

# Comparación de diferentes métodos de extracción para la obtención de una fracción rica en fitosteroles a partir de la cachaza de caña de azúcar

**Yaisme Balcinde, Blanca Rosa Hung, Alma Marrero, Susana Tirado, Celso Pérez, Alina Falero, Elena Martí, Belinda Águila, Magdalena Fonseca y Edelvis Lightbourne.**

\*Departamento de Procesos Biotecnológicos, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 24 de septiembre de 2003. Aceptado: 13 de febrero de 2004.

Palabras clave: microondas, fitosteroles, cachaza, caña de azúcar, extracción.  
Key words: microwave, phytosterols, mud, sugar cane, extraction.

**RESUMEN.** Los fitosteroles son compuestos naturales, de gran importancia en la industria farmacéutica y alimentaria, por su uso como precursores para la síntesis de medicamentos o por su empleo como nutracéuticos debido a sus excelentes y variadas propiedades farmacológicas. Una posible fuente de obtención de fitosteroles, disponible en Cuba en cantidades considerables, son algunos de los subproductos de la industria azucarera. En el presente trabajo, se llevó a cabo el estudio comparativo de cinco métodos de extracción de una fracción rica en fitosteroles a partir de la cachaza de la caña de azúcar. Se utilizaron métodos tradicionales como la maceración en reposo y con agitación, reactores agitados y soxhlet, y el más novedoso constituido por la aplicación de los hornos microondas. Se varió la relación muestra/disolvente en todos los casos analizados, mientras que con los hornos de microondas, se estudiaron adicionalmente, el tiempo de irradiación y su nivel de potencia, para determinar los parámetros y el tratamiento de mejores resultados. Los mayores rendimientos se lograron con la extracción en soxhlet, reactores agitados, maceración previa a la irradiación, irradiación y maceración en orden decreciente. Se pudo observar que al aumentar la proporción de disolvente se incrementan los rendimientos en todos los métodos. Una menor relación muestra/disolvente, aumenta la eficiencia de la extracción de fitosteroles. De todos los procesos, el menos eficiente es el de la maceración. Los rendimientos de la extracción por irradiación con microondas o combinado con maceración son muy bajos, por lo que no se recomienda este método de extracción en las condiciones estudiadas.

**ABSTRACT.** Phytosterols are natural compounds of great importance for pharmaceutical and alimentary industry. They can be used as precursors in chemical synthesis of drugs or as nutraceuticals due to their excellent pharmacological properties. Sugar cane mill byproducts are suitable phytosterol sources in Cuba. The comparison of five extraction methods for a rich phytosterol fraction from sugar cane mud was carried out. For these purposes, traditional methods such as the digest with and without shaking, shaking reactors, soxhlet and microwaves, a novel method, were assayed. The sample/solvent relation was varied for all methods. Furthermore, irradiation time, potency levels as well as digest prior to irradiation were also assayed for microwave method, looking for better yields. Better yields were obtained for soxhlet extraction, then shake reactors, digest prior to irradiation, irradiation and digest finally. Higher yields were directly related to solvent volume increase for all methods, that is the lower sample/solvent relation, the bigger yield. Digest was the least efficient method for phytosterol extraction. Yields by microwave irradiation (simple or combined with digest) were low, so this method is not recommended.

## INTRODUCCION

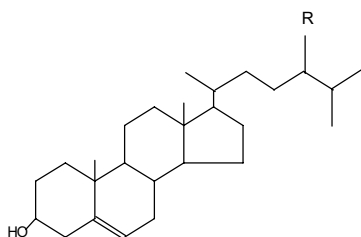
Los esteroides constituyen un grupo de sustancias estructuralmente afines que se encuentran ampliamente distribuidos en animales y plantas.<sup>1</sup> Debido a las crecientes demandas de la industria farmacéutica, se han buscado nuevas fuentes de precursores esteroidales que puedan ser transformados en compuestos de interés médico.

