

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**Cuantificación de Saponinas
Esteroidales en *Enterolobium cyclocarpum*
(conacaste).**



Informe final de tesis

Presentado por:

Thelma Johanna Vásquez de Paz

Estudiante de la carrera de
Químico Farmacéutico

Guatemala, octubre del 2000.

DL
06
t(2094)

JUNTA DIRECTIVA

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

DECANA: Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta.

SECRETARIO: Lic. Oscar Federico Nave Herrera.

VOCAL I: Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto.

VOCAL II: Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda.

VOCAL III: Dr. Federico Adolfo Richter Martinez.

VOCAL IV: Br. César Alfredo Flores López.

VOCAL V: Br. Manuel Anibal Leal Gómez.

AGRADECIMIENTO

A

INSTITUCIONES

- La Universidad de San Carlos de Guatemala.
- La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica.
- Herbario de la Facultad de Agronomía.

PERSONAS

- Licda. Beatriz Medinilla por asesorar este estudio.
- Lic. Girón por la revisión de esta tesis.
- Dr. Virgilio Cesar Godinez.

ACTO QUE DEDICO

(A la memoria de mi padre Narciso Clemente Vásquez Bravo).

A DIOS:

Ser creador de lo bello que me rodea que me dio la sabiduría para finalizar mi meta.

A LA VIRGEN MARIA:

Como un ejemplo de abnegación y pureza.

A MIS PADRES:

Narciso Clemente Vásquez Bravo (†) que junto a Justa Marina de Paz Maldonado, me dieron todo el apoyo y contribuyeron a mi logro más anhelado. Gracias.

A MIS HERMANOS:

Dulier Clemente y Carlos Fernando, por todo su apoyo fraternal y amor que siempre me han demostrado.

A MI SOBRINA:

Claudia Fernanda, con mucho amor.

A MIS ABUELOS:

Por su cariño y estar siempre cuando los necesitaba.

A MIS TIOS:

A quienes les agradezco sus buenos consejos.

A MIS PRIMOS:

Por todos los bellos momentos que compartimos.

A MIS AMIGAS:

Quienes hicieron de los momentos difíciles algo agradable, gracias por su compañerismo especialmente a Gloria López, Fernando Gómez (con mucho cariño).

A MIS CATEDRATICOS:

Por compartir sus enseñanzas conmigo.

Indice

	Contenido	Pagina
1.	RESUMEN.	01-02
2.	INTRODUCCION.	03
3.	ANTECEDENTES.	04-06
4.	JUSTIFICACION.	07
5.	OBJETIVOS.	08
6.	HIPOTESIS.	09
7.	MATERIALES Y METODOS.	10-16
8.	RESULTADOS.	17
9.	DISCUSION DE RESULTADOS.	18-19
10.	CONCLUSIONES.	20
11.	RECOMENDACIONES.	21
12.	REFERENCIAS.	22-24
10.	ANEXOS	25-35

1.- *Resumen*

En el presente trabajo de investigación, se realizó un estudio fitoquímico del conacaste cuyo nombre científico es *Enterolobium cyclocarpum*, el cual según literatura reporta el contenido de sapogeninas esteroideal en sus diferentes órganos (fruto, semillas, hojas tiernas y corteza) (1), se tomó esto como base para la realización de estudios que validen científicamente el contenido de este metabolito en las mencionadas partes del árbol.

De esta información se partió para realizar un muestreo en tres diferentes áreas de Escuintla, de donde se obtuvieron las muestras, de las cuales se hizo una mezcla de los órganos recolectados en cada área.

Los resultados positivos en las pruebas preliminares, indican las partes del árbol que contienen sapogeninas. Tales como; test de espuma, (este método indica que a los 30 minutos debe de existir una altura mayor de 3 centímetros); y la prueba de hemólisis, (estos metabolitos tienen las característica de formar hemólisis partiendo del centro de la copa con un radio de 1 centímetro), para dichas pruebas se utilizan estándares como parámetro de comparación (2).

Partiendo de lo anterior se realizaron análisis espectrofotométricos, para la determinación de sapogeninas esteroideales, ya que este método cuantitativo es específico para este tipo de sapogeninas, el cual se basa en la reacción de coloración con anisaldehído, ácido sulfúrico y acetato de etilo diluido, con esta combinación obtenemos un cromóforo con un pico de 430 nanómetros (3).

Se realizó la cromatografía en capa fina, como prueba confirmatoria de la presencia de este metabolito, dando una coloración de violeta-azul y rojo en la cromatoplaca.

El objetivo primordial de este estudio se basó en analizar que órgano de conacaste (*Enterolobium cyclocarpum*) contiene más del 0.1% de sapogeninas, así mismo comprobar el tipo de sapogeninas que contiene.

En los resultados obtenidos comprobamos experimentalmente que solamente el fruto contienen un porcentaje mayor del 0.1% el cual fue de 9.30%, y el tipo de sapogenina que este contiene es esterooidal.

2. *Introducción.*

Desde la antigüedad se tiene conocimiento de la importancia del uso de plantas a nivel popular como alimento, medicamento, etc., por lo que se hace necesario que sean estudiadas científicamente y así validar el uso de las mismas.

Las saponinas (del latín sapon, jabón) constituyen un grupo de glicósidos ampliamente distribuidos en las plantas superiores; son solubles en agua y disminuyen la tensión superficial de ésta, dando lugar a la formación de espuma abundante, y relativamente estable, cuando la mezcla se agita (6,7).

Las saponinas tienen elevado peso molecular. Como heterósidos que son, se hidrolizan por ácidos, dando una genina (sapogenina) y diversos azúcares y ácidos urónicos relacionados. Según la estructura de la genina o sapogenina, se conocen dos grupos de saponinas: *saponinas esteroidales (triterpenoides tetracíclicos)* y *saponinas triterpénicas (triterpenoides pentacíclicos)* (2).

