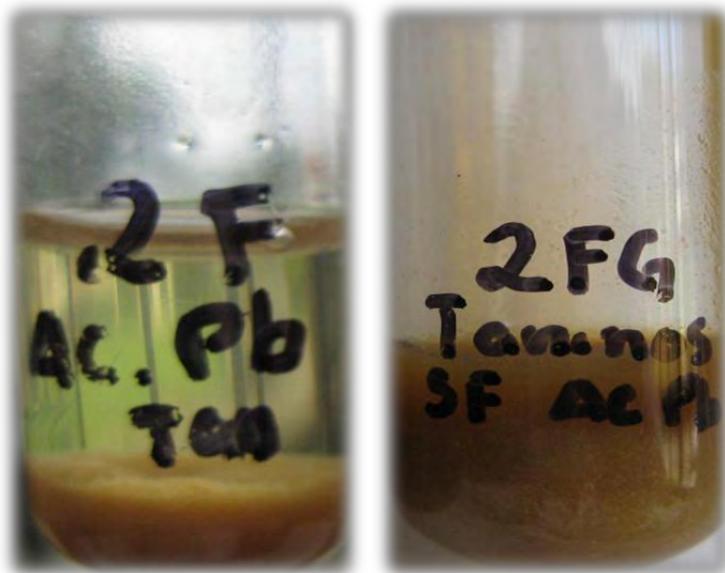
Resultados de las pruebas fitoquímicas colorimétricas realizadas a los extractos frescos y fermentados del jugo de fique de las dos especies (Uña de águila y Negra común) y de los dos Municipios (El Tambo y Guaitarilla). (Ver tabla 13).

Prueba de Shinoda de las muestras 1FG (izquierda) y 1FT (derecha).



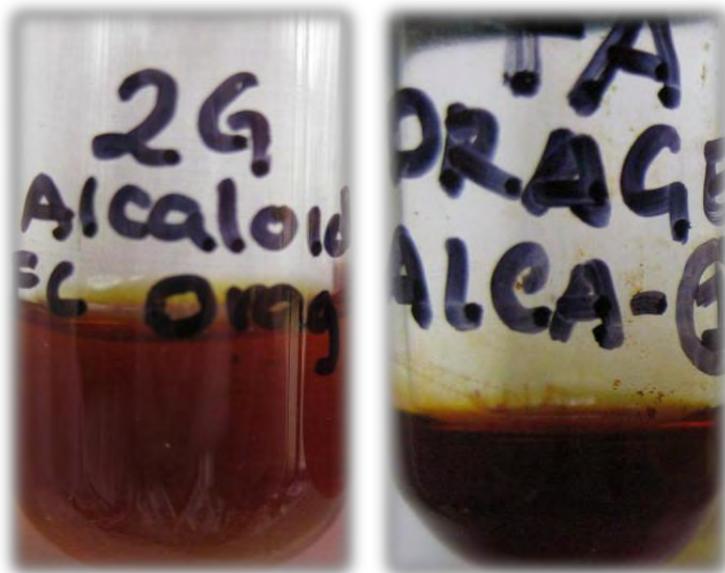
Fuente. Esta investigación.

Prueba de acetato de plomo de las muestras 2FT (izquierda) y 2F (derecha).