Las mezclas de fitosteroles de origen vegetal son uno de los materiales usados para la síntesis de nuevas sustancias que tienen propiedades farmacológicas o que se utilizan a su vez para la producción de drogas esteroidales, como los corticoides y hormonas sexuales, de gran uso en la industria farmacéutica.<sup>2,3</sup> Se ha encontrado la existencia de núcleos esteroidales en los residuos de la industria azucarera cubana. Se han realizado estudios utilizando la cachaza seca de la caña de azúcar<sup>4</sup> y a partir del aceite de cera de caña, el cual contiene hasta un 10 % de mezcla de fitosteroles.<sup>5,6</sup>

En los animales superiores (incluido el hombre) se encuentra principalmente el colesterol, el cual es un constituyente importante de membranas y precursor de sustancias fisiológicamente activas. Se han realizado estudios y desarrollado diferentes métodos para extraer y purificar este compuesto, partiendo de diferentes fuentes, como huesos, tejido nervioso, etc.<sup>7</sup> Antonio Padilla y col, lo obtuvieron y purifi-

caron a partir de la médula espinal bovina.<sup>8</sup> El colesterol aparece solo muy raramente en las plantas superiores, las cuales contienen fundamentalmente fitosteroles.

Por lo general, los esteroides conocidos son sólidos cristalinos incoloros, solubles en disolventes orgánicos relativamente apolares. Pueden encontrarse en estado libre o formando ésteres de ácidos grasos. Todos tienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidróxido en el carbono 3. La mayoría de los esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C-5 (Fig. 1).



**Fig. 1.** Estructura general de los esteroides. Colesterol ( $R=H$ ). Campesterol ( $R=Me$ ). Sitosterol ( $R=Et$ ). Estigmasterol [ $R=Et$ ; insaturado. (C-22)].

Zayas y col. desarrollaron una técnica de extracción sólido-líquido en un equipo soxhlet, para la obtención de una fracción rica en fitosteroles. En este procedimiento utilizan la cachaza de caña de azúcar como materia prima.<sup>9</sup>

Una posibilidad alternativa sería el empleo de las microondas en el primer paso de extracción de los fitosteroles. Esta técnica está siendo ampliamente utilizada en la síntesis y extracción de compuestos orgánicos por sus ventajas,<sup>10</sup> por lo que ha alcanzado un vertiginoso desarrollo en la última década. En estudios realizados se demuestra que las microondas aceleran el proceso de extracción.<sup>11,12</sup> Hasty y Revesz,<sup>13</sup> describen un proceso de extracción de sólidos totales en hidrocarburos de petróleo, en el que las condiciones óptimas de irradiación fueron de 5 a 15 min, utilizando como disolvente (hexano : acetona) (1 : 1). Este sistema de extracción reduce el tiempo considerablemente, comparado con la extracción con soxhlet. Romeu y col.<sup>14</sup> han estudiado la influencia del tiempo de irradiación, el nivel de potencia y el grado de humectación del material vegetal sobre la efectividad de la extracción en vegetales con microondas (MO).

El presente trabajo tuvo como objetivo el estudio comparativo de diferentes métodos de extracción de una mezcla rica en fitosteroles a partir de la cachaza de la caña de azúcar, en busca de los procesos más eficientes y de mejores rendimientos.

## MATERIALES Y METODOS

### Preparación del material vegetal

Para la obtención de los extractos ricos en fitosteroles se utilizó cachaza seca del Central "América Libre" de la Provincia La Habana. La cachaza previamente se secó en un secador de bandejas durante 30 h a 80 °C o expuesta al sol durante 5 d hasta alcanzar una humedad de 10 a 17 %. Posteriormente, fue llevada hasta un tamaño de partículas de 0,5 mm utilizando un molino de cuchillas modelo FURNA. Se le determinó el porcentaje de humedad y el contenido de cenizas.

### Métodos de extracción

Se compararon cinco métodos de extracción.

**Soxhlet.** Se aplicó el método reportado por Zayas y col.<sup>9</sup> Para la obtención de la fracción rica en fitosteroles se realizó una extracción sólido-líquido de la cachaza seca en soxhlet, utilizando como disolvente hexano comercial, con una relación muestra/disolvente de 1/6 y 1/25 (PS/V) para un total de 30 descargas. En todos los casos, al extracto se le determinó el porcentaje obtenido con respecto a la cachaza seca inicial.

**Reactor.** Se realizó la extracción con dos lavados, en un reactor cilíndrico de latón, agitado por paleta, empleando como disolvente hexano comercial, a 68 °C durante 1 h, con una relación muestra/disolvente de 1/6 y 1/25 (PS/V).

En todos los experimentos anteriores se realizaron tres réplicas.