En Guatemala se encuentran muchas variedades de plantas que se utilizan empíricamente sin tener validez científica sobre los usos que se les atribuyen. Con este propósito se realiza el siguiente estudio, para validar científicamente el uso popular del fruto y semillas de *Enterolobium cyclocarpum* (conacaste), que por medio de entrevistas se comprobó que personas del área rural la han utilizado como sustituto del jabón por la propiedad de producir espuma. Así mismo se pretende investigar el tipo de saponinas presentes en la planta, como el porcentaje de éstas en sus distintos órganos.

3. *Antecedentes.*

3.1. SAPONINAS

El término "saponina" deriva de la palabra latina "sapon", que significa jabón. Son glicósidos derivados de triterpenos o de esteroides, caracterizados por formar espuma al agitar el material vegetal en que se encuentran con agua, ya que son poderosos agentes tensioactivos. También poseen propiedades hemolíticas y, si se inyectan en el torrente sanguíneo, son muy tóxicas. El hecho de que una planta contenga sustancias hemolíticas no prueba que contenga saponinas (3, 4).

Las saponinas tienen un elevado peso molecular. Como heterósidos que son, se hidrolizan por ácidos, dando una genina (sapogenina), diversos azúcares y ácidos urónicos relacionados. La porción aglicona o no sacárida de la molécula de saponina se llaman genina o sapogenina. Dependiendo del tipo de genina presente, las saponinas pueden dividirse en 2 grupos de sapogeninas: las de tipo **esteroide** (generalmente triterpenos tetracíclicos) y las de tipo **no esteroide** (triterpenos pentacíclicos). Ambas presentan un enlace heterosídico en el carbono 3 y tienen un origen biogénico común, vía ácido mevalónico y unidades isoprenoides (4, 5).

Algunas plantas que contienen saponinas han sido empleadas por cientos de años como jabones y de aquí que sus nombres reflejen esto. Las fuentes más comunes de saponinas son las plantas superiores, pero un número en aumento está siendo encontrado en los animales marinos inferiores. Hasta aquí, solamente se han encontrado en el phylum marino Echinodermata y particularmente en especies de la clases Holothuroidea y Asteroidea (estrella de mar) (5).

2.2. FUENTES NATURALES DE SAPONINAS PARA LA OBTENCION DE PRODUCTOS NATURALES

Los derivados más importantes de sapogeninas que se encuentran en la naturaleza en cantidades disponibles para uso sintéticos son: diosgenina (especies de *Dioscorea* y *Alholva*), hecogenina (*Sisal spp*), solasodina (*Solanum spp*), estigmasterol y setosterol (*Soya*) (4). Recientemente estudios han demostrado que las hojas de huelle de noche (*Cestrum nocturnum*) posee trigogenina, esmilogenina y ucagenina (6).

Se han encontrado especies que continen sapogeninas tales como yucca (*Yucca whipplei*), amole (*Chlorogalum pomeridianum*) (7). Otros estudios mostrarón que un gran número de especies de los géneros *Agave* de la familia *Agavaceae*, contiene cantidades apreciables de saponinas esteroidales (8).

En 1936 la Diosgenina fue obtenida por primera vez en *Dioscorea tocoro*, cuatro años después se dio la posibilidad en convertir sapogeninas esteroidales en acetato de pregnelona y de este a progesterona; lo que dio paso al uso de diosgenina para la conversión de hormonas sexuales, corticosteroides y otros compuestos (8).

En Guatemala se han realizado pocos estudios sobre la cuantificación y caracterización de Saponinas, entre los que se pueden mencionar se encuentran los siguiente:

En 1971 Pardo en la Facultad de Farmacia, investigó el contenido de Sapogeninas esteroidales y su transformación enzimática en tubérculos de *Dioscorea belizensis* en el periodo de floración y no floración, en el cuál hace mención que la cantidad de saponinas varía dependiendo de la época de recolección, también se hace referencia que el contenido de saponinas es menos cuando el tubérculo tiene 1 a 2 años, que cuando tiene 3 años o más, sus resultados fueron (2.9%) y (9.8%) respectivamente.

Pardo concluye que el contenido de saponinas es mayor en período de floración que en no floración. (9).

En 1988 C. Alvarez y A. Archila, en la Facultad de Ingeniería, realizaron un estudio sobre la caracterización física y química del fruto de *Sapindus saponaria* (jaboncillo) y su potencial de industrialización como fuente de saponinas (10).

En 1992 Fernandez, en la Facultad de Agronomía, determinó la variabilidad de sarsapogenina presente en *Smilax* spp. de diferentes localidades del país (11).

En 1995 S. Temaj, en la Facultad de Farmacia cuantificó el contenido de saponinas esteroidales en hojas y rizomas de *Smilax undellii* (zarzaparilla), en este estudio que realizó concluyó que los rizomas contienen mayor contenido de saponinas que las hojas (12.05%) y (9.82%) respectivamente (12).

En 1997 C. Chinchilla, en la Facultad de Farmacia, determinó cualitativamente y cuantitativamente las saponinas esteroidales en hojas de *Cestrum nocturnum* mediante gravimetría, habiendo encontrado 3.33% de saponinas totales (13).

En 1997 P. Oliva, en la Facultad de Farmacia, evaluó mediante espectrofotometría el contenido de saponinas esteroidales en *Cestrum nocturnum* (huele de noche), en el cual sus resultados demostraron que existe mayor contenido de saponinas esteroidales en hojas (4.9%), que en raíz (0.62%) y tallo (0.23%) (14).

En 1999 V. Porres, en la Facultad de Farmacia, cuantificó el contenido de Saponinas Esteroidales en Frutos, Semillas y Corteza de *Sapindus Saponaria* (jaboncillo), en el que sus resultados demostraron que la semillas contienen mayor contenido de saponinas esteroidales que el fruto y la corteza, (2.81%), (1.175%) y (0.04) respectivamente (15).