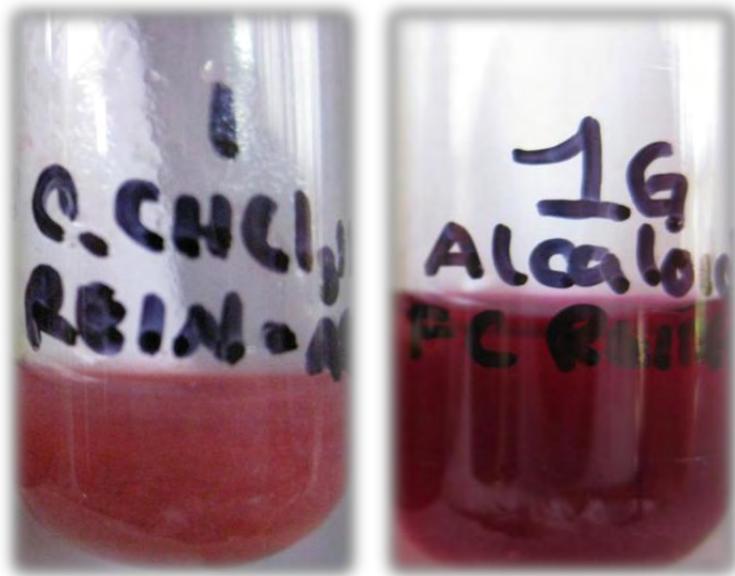
Fuente. Esta investigación.

Prueba de Dragendorff de las muestras 2T (izquierda) y 2G (derecha).



Fuente. Esta investigación.

Prueba de Reineckato de amonio de las muestras 1T (izquierda) y 1G (derecha).



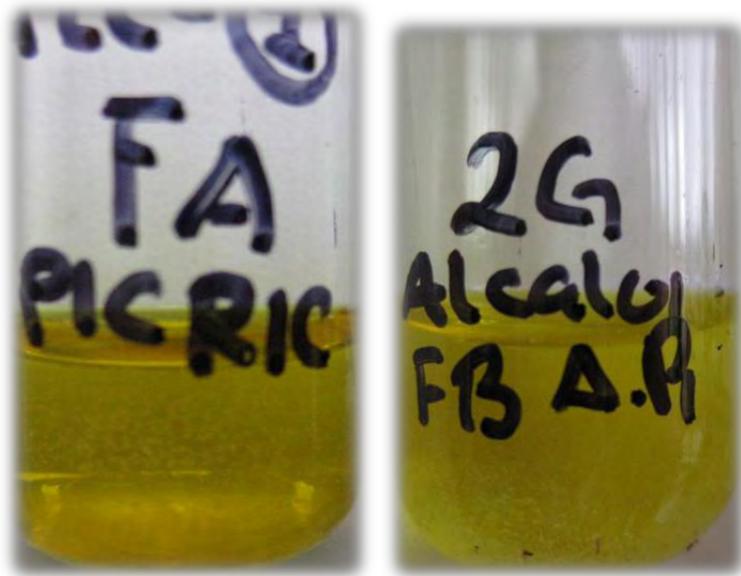
Fuente. Esta investigación.

Prueba de Reineckato de amonio de las muestras 2FT (izquierda) y 2FG (derecha).



Fuente. Esta investigación.

Prueba de Hager de las muestras 2T (izquierda) y 2G (derecha).



Fuente. Esta investigación.

ANEXO B

Datos de la curva de calibración de ácido oleanólico para cuantificar tigogenina como ácido oleanólico.

Datos de la curva de calibración de ácido oleanólico.

	Nombre	Valor teórico	Respuesta	Valor experimental	Porcentaje de desviación (%)
1	Ácido Oleanólico	20,000	496426,270	19,693	-1,534
2	Ácido Oleanólico	20,000	495970,520	19,674	-1,631
3	Ácido Oleanólico	60,000	1487874,104	61,976	3,293
4	Ácido Oleanólico	60,000	1487511,039	61,961	3,268
5	Ácido Oleanólico	80,000	1880226,946	78,709	-1,614
6	Ácido Oleanólico	80,000	1890079,182	79,129	-1,089

Fuente. Esta investigación.

ANEXO C

Datos de la curva de calibración de acetato de hecogenina para cuantificar hecogenina como acetato de hecogenina.

Datos de la curva de calibración de acetato de hecogenina.