**Irradiación con microondas.** Se utilizó un horno doméstico Gold Star con frecuencia de 2 450 MHz y 850 W. En un erlenmeyer de 300 mL se añadieron 20 g de cachaza y hexano en una relación muestra/disolvente 1/6 y 1/25 (PS/V) y se irradiaron las muestras variando el tiempo y la potencia del equipo de MO (5 min; 10 % de potencia) y (1 min; 100 % de potencia). En cada experimento se realizaron cuatro réplicas.

**Maceración.** En un erlenmeyer de 300 mL se añadieron 5 g de cachaza y hexano en una relación muestra/disolvente 1/25 (PS/V), se tapó y dejó en reposo durante una semana, a temperatura ambiente.

Se realizaron cuatro réplicas de este experimento.

**Maceración previa a la irradiación.** En un erlenmeyer de 300 mL se añadieron 5 g de cachaza y hexano en una relación muestra/disolvente 1/25 (PS/V). Las condiciones durante la maceración fueron: temperatura ambiente con reposo y agitación durante una semana. Posteriormente, estas muestras se irradiaron con MO (1 min; 100 % de potencia). Se realizaron cuatro réplicas en cada experimento.

Para separar el extracto, se filtraron las muestras a gravedad. El filtrado se recogió después de lavar varias veces con hexano y se llevó hasta sequedad en un evaporador rotatorio para luego determinar el peso obtenido de la fracción rica en fitosteroles.

### Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA I) en el que se calcularon la media, el error estándar y la varianza, para todas las muestras y mediante la prueba de Newman Keuls se compararon las medias obtenidas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Al comparar los resultados correspondientes a las diferentes relaciones muestra/disolvente empleadas en el reactor y el soxhlet como métodos de extracción, se pudo observar que, al utilizar una proporción de hexano con respecto a la muestra de 1/25 se alcanzan rendimientos significativamente mayores que al utilizar la relación 1/6. En la extracción por irradiación, aunque esta tendencia a alcanzar mayores rendimientos al aumentar la cantidad de disolvente se mantuvo, las diferencias no fueron significativas (Tabla 1).

En cuanto a las condiciones aplicadas en la extracción por irradiación, no se observaron diferencias significativas entre aplicar 5 min y 10 % de la potencia o 1 min y 100 % de la potencia, independientemente de la relación muestra/disolvente empleada. Teniendo en cuenta estos resultados, lo más recomendable sería utilizar 1 min al 100 % de la potencia, pues el tiempo utilizado en la extracción es menor, lo que hace que el método sea más económico. Adicionalmente, estas son las condiciones donde se obtuvieron los mejores rendimientos.

Sin embargo, se puede afirmar que la irradiación no es efectiva en la extracción de fitosteroles de la cachaza en las condiciones probadas,

porque los rendimientos fueron menores que con el resto de los métodos comparados, excepto la maceración.

La maceración como método de extracción, es aún menos eficiente que la irradiación, por lo que es el de menores rendimientos (Tabla 1). Se obtiene un porcentaje muy bajo de la fracción rica en fitosteroles (1,69 %) y estadísticamente las diferencias son significativas entre este método y el resto de los métodos de extracción empleados, siendo solamente comparables sus resultados con el caso de la extracción con irradiación cuando se emplea una relación de disolvente de 1/6, donde no existen diferencias significativas.

Otra posibilidad que se examinó fue la aplicación de la maceración como un pretratamiento a la cachaza para mejorar la efectividad de la acción posterior de las microondas. Cuando se utiliza ese procedimiento previo a la irradiación, aunque el porcentaje obtenido de la fracción rica en fitosteroles, aparentemente, es ligeramente mayor con respecto a el obtenido cuando se aplica la irradiación solamente, las diferencias no fueron significativas, o sea, no se mejoraron los rendimientos. La agitación durante la maceración no cambió los resultados, pues los rendimientos alcanzados aplicando la maceración en reposo e irradiación con MO posterior, fueron semejantes a los de la maceración en zaranda previa a la irradiación. Por lo tanto, tampoco es recomendable utilizar este sistema para extraer la fracción rica en fitosteroles de la cachaza.

Como se puede observar, de todos los métodos y condiciones apli-

cados, las extracciones en soxhlet y reactor fueron las de mejores resultados, siendo el primer método más eficiente que el segundo, pues las diferencias son altamente significativas entre los rendimientos obtenidos por ambos métodos. La cantidad obtenida de la fracción rica en fitosteroles con soxhlet duplica la que se extrae en el reactor.