4. *Justificación*

Desde la antigüedad el hombre ha manifestado inquietud por conocer y estudiar el ambiente que lo rodea. Existe en la actualidad un enorme interés por el tema de las plantas ya que tienen una gran importancia en los aspectos agrícolas, medicinales y económicos.

Guatemala cuenta con un gran potencial en recursos naturales, los cuales no son aprovechados industrialmente debido a la escasez de investigaciones realizadas al respecto.

Los vegetales que contienen saponinas se han utilizado ampliamente en muchas partes del mundo por sus propiedades detergentes. Estas plantas contienen un elevado porcentaje de heterósidos llamados saponinas, que se caracterizan por sus propiedades hemolíticas, y si se inyectan en el torrente sanguíneo son muy tóxicas.

El fruto del conacaste (*Enterolobium cyclocarpum*) es comúnmente utilizado en el área rural para el lavado de ropa, lo cual permite deducir que posee un porcentaje alto de saponinas. Es por ello necesario evaluar el tipo de saponina(s) presente(s), así como el porcentaje en que se encuentran, con el objeto de aprovechar mejor este recurso natural en la elaboración de jabones, hormonas sexuales, corticosteroides (2), etc.

5. *Objetivos*

5.1. GENERALES

5.1.1. Proporcionar un aporte científico fitoquímico sobre plantas de potencial utilidad industrial.

5.1.2. Establecer antecedentes que contribuyan a futuras investigaciones sobre plantas que contengan saponinas que puedan ser utilizadas en nuestro medio como detergentes.

5.2. ESPECIFICOS

Respecto a *Enterolobium cyclocarpum*

5.2.1. Establecer qué órgano del mismo contiene saponinas.

5.2.1. Determinar el tipo de saponinas presentes en los órganos analizados.

5.2.2. Cuantificar las saponinas contenidas en los órganos analizados.

6. Hipótesis.

Por lo menos uno de los órganos de *Enterolobium cyclocarpum* (conacaste) analizados en el presente estudio contiene más de 0.1% de saponinas.

7. *Materiales y Métodos*

7.1. UNIVERSO DE TRABAJO

Material vegetal desecado y pulverizado de *Enterolobium cyclocarpun* (conacaste) recolectados en Escuintla, Departamento de la República de Guatemala.

7.2. MEDIOS

7.2.1. RECURSOS HUMANOS

Br. Thelma Johanna Vásquez De Paz.

Asesora. Licda. Beatriz Eugenia Medinilla Aldana.

7.2.2 RECURSOS MATERIALES

7.2.2.1. LABORATORIO

Laboratorio del Departamento de Análisis Aplicado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.2.2.2. MATERIALES, EQUIPO Y REACTIVOS.

7.2.2.2.1. MATERIALES Y EQUIPO.

- Balanza analítica.
- Molino Wiley Mill Modelo No 3.
- Estufa.
- Horno GS blue M electric Modelo SW 17TA-1.
- Espectrofotómetro (Spectronic 601 UV-Vis Modelo No. 3)
- Cámara cromatográficas de vidrio.
- Placas cromatográficas de sílica gel F-254 (Merck)
- Cristalería común de laboratorio.

7.2.2.2.2. REACTIVOS

- Estándar de saponinas
- Metanol grado reactivo
- Butanol grado reactivo
- Etanol absoluto
- Cloruro de Antimonio III.

- Cloroformo
- Acido sulfúrico concentrado
- Acetato de etilo grado reactivo
- Anisaldehído.

7.3. PROCEDIMIENTO.

7.3.1. Recolección de fruto, hojas, flores, semillas y corteza de *Enterolobium cyclocarpum* (conacaste).

7.3.2. Clasificación botánica de los ejemplares recolectados.

7.3.3. Desecar los órganos de *Enterolobium cyclocarpum* (conacaste) mediante calor artificial a 40°C.

7.3.4. TEST DE ESPUMA (3):

Pesar 100 miligramos de material vegetal desecado y pulverizado y colocarlo en un tubo de ensayo. Para comparar utilizar 2 tubos control:

(a) 2 ml de control de saponinas (preparación disolver 250mg de estándar de saponinas en 50 ml de agua).

(b) 2 ml de agua destilada.

Añadir 10 mililitros de agua destilada a cada tubo.

Calentar en baño de maría durante 30 minutos.

Enfriar, tapar y agitar vigorosamente durante 30 a 40 segundos. Dejar reposar los tubos en posición vertical durante media hora.

Si luego de transcurrido este tiempo se observa una capa de espuma mayor de 3 centímetros en la superficie del líquido se presume que la muestra contiene saponinas. Si la espuma es

poca y fugaz, puede atribuirse a una mínima concentración de saponinas o también a la presencia de proteínas o ácidos orgánicos.

7.3.5. TEST DE HEMOLISIS (3):

-Preparar una caja de petrí con agar sangre y usando un tubo de ensayo de aproximadamente 1centímetro de diámetro remover una copita de agar sangre de 3 partes diferentes de la caja, equidistantes entre sí.

-Calentar con un mechero un agitador de vidrio de 1 a 2 milímetros de diámetro, e inmediatamente sellar los bordes del agar de cada agujero, de manera que al introducir dentro de cada copa el líquido de las muestras, no se difundan por debajo de la capa de agar. Es posible que se requiera repetir varias veces el calentamiento hasta sellar adecuadamente.

-Utilizar un gotero o una pipeta Pasteur, añadir suficiente extracto vegetal acuoso a una de las copas hasta casi llenarla, de modo que la muestra no se extienda sobre la superficie del agar - sangre. Llenar la segunda copa con un control de saponinas y la tercera con agua destilada.