	Nombre	Valor teórico	Respuesta	Valor experimental	Porcentaje de desviación (%)
1	Acetato de Hecogenina	10,000	38315,6337	10,511261	5,113
2	Acetato de Hecogenina	10,000	38215,4701	10,473788	4,738
3	Acetato de Hecogenina	20,000	61567,7764	19,210384	-3.948
4	Acetato de Hecogenina	20,000	62223,5458	19,455722	-2,721
5	Acetato de Hecogenina	40,000	120739,696	41,347862	3,37
6	Acetato de Hecogenina	40,000	121743,24	41,723309	4,308

Fuente. Esta investigación.

ANEXO D

Resultados de la marcha fitoquímica cualitativa para el jugo de fique fresco y fermentado de las especies Negra Común y Uña de Águila de los Municipios de El Tambo y Guiatarilla del departamento de Nariño.

Resultados Análisis Jugo Fermentado El Tambo Negra Común.

METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA	HCL 5% FA	Solubles en CHCl ₃ FB	Solubles en CHCl ₃ -EtOH FC	Alcaloides Fenólicos FD	Amonio 4° u óxidos de aminos
RESULTADOS PARA ALCALOIDES	Dragendorff	+	-	+	+	-
	Ehrlich	-	-	-	-	-
	Valsler					
	Reineckato de Amonio	+	-	-	-	-
	Hager	+	+	++	-	-
METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA		RESULTADOS (Color, precipitado)			
FLAVONOIDES	Shinoda		- Sin cambio			
	Rosenhein		+ fase carmesi			
	HCl 10 %		-			
NAFTOQUINONAS Y/O ANTRAQUINONAS	Reacción En medio ácido		-			
	Reacción en medio básico		-			
	Reacción para antraquinonas		-			
	Reacción para naftoquinonas					
TANINOS	FeCl ₃		+ verde tenue			
	Acetato de plomo		++ pp blanco			
	Gelatina-Sal		-			
SAPONINAS	Rosenthaler		-			
	Espuma H ⁺		++			
	Espuma OH ⁻		++			
	Hemólisis		+++ Negro			
ESTEROIDES Y/O TRITERPENOIDES	Fieser		++ pp naranja			
CUMARINAS	Hidroxamato Férrico					
	Fluorescencia		+			
	Eherlich		+			
	Esteroides					
	Baljet		+ naranja			

CARDIOTONICOS	Kedde	- pp blanco
	Keller-Killiani	- pp blanco
	Tollens	
LACTONAS TERPENICAS	Legal	
	Kedde	-
	Tollens	
	Hidroxamato Férrico	

Fuente. Esta investigación.

Resultados Análisis Jugo Fresco El Tambo Negra Común.

METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA	HCL 5% FA	Solubles en CHCl ₃ FB	Solubles en CHCl ₃ -EtOH FC	Alcaloides Fenólicos FD	Amonio 4 ^o u óxidos de aminas
RESULTADOS PARA ALCALOIDES	Dragendorff	+	+	+	+	-
	Ehrlich	+	+	+	+	-
	Valser					
	Reineckato de Amonio	+	++	++	+	-
	Hager	++	+	+	-	-
METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA		RESULTADOS (Color, precipitado)			
FLAVONOIDES	Shinoda		+ amarillo tenue			
	Rosenhein		+ fase carmesi			
	HCl 10 %		-			
NAFTOQUINONAS Y/O ANTRAQUINONAS	Reacción En medio ácido		+ amarillo claro			
	Reacción en medio básico		-			
	Reacción para antraquinonas		-			
	Reacción para naftoquinonas					
TANINOS	FeCl ₃		+ verde tenue			
	Acetato de plomo		+++ pp blanco			
	Gelatina-Sal		-			
SAPONINAS	Rosenthaler		-			
	Espuma H ⁺		+			
	Espuma OH ⁻		++			
	Hemólisis		+++completa			
ESTEROIDES Y/O TRITERPENOIDES	Fieser		++ pp naranja			
CUMARINAS	Hidroxamato Férrico					
	Fluorescencia		+			
	Eherlich		+			

CARDIOTONICOS	Baljet	+ naranja
	Kedde	- naranja intenso
	Keller-Killiani	- pp negro
	Tollens	- pp gris
LACTONAS TERPENICAS	Legal	
	Kedde	-
	Tollens	-
	Hidroxamato Férrico	

Fuente. Esta investigación.