De todo lo anterior se deduce que el procedimiento tecnológico más eficiente para realizar la extracción de la fracción rica en fitosteroles es aquel en el que se emplea el soxhlet.

Al comparar los resultados con los reportados por Zayas y col., se comprobó que los rendimientos obtenidos fueron mucho mayores, (12,30 % comparados con 5,1 %). En ambos casos, se empleó la misma relación de disolventes, por lo que estas diferencias pudieran deberse entre otros factores, a la diferente procedencia de la cachaza, lo que origina una gran variabilidad en sus componentes.

#### CONCLUSIONES

De todos los métodos empleados, la extracción con soxhlet fue el más eficiente con un rendimiento de la fracción rica en fitosteroles del 12,30 %.

Los métodos de extracción utilizando irradiación con microondas y la maceración, en cualesquiera de sus variantes, no son adecuados para extraer la fracción rica en fitosteroles a partir de la cachaza, con hexano, en las condiciones probadas.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Finar I.L. Química Orgánica II. Editorial Alhambra S.A., España, 508, 1970.

2. Kutney J. Novak E. Jones P. Patent CA 2201328, 1998.
3. Kutney J. Patent US 5770749, 1998.
4. Navia D.A. y col. Valiosa fuente de esteroides en los restos de la industria azucarera. **Rev. Cub. Farm.**, **4**, 27-35, 1970.
5. Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar. La industria de los derivados de la caña de azúcar. Editorial Científico-Técnica, La Habana, Cuba, 49, 177, 554, 1986.
6. Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar. Manual de derivados de la caña de azúcar. Editorial Científico-Técnica, La Habana, Cuba, 53, 365-369, 2000.
7. Fieser F.L. and Fieser M. Steroids. Reinhold Publishing Corporation, N.Y., 345-6, 1959.
8. Padilla R.A. y Marrero C.M. Bonera A.M. Colesterina: Desarrollo del proceso tecnológico para su obtención industrial partiendo de la médula espinal bovina. **Rev. Cub. Farm.**, **XXXIV**, 3-19, 1974.
9. Zayas O. Martínez A. Bedolla E. Rev. Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar, **XXXI**, 21-27, 1997.
10. Loupy A. Petit A. Hamelin J. Texier-Boulet F. Jacquault P. Mathé D. New solvent-free organic synthesis using focused microwaves. **J. of Synt. Org. Chem.**, **28**, 1213-1233, 1998.
11. Frost S.P. Dean J.R. Extraction of hexaconazole from weathered soils: a comparison between soxhlet extraction, microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. **Analyst**, **19**, 895-898, 1997.
12. Gramann P. Scharenberg W. Extraction of xenobiotics from certified pig fat: comparison of microwave and Soxhlet methods. **Fachz. Lab.**, **36**, 39-41, 1997.
13. Hasty E. Revesz R. Total petroleum hydrocarbon determination by microwave solvent extraction. **Am-Lab.** (Shelton, -Conn), **66**, 68-72, 74, 1995.
14. Romeu C.R. y col. **Fitosanidad**, **4**, 17-21, 2000.

**Tabla 1.** Resultados de la extracción de una fracción rica en fitosteroles a partir de cachaza de caña de azúcar.

Condiciones	Tiempo/Potencia (min/%)	Muestra/ solvente (g/mL)	Extracto <sup>a</sup> media (%)	ES	Varianza
Soxhlet	—	1/25	12,30a	1,55	2,41
Soxhlet	—	1/6	6,31b	0,97	0,95
Reactor	—	1/25	6,76b	0,09	0,008
Reactor	—	1/6	4,74c	0,10	0,011
Maceración Irradiación	1/100	1/25	3,91cd	0,38	0,14
Maceración en zaranda Irradiación	1/100	1/25	4,01cd	0,28	0,08
Maceración Irradiación	—	1/25	1,69g	0,23	0,05
Irradiación	1/100	1/25	3,31d e	0,16	0,03
Irradiación	5/10	1/25	3,11def	0,12	0,14
Irradiación	1/100	1/6	2,4efg	0,11	0,13
Irradiación	5/10	1/6	2,13fg	0,08	0,006

<sup>a</sup> Peso de la fracción rica en fitosteroles/Peso seco de cachaza. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con Newman Keuls (p < 0,5). ES Es error estándar.