-Dejar en reposo durante una hora, y observar la presencia de zonas claras de hemólisis que circunden cualesquiera de la copas. Si se encuentran presentes estas zonas se presume la presencia de saponinas, medir la zona desde el punto más lejano de hemólisis a la orilla de la copa (en milímetros). Anotar los resultados.

7.3.6. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (3, 8, 16)

De los muchos métodos cromatograficos que se encuentran disponibles, éste es el más utilizado para análisis rápidos de drogas y preparaciones de las mismas, pues conlleva las siguientes ventajas:

- La técnica es simple.
- El tiempo requerido para el análisis es pequeño (15 -60 minutos).

- Promueve la detección de adulterantes y subsituciones. Su costo es bajo.
- Requiere mínimas cantidades de muestras (alrededor de 0.1 gramo).
- Es improbable la obtención de resultados falsos por la presencia de componentes secundarios (16, 17) .

7.3.6.1. PROCEDIMIENTO

Preparación del extracto: Extraer un gramo del material pulverizado con 5 mililitros de metanol, calentando en baño de maría durante 15 minutos. Evaporar hasta aproximadamente un mililitro, y aplicar sobre la cromatopiaca.

Solución estándar: Preparar una solución de saponinas al 0.1% en metanol.

Fase estacionaria: Cromatoplacas de sílica gel F-254.

Fase móvil: Cloroformo - metanol - agua (64: 50: 10). Con esta fase móvil se separan todas las mezclas de saponinas contenidas en drogas vegetales. La mezcla debe ser preparada exactamente.

La cromatografía debe realizarse a 20°C, 30 minutos después de haber añadido el solvente, para saturar la cámara. A temperaturas más altas la separación no es lo suficientemente adecuada (16).

Detección: Reactivo de cloruro de antimonio al 20%.

- Preparar una solución de cloruro de antimonio al 20% en cloroformo, asperjar la cromatoplaca, luego calentar por 5 - 6 minutos a 100°C evaluar en visible (rojo-violeta) o bajo la luz ultravioleta a 365 nanómetros (fluorescencia rojo-violeta, azul y verde) (3).

7.3.7. CUANTIFICACION DE SAPOGENINAS ESTEROIDALES MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRIA (12):

Son numerosos los ejemplos de triterpenos que presentan absorbancia en la región ultravioleta característica de los grupos cromóforos que ellos presentan. Es importante señalar que estos compuestos pueden presentar uno, dos o tres bandas de absorción, lo que permite su caracterización química (13).

Al adicionar ácido sulfúrico a los triterpenos pentacíclicos éstos muestran absorbancia característica a 310 nanómetros, que es independiente de los sustituyentes que ellos presentan (13).

Baccou y colaboradores describieron un método específico para la determinación espectrofotométrica de sapogeninas esteroideas totales, en base a reacciones de coloración con anisaldehído, ácido sulfúrico y acetato de etilo, el cual es aplicable a microgramos de la sustancia a investigar. Mediante este método se hace una determinación directa de las sapogeninas en solución y prácticamente no interfiere con los azúcares, esteroides, ácidos grasos y aceites vegetales. Las sapogeninas poseen las mismas propiedades colorimétricas cuando se encuentran en estado libre, unidas a azúcares o esterificadas con ácidos acético mono o polihidroxilado. El método es preciso (error relativo de 1.4%), rápido, fácilmente automatizable y da origen a un cromóforo con el mismo espectro de absorción, con un pico único a 430 nm para todas las sapogeninas (14).

La técnica es mucho más eficiente que otros métodos espectrofotométricos, especialmente con respecto a la posibilidad de determinar todas las sapogeninas esteroideas, independientemente de sus particularidades estructurales, tales como insaturaciones, presencia de un grupo cetona o grupos hidroxilo adicionales y diferentes conformaciones A/B, así

como número de carbonos. También es posible combinarlo con técnicas cromatográficas (cromatografía en capa fina o en columna), para identificar las diferentes saponinas después de la separación (14).

7.3.7.1. PROCEDIMIENTO

-Preparar el extracto con cada una de las partes de la planta a investigar. Pesar 0.50 gramos del material previamente pulverizado, agregar 50 mililitros de etanol de 95°C y calentar en baño de maría a 60°C por 20 minutos. Filtrar.

-Transferir una alícuota de 4 mililitros a un beaker de 50 mililitros y evaporar a sequedad, en baño de maría.

-Enfriar a temperatura ambiente y agregar a cada muestra 2 mililitros de acetato de etilo, 1 mililitro de reactivo A (0.5 mililitro de anisaldehído más 99.5 mililitro de acetato de etilo) y 1 mililitro del reactivo B (ácido sulfúrico al 50% en acetato de etilo), agitar y calentar a 60°C en baño de maría por 20 minutos. Enfriar la muestra por 10 minutos.

-Medir la absorbancia a una longitud de onda de 430 nanómetros, utilizando como blanco la mezcla de acetato de etilo más un mililitro del reactivo B más 1 mililitro del reactivo A y hacer el mismo tratamiento que a la muestras.

-Realizar en forma paralela, una curva de calibración con diosgenina como estándar.

-En caso de que las saponinas esteroidales se encuentren ausentes o en cantidad poco significativa, se procederá a realizar un análisis gravimétrico, para aislar las saponinas triterpénicas (2).

Efectuar los cálculos para establecer el contenido porcentual. Menos de 0.1% se considera insignificante como para considerarse útil a nivel industrial (8).

7.3.8. PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE LA CURVA DE CALIBRACION

Se prepara una solución stock de diosgenina a una concentración de 100µg/ml en etanol al 95°.

A partir de dicha solución se preparan los siguientes estandares de referencia.