Resultados Análisis Jugo Fresco El Tambo Uña de Águila.

METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA	HCL 5% FA	Solubles en CHCl ₃ FB	Solubles en CHCl ₃ -EtOH FC	Alcaloides Fenólicos FD	Amonio 4º u óxidos de aminas
RESULTADOS PARA ALCALOIDES	Dragendorff	+	+	+	+	-
	Ehrlich	+	+	+	+	-
	Valser					
	Reineckato de Amonio	+	++	++	+	-
	Hager	++	+	+	-	-
METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA					RESULTADOS (Color, precipitado)
FLAVONOIDES	Shinoda	+ amarillo tenue				
	Rosenhein	++ fase carmesi				
	HCl 10 %	-				
NAFTOQUINONAS Y/O ANTRAQUINONAS	Reacción En medio ácido	+ amarillo claro				
	Reacción en medio básico	-				
	Reacción para antraquinonas	-				
	Reacción para naftoquinonas	-				
TANINOS	FeCl ₃	+ verde tenue				
	Acetato de plomo	+++ pp blanco				
	Gelatina-Sal	-				
SAPONINAS	Rosenthaler	-				
	Espuma H ⁺	+				
	Espuma OH ⁻	++				
	Hemólisis	+++completa				
ESTEROIDES Y/O TRITERPENOIDES	Fieser	++ pp naranja				
	Hidroxamato Férrico					

CUMARINAS	Fluorescencia	+
	Eherlich	+
CARDIOTONICOS	Baljet	+ naranja
	Kedde	- naranja intenso
	Keller-Killiani	- pp negro
	Tollens	- pp gris
LACTONAS TERPENICAS	Legal	
	Kedde	-
	Tollens	-
	Hidroxamato Férrico	

Fuente. Esta investigación.

Resultados Análisis Jugo Fermentado El Tambo Uña de Águila.

METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA	HCL 5% FA	Solubles en CHCl ₃ FB	Solubles en CHCl ₃ -EtOH FC	Alcaloides Fenólicos FD	Amonio 4 ^o u óxidos de aminas
RESULTADOS PARA ALCALOIDES	Dragendorff	+	+	++	+	-
	Ehrlich	-	-	-	-	-
	Valsler					
	Reineckato de Amonio	+	-	-	-	-
	Hager	+	-	++	-	-
METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA		RESULTADOS (Color, precipitado)			
FLAVONOIDES	Shinoda		- Sin cambio			
	Rosenhein		+ fase carmesi			
	HCl 10 %		-			
NAFTOQUINONAS Y/O ANTRAQUINONAS	Reacción En medio ácido		-			
	Reacción en medio básico		-			
	Reacción para antraquinonas		-			
	Reacción para naftoquinonas					
TANINOS	FeCl ₃		+ verde tenue			
	Acetato de plomo		+ pp blanco			
	Gelatina-Sal		-			
SAPONINAS	Rosenthaler		-			
	Espuma H ⁺		+			
	Espuma OH ⁻		++			
	Hemólisis		+++ Completa			

ESTEROIDES Y/O TRITERPENOIDES	Fieser	++ pp naranja
CUMARINAS	Hidroxamato Férrico	
	Fluorescencia	+
	Ehrlich	-
CARDIOTONICOS	Esteroides	
	Baljet	+ naranja
	Kedde	- pp blanco
	Keller-Killiani	- pp blanco
	Tollens	
LACTONAS TERPENICAS	Legal	
	Kedde	-
	Tollens	
	Hidroxamato Férrico	

Fuente. Esta investigación.