- Estándar 1 (2µg/ml) :0.2 ml de solución stock, aforar a 10ml
- Estándar 2 (4µg/ml) : 0.4 ml de solución stock, aforar a 10ml
- Estándar 3 (6µg/ml) : 0.6 ml de solución stock, aforar a 10ml
- Estándar 4 (8µg/ml) : 0.8 ml de solución stock, aforar a 10ml.
- Estándar 5 (10µg/ml) :1.0 ml de solución stock, aforar a 10ml

7.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACION

7.1. DISEÑO DEL MUESTREO

La cuantificación de sapogeninas se efectuó a partir de árboles de conacaste procedentes del departamento de Escuintla. Se colectaron hojas, frutos, semillas y corteza, y se preparó una mezcla de cada parte evaluada. El análisis se realizó por quintuplicado para cada una de dichas partes. A partir de los resultados se calculó la media y desviación estándar (ver anexo 5, pagina 31)

7.2. ANALISIS DE RESULTADOS

El análisis de los resultados se realizó utilizando pruebas de hipótesis, de la siguiente forma:

-Comparando el rendimiento de sapogeninas de cada parte con 0.1% (dato considerado como mínimo).

Mayor de 0.1% se aprobará la hipótesis.

Menor de 0.1% se rechazará la hipótesis.

8.- Resultados

De las distintas partes evaluadas de *Enterolobium cyclocarpum*, únicamente el fruto dio resultado positivo para presencia de saponinas (test de espuma: 7.5 centímetros de alto a los 30 minutos; hemólisis: zona hemolizada de 1 centímetro de diámetro) (ver anexo 6, pagina 32).

Al cuantificar las sapogeninas esteroidales se obtuvo un rendimiento de 9.30% (desviación estándar de 0.146 y error estándar de 0.065).

Mediante cromatografía en capa fina se detectaron cuatro bandas características de saponinas esteroidales de color violeta, dos de color azul, una de color rojo y una banda no bien diferenciada de color azul (Rf: 0.75, 0.67, 0.62, 0.58) respectivamente (ver anexo 6, pagina 32).

9. - *Discusión de Resultados.*

En base a las pruebas de espuma y hemólisis efectuadas en las distintas partes de *Enterolobium cyclocarpum* (conacaste), puede afirmarse que solamente el fruto contiene saponinas. Esto contradice lo anteriormente publicado por Morton en 1981 (6), quien menciona que dichos metabolitos secundarios se encuentran presentes además, en la corteza, semillas y hojas tiernas, no hace referencia sobre el lugar de recolección, ni las características de la misma.

Por medio del método espectrofotométrico descrito por Baccou y colaboradores (20), se encontró que las sapogeninas presentes son de naturaleza esteroidal, las cuales al ser hidrolizadas dieron un rendimiento de 9.3% de sapogeninas, porcentaje 93 veces mayor al valor de 0.1%, considerado como mínimo, para ser aceptado industrialmente en la elaboración de hormonas sexuales, corticosteroides y vitamina D (4).

El contenido de sapogeninas esteroidales puede variar dependiendo de varios factores, entre los que se puede mencionar la época de recolección de la planta, así como la altitud y latitud. Tomando en cuenta esto se tuvo el cuidado de recolectar todas las muestras en la misma época del año, en el mes de abril, a una misma altitud y latitud, con lo cual se espera haber reducido al mínimo las posibilidades de que los resultados hayan sido influenciados por otras variables.

Es interesante comparar el rendimiento de sapogeninas esteroidales encontrado en el presente estudio con el obtenido en otras especies evaluadas anteriormente en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Es ampliamente conocido que las especies del género *Dioscorea* y *Smilax* se utilizan a nivel industrial por su contenido de estos metabolitos. No es de extrañar entonces que las especies evaluadas, pertenecientes a dicho género, posean el mayor contenido publicado hasta la fecha

(9.8% en el tubérculo de *Dioscorea Belizensis*; 9.02% en la hojas y 12.05% en el rizoma de *Smilax lundelli*). *Cestrum nocturnum* y *Sapindus saponaria* también contienen saponinas esteroidales, pero en proporción mucho menor: 4.9% en las hojas de *Cestrum nocturnum*; 2.01% en las semillas de *Sapindus saponaria*. Sin embargo, el fruto de *Enterolobium cyclocarpum* contiene un porcentaje tan alto como las especies de *Dioscorea* y *Smilax* (9.30%), lo cual hace del conacaste un árbol sumamente interesante para posteriores estudios fitoquímicos con enfoque industrial. (Ver grafica 1, pagina 33).

10.- Conclusiones

- 10.1. De las distintas partes evaluadas de *Enterolobium cyclocarpum* solamente el fruto contiene saponinas, las cuales son de tipo esteroideal.

- 10.2. El fruto del árbol de conacaste contiene 9.30% de sapogeninas esteroidales, de lo cual se deduce que esta parte de la planta posee utilidad potencial en la industria farmacéutica para la elaboración de hormonas sexuales, corticosteroides (2), diuréticos y vitamina D (4).

11.- *Recomendaciones*

Es importante continuar investigando *Enterolobium cyclocarpum*, con el objeto de evaluar si existen diferencias significativas entre el contenido de sapogeninas, dependiendo del sitio de procedencia, el tiempo de recolección, altitud, latitud los cuales son factores muy importantes en la evaluación del contenido sus metabolitos.

12.- Referencias

- 12.1. Dominguez, X. Métodos de investigación fitoquímica. México. Limusa, 1985. pp : 149 -160
- 12.2. Lock de Ugaz, O. Investigación Fitoquímica; Métodos en el estudio de productos naturales. Lima, Pontificia Universidad Católica del Perú. 1988. pp: 74-65
- 12.3. Medinilla, B. Manual de Laboratorio de Fitoquímica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 1993. pp: 8-10
- 12.4. Evans, T. Farmacognosia, 13ava. ed. México: Nueva Editorial Interamericana. S.A., 1991 pp: 519-535.
- 12.5. RI international LLC, Saponin biochemistry overview. <http://www.sirius.com/delo/soapnut/spbiochem.htm>. 1985.
- 12.6. Morton, J. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Bahamas to Yucatan; Charles C. Thomas Publisher Springfield Illinois 1981. pp:314-315
- 12.7. Native Americana Medicinal Herbs http://www.gardenloeb.com/forums/load/natives/msg_05_1459022022.html. 1999.
- 12.8. Romo de Vivar, A. PRODUCTOS NATURALES DE LA FLORA MEXICANA. Limusa México. 1985. pp: 167,168,169.
- 12.9. Pardo, R. Estudio del contenido de saponinas y sapogeninas esteroidales y su transformación enzimática en tubérculos de *Dioscorea belizensis* en períodos de floración y no floración. Tesis de Graduación (Químico Farmacéutico). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala 1971. pp 40.

- 12.10. Alvarez, C. y Archila, A. Caracterización física y química del fruto de *Sapindus saponaria* (jaboncillo) y su potencial uso de industrialización como fuente de saponinas. Tesis de Graduación (Ingeniero Químico) Facultad de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1988. 60pp.
- 12.11. Fernandez, Etnobotánica de los Recursos Fitogenéticos de uso medicinal presentes en 8 municipios del área de influencia étnica Mam del departamento de Huehuetenango y Guatemala. Instituto de investigaciones agronómicas. Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1992. 138 pp.
- 12.12. Temaj, S. Cuantificación de sapogeninas esteroidales en hojas y rizomas de *Smilax lundellii*. Tesis de Graduación (Químico Farmacéutico) Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1995. 50pp.
- 12.13. Chinchilla, C. Determinación cuali-cuantitativa de sapogeninas esteroidales en hojas *Cestrum nocturnum*. Tesis de graduación (Químico Farmacéutico). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1997. 40pp
- 12.14. Oliva, P. Cuantificación de sapogeninas esteroidales en *Cestrum nocturnum* (huele de noche) mediante espectrofotometría. Tesis de graduación (Químico Farmacéutico). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1997. 32pp.
- 12.15. Porrez, V. Cuantificación de Sapogeninas Esteroidales en fruto, semillas y corteza de *Sapindus saponaria* (jaboncillo). Tesis de graduación (Químico Farmacéutico). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1999. 40pp.

- 12.16. Wagner, H. and Bladt S. Plant Drug Analysis; A thin Layer Chromatography Atlas. Berlin. Springer-verlag, 1984. pp: 225-228.
- 12.17. Stahl, E. (ed.) Drug Analysis by Chromatography and Microscopy. Ann Arbor Science. Michigan. 1973. pp: 3
- 12.18. Medinilla, B. Manual de laboratorio de Farmacognosia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, 1996. pp: 36-37.
- 12.19. Silvia M, Bittner M. y Boeneisern M. Química de los triterpenos. Washington D.C.: Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. 1992 pp: 38, 39, 40.
- 12.20. Baccou, J; Lambert, F and Sauvaire, J. Spectrophotometric Method for the determination of total Steroidal Sapogeninas. Analyst. 1977 pp: 458 - 465.
- 12.21. Nohara, T. ANALYSIS OF STEROLS AND OTHER BIOLOGICALLY SIGNIFICANT STEROIDS. USA. Academic Press, 1989. pp: 119-131.
- 12.22. Kirk, RE. y Othmer DF., Enciclopedia de Tecnología Química. México: Unión Tipográfica Hispano-Americana. Vol. 2, 14, 15 1962. pp: 603, 626. 179-187.
- 12.23 Gentry, J. Standley P. Flora of Guatemala. New York: field Museum of. Natural History 1974. Vol. XXIV pp: 30-34.

13. *Anexos*

Anexo 1

SAPONINAS ESTEROIDALES (*Triterpenos tetracíclicos*)

Las saponinas esteroidales están constituidas principalmente por derivados de espirostanol y furostanol. Aunque las moléculas de azúcar incluyen mayormente glucosa, ramnosa, xilosa y arabinosa, éstos se enlazan a grupos hidroxilo en el átomo de carbono 3, dando un oligoglicósido con una estructura ramificada. Con el aumento molecular de los azúcares en los glicósidos del espirostanol, sus características de inducir hemólisis, ser tóxicos para peces y precipitar con colesterol aumentan también (21).

Se caracterizan por poseer un esqueleto del tipo colestano. Las más numerosas son pertenecientes al grupo de las β -amirina, que salvo algunas excepciones, poseen grupos funcionales, sólo ó acompañados por funciones aldehídos, lactona y comúnmente por ácidos carboxílicos (1, 22).

Las saponinas esteroidales se encuentran íntimamente relacionadas con los glicósidos cardíacos y con los glicoalcaloides esteroidales, pues todos ellos contienen un núcleo esteroidal así como un azúcar y todos poseen la propiedad de formar espuma al ser agitados con agua. Además, este tipo de saponinas también forma compuestos moleculares insolubles con toda clase de esteroides y esteroides (22).

Las sapogeninas esteroidales son de gran interés e importancia por su relación con compuestos muy potentes y ampliamente utilizados como hormonas sexuales y corticosteroides (2), así como diuréticos, vitamina "D" y heterósidos cardíacos (4). Algunas son utilizadas como materia de partida para la síntesis de estos compuestos (4).

Hasta hace poco estaba limitada la aplicación práctica de las saponinas al uso de los extractos crudos en calidad de detergentes, agentes espumantes y venenos para los peces; pero el reciente estudio de la

estructura de las sapogeninas ha originado su empleo como material primas para la fabricación de hormonas esteroidales (22).

Sapogeninas encontradas en cantidades iguales o mayores a 0.1%, se consideran suficientes para que la planta presente interés a mayores investigaciones con fines industriales (1).

Anexo 2

ENTEROLOBIUM CYCLOCARPUM (CONACASTE)

CLASIFICACION BOTANICA DEL GENERO *Enterolobium*.