Resultados Análisis Jugo Fermentado Guaitarilla Uña de Águila.

METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA	HCL 5% FA	Solubles en CHCl ₃ FB	Solubles en CHCl ₃ -EtOH FC	Alcaloides Fenólicos FD	Amonio 4 ^o u óxidos de aminas
RESULTADOS PARA ALCALOIDES	Dragendorff	+	+	+	-	-
	Ehrlich	-	+	-	-	-
	Valsler					
	Reineckato de Amonio	++	++	+	+	-
	Hager	+	-	+	-	+
METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA					RESULTADOS (Color, precipitado)
FLAVONOIDES	Shinoda					- Sin cambio
	Rosenhein					+ fase carmesi
	HCl 10 %					-
NAFTOQUINONAS Y/O ANTRAQUINONAS	Reacción En medio ácido					-
	Reacción en medio básico					-
	Reacción para antraquinonas					-
	Reacción para naftoquinonas					
TANINOS	FeCl ₃					+ verde tenue
	Acetato de plomo					++ pp blanco
	Gelatina-Sal					-
	Rosenthaler					-

SAPONINAS	Espuma H ⁺	+
	Espuma OH ⁻	++
	Hemólisis	+++ Completa
ESTEROIDES Y/O TRITERPENOIDES	Fieser	++ pp naranja
CUMARINAS	Hidroxamato Férrico	
	Fluorescencia	+
	Ehrlich	-
CARDIOTONICOS	Esteroides	
	Baljet	++ naranja
	Kedde	- pp blanco
	Keller-Killiani	- pp blanco
	Tollens	-
LACTONAS TERPENICAS	Legal	
	Kedde	-
	Tollens	-
	Hidroxamato Férrico	

Fuente. Esta investigación.

Resultados Análisis Jugo Fresco Guaitarilla Uña de Águila.

METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA	HCL 5% FA	Solubles en CHCl ₃ FB	Solubles en CHCl ₃ -EtOH FC	Alcaloides Fenólicos FD	Amonio 4 ^o u óxidos de aminas
RESULTADOS PARA ALCALOIDES	Dragendorff	-	+	+	-	-
	Ehrlich	-	+	-	-	-
	Valser					
	Reineckato de Amonio	+	+	++	-	-
	Hager	+	-	-	-	-
METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA					RESULTADOS (Color, precipitado)
FLAVONOIDES	Shinoda					- Sin cambio
	Rosenhein					+ fase carmesi
	HCl 10 %					-
NAFTOQUINONAS Y/O ANTRAQUINONAS	Reacción En medio ácido					+
	Reacción en medio básico					-
	Reacción para antraquinonas					-
	Reacción para naftoquinonas					
TANINOS	FeCl ₃					+ verde tenue
	Acetato de plomo					+++ pp blanco

	Gelatina-Sal	-
SAPONINAS	Rosenthaler	-
	Espuma H ⁺	++
	Espuma OH ⁻	++
	Hemólisis	+++ Completa
ESTEROIDES Y/O TRITERPENOIDES	Fieser	++ pp naranja
CUMARINAS	Hidroxamato Férrico	
	Fluorescencia	+
	Ehrlich	-
CARDIOTONICOS	Esteroides	
	Baljet	+
	Kedde	-
	Keller-Killiani	-
	Tollens	Espejo tenue
LACTONAS TERPENICAS	Legal	
	Kedde	-
	Tollens	-
	Hidroxamato Férrico	

Fuente. Esta investigación.

Resultados Análisis Jugo Fresco Guaitarilla Negra Común.

METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA	HCL 5% FA	Solubles en CHCl ₃ FB	Solubles en CHCl ₃ -EtOH FC	Alcaloides Fenólicos FD	Amonio 4 ^o u óxidos de aminas
RESULTADOS PARA ALCALOIDES	Dragendorff	+	-	++	-	-
	Ehrlich	-	-	-	-	-
	Valser					
	Reineckato de Amonio	+	-	-	-	-
	Hager	+	-	-	-	-
METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA					RESULTADOS (Color, precipitado)
FLAVONOIDES	Shinoda					- Sin cambio
	Rosenhein					+ fase carmesi
	HCl 10 %					-
NAFTOQUINONAS Y/O ANTRAQUINONAS	Reacción En medio ácido					-
	Reacción en medio básico					-
	Reacción para antraquinonas					-

	Reacción para naftoquinonas	
TANINOS	FeCl ₃	+ verde tenue
	Acetato de plomo	+++ pp blanco
	Gelatina-Sal	-
SAPONINAS	Rosenthaler	-
	Espuma H ⁺	++
	Espuma OH ⁻	-
	Hemólisis	++ Completa
ESTEROIDES Y/O TRITERPENOIDES	Fieser	++ pp naranja
CUMARINAS	Hidroxamato Férrico	
	Fluorescencia	+
	Ehrlich	-
CARDIOTONICOS	Esteroides	
	Baljet	+
	Kedde	-
	Keller-Killiani	-
	Tollens	-
LACTONAS TERPENICAS	Legal	
	Kedde	-
	Tollens	-
	Hidroxamato Férrico	

Fuente. Esta investigación.

Resultados Análisis Jugo Fermentado Guaitarilla Negra Común.

METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA	HCL 5% FA	Solubles en CHCl ₃ FB	Solubles en CHCl ₃ -EtOH FC	Alcaloides Fenólicos FD	Amonio 4 ^o u óxidos de aminas
RESULTADOS PARA ALCALOIDES	Dragendorff	+	+	+	-	-
	Ehrlich	-	-	-	+	-
	Valser					
	Reineckato de Amonio	-	+	-	+	-
	Hager	-	+	+	-	++
METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA	RESULTADOS (Color, precipitado)				
FLAVONOIDES	Shinoda	-+color naranja				
	Rosenhein	++ fase carmesi				
	HCl 10 %	-				
NAFTOQUINONAS Y/O ANTRAQUINONAS	Reacción ácido	En	medio	+		
	Reacción básico	en	medio	-		
	Reacción antraquinonas	para		-		
	Reacción naftoquinonas	para		-		
TANINOS	FeCl ₃	+ verde tenue				
	Acetato de plomo	+++ pp blanco				
	Gelatina-Sal	-				
SAPONINAS	Rosenthaler	-				
	Espuma H ⁺	++				
	Espuma OH ⁻	-				
	Hemólisis	++ Completa				
ESTEROIDES Y/O TRITERPENOIDES	Fieser	++ pp naranja				
CUMARINAS	Hidroxamato Férrico					
	Fluorescencia	+				
	Ehrlich	-				
CARDIOTONICOS	Esteroides					
	Baljet	++				
	Kedde	-				
	Keller-Killiani	-				
	Tollens	-				
LACTONAS TERPENICAS	Legal					
	Kedde	-				

	Tollens	-
	Hidroxamato Férrico	

Fuente. Esta investigación.

ANEXO E

Correlación entre tigogenina y hecogenina expresados como ácido oleanólico y acetato de hecogenina respectivamente.

$$\left. \begin{array}{l} \text{Hecogenina: } 62,861 \text{ ppm (mg/L)} \\ \text{Tigogenina: } 61,862 \text{ ppm (mg/L)} \end{array} \right\} 124,723 \text{ ppm (mg/L)}$$

$$\frac{62,861 \text{ ppm}}{124,723 \text{ ppm}} \times 100\% = 50,40\%$$



Hecogenina

$$\frac{61,862 \text{ ppm}}{124,723 \text{ ppm}} \times 100\% = 49,60\%$$



Tigogenina

TIGOGENINA: Dilución 5mL

$$\frac{61,862 \text{ mg}}{\text{L}} \times \frac{(5\text{mL})}{1000\text{mL}} = 0,30931 \text{ mg de tigogenina}$$