FAMILIA	Mimosaceae
GENERO	Enterolobium
ESPECIE	cyclocarpum
NOMBRE CIENTIFICO	<i>Enterolobiumcyclocarpum</i>
NOMBRE COMUN	Conacaste Aguacaste Guanacaste Oreja de coche. Oreja de mono. Cascabel, etc.

DESCRIPCION DE LA PLANTA.

Arbol gigante, de rápido crecimiento y madera suave, hasta 35 metros de alto, con una copa amplia y un tronco de 3 metros de circunferencia. Las hojas son deciduosas, con 5 o 15 subdivisiones, cada una soportan 20 a 30 pares de hojas delgadas y oblongas de 8 a 15mm de largo. Las flores son blancas, pequeñas, de 1.5 - 4 cm en diámetro, cáliz 2.5 mm de largo, densamente puberulento, corola con el doble de tamaño que el cáliz, blancuzco, puberulento o glabrate, incluido en tubo de estambre, los filamentos largos. Las semillas son café oscuras, 3 a 4 centímetros de ancho, curvas para formar un círculo como una oreja 8 a 10 centímetros a lo largo. Contienen 10 a 15 semillas ovaladas, café o negras, con un anillo amarillo alrededor de cada lado, 12milímetros de largo, duras, con un núcleo blanco. El nombre usual para *Enterolobium* es conacaste, el término es de derivación Nahuátl, significando "árbol-oreja". Este es uno de los

cuatro o cinco árboles más grandes en toda Centro América y uno de los más conocidos. Algunas veces crecen en bosques, aunque las semillas parecen ser intolerantes a la sombra y crecen mejor en lugares abiertos (6, 23).

- **ORIGEN Y DISTRIBUCION**

Es común en los planos del Pacífico, en pastos o bosques, también abundante en el Valle bajo de Motagua, en colinas secas o a lo largo de riachuelos, principalmente a 300 metros o menos; Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, El Progreso, Izabal, Zacapa, Chiquimula, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Suchitepéquez, Retalhueu, San Marcos. Sur y oeste de México (23).

- **USOS MEDICINALES**

El chicle que sale del tronco del árbol es un remedio popular para bronquitis y otras complicaciones pulmonares. El jarabe hecho de la corteza se toma para los resfriados. La decocción de unos pocos fragmentos de corteza puestos a hervir en 180cc de agua endulzada se toma (2 cucharadas cada 2 horas) en casos de hemorroides, y la fruta molida se aplica externamente sobre la hemorroides. Las hojas se aplican como compresas sobre tumores inflamados (6).

- **PROPIEDADES Y EFECTOS (incluye toxicidad)**

La corteza y semilla contienen saponinas y muchos taninos. El aserrín es tóxico para peces y ganado vacuno, y produce irritación respiratoria en carpinteros. Las semillas presentan 32 a 41% de proteínas, con alto contenido de lisina y bajo en metionina. También contienen hierro, calcio, mucho fósforo y una buena cantidad de ácido ascórbico (6).

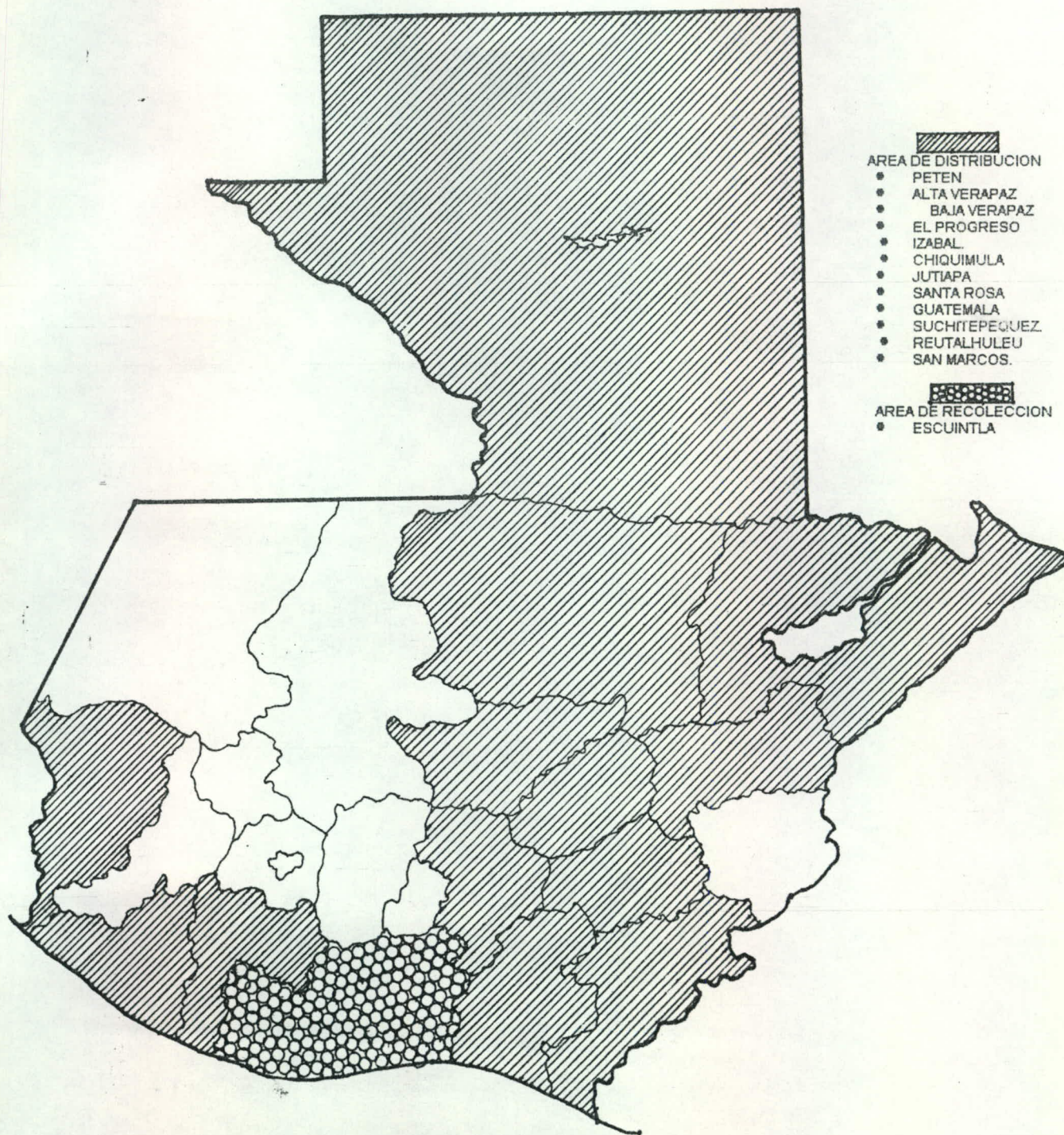
El fruto, la corteza, hojas jóvenes y semillas de *Enterolobium cyclocarpum*, son algunas veces usadas como jabón (1). A pesar de ser una planta nativa, aún no hay investigaciones en Guatemala que validen científicamente este uso.