- Como las sapogeninas recristalizadas que se utilizaron en la inyección fueron 0,5 g se realizó la siguiente relación

$$\frac{0,30931 \text{ mg Tigogenina}}{0,5\text{g sapogeninas recristalizadas}} = \frac{0,619 \text{ mg tigogenina}}{\text{g sapogeninas recristalizadas}}$$

- El total de sapogeninas recristalizadas fue de 1,2995g, se realizó la siguiente relación:

$$\frac{0,619 \text{ mg tigogenina}}{\text{g de sapogeninas crudas}} \times 1,2995 \text{ g de sapogeninas crudas} = \frac{0,804 \text{ mg tigogenina}}{\text{Sapogeninas recristalizadas}}$$

- El jugo liofilizado utilizado para la cuantificación fue 15g.

Contenido en jugo liofilizado

$$\frac{0,804 \text{ mg de tigogenina}}{15 \text{ g Jugo liofilizado utilizado}} = \frac{0,0536 \text{ mg de tigogenina}}{\text{g jugo liofilizado utilizado}}$$

- Contenido total en el jugo liofilizado (81,9g)

$$0,0536 \text{ mg de tigogenina} \times 81,9\text{g jugo liofilizado} = 4,389 \text{ mg de tigogenina}$$

g jugo liofilizado

- Contenido en jugo fresco (se liofilizaron 2L) 2L = 2Kg aprox
Densidad jugo: 1,027 g/mL

$$\frac{4,389\text{mg tigenina}}{2\text{Kg}} = \frac{2,19 \text{ mg tigenina (ppm)}}{\text{Kg jugo fresco}}$$

$$V = \frac{m}{d} = \frac{2\text{Kg}}{1,027 \text{ Kg/L}} = 1,947 \text{ L} \Rightarrow \frac{2,254\text{mg de tigenina}}{\text{L jugo fresco}}$$

HECOGENINA: Dilución 5mL

$$62,861 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{(5\text{mL})}{1000\text{mL}} = 0,314305 \text{ mg de tigogenina}$$

- Como las sapogeninas recristalizadas que se utilizaron en la inyección fueron 0,5 g se realizó la siguiente relación

$$\frac{0,314305 \text{ mg Hecogenina}}{0,5\text{g sapogeninas recristalizadas}} = \frac{0,629 \text{ mg tigogenina}}{\text{g sapogeninas recristalizadas}}$$

- El total de sapogeninas recristalizadas fue de 1,2995g, se realizó la siguiente relación:

$$\frac{0,629\text{mg Hecogenina}}{\text{g de sapogeninas crudas}} \times 1,2995 \text{ g de sapogeninas crudas} = \frac{0,817\text{mg Hecogenina}}{\text{Sapogeninas recristalizadas}}$$

- El jugo liofilizado utilizado para la cuantificación fue 15g.

Contenido en jugo liofilizado

$$\frac{0,817\text{mg de hecogenina}}{15 \text{ g Jugo liofilizado utilizado}} = \frac{0,0545 \text{ mg de hecogenina}}{\text{g jugo liofilizado utilizado}}$$

- Contenido total en el jugo liofilizado (81,9g)

$$0,0545 \frac{\text{mg de hecogenina}}{\text{g jugo liofilizado}} \times 81,9\text{g jugo liofilizado} = 4,463 \text{ mg de hecogenina}$$

- Contenido en jugo fresco (se liofilizaron 2 L) 2L = 2Kg aprox
Densidad : 1,027g/mL

$$\frac{4,463\text{mg Hecogenina}}{2\text{Kg}} = \frac{2,23 \text{ mg Hecogenina}}{\text{L de jugo fresco}}$$