Anexo 3
GRAFICA DE LA PLANTA .



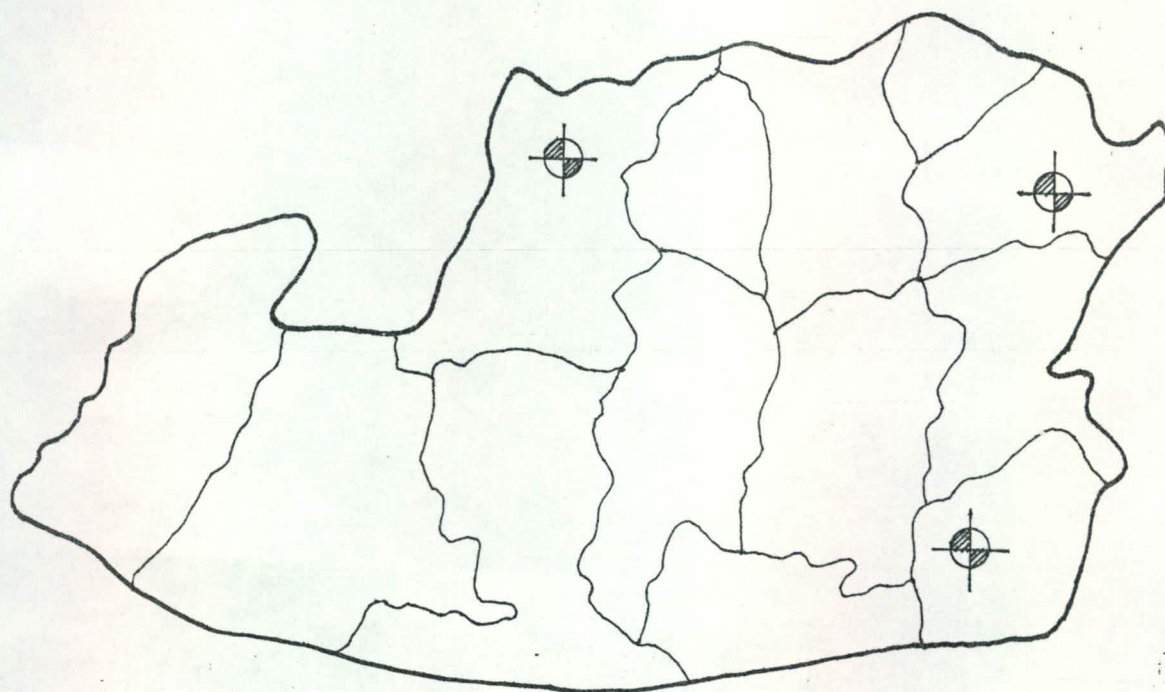
Anexo 4

MAPA DE DISTRIBUCION DE *Enterolobium cyclocarpum* EN GUATEMALA (11).



Anexo 5

MAPA DE RECOLECCION DE *Enterolobium cyclocarpum*
(conacaste) EN EL DEPARTAMENTO DE ESCUINTLA.



AREAS DE RECOLECCION

Anexo 6

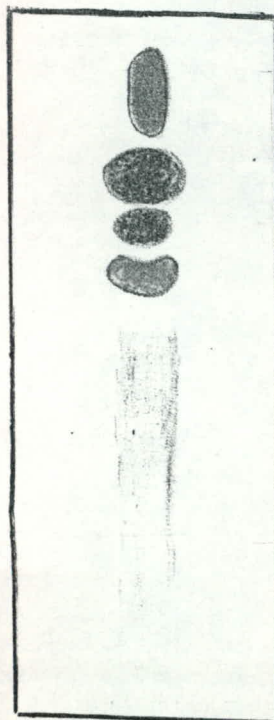
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS PARA DETECCION DE SAPONINAS EN EL FRUTO DE *Enterolobium cyclocarpum*

PRUEBA	RESULTADOS
- Test de espuma	7.5 centímetros
- Prueba de hemólisis	1.0 centímetros

PORCENTAJE DE SAPOGENINAS ESTEROIDALES EN EL FRUTO DE *Enterolobium cyclocarpum*.

N	VALORES
1	9.56%
2	9.34%
3	9.26%
4	9.26%
5	9.18%
promedio	9.32%
Desviación estándar	0.145
Error estándar	0.065

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA



Rf. 0.75

"FASE MOVIL"

Cloroformo-metanol-agua (64:50:10)

Rf. 0.67

"FASE ESTACIONARIA"

Cromatoplasmas de sílica gel 60F-254

Rf. 0.62

"DETECCION"

Rf. 0.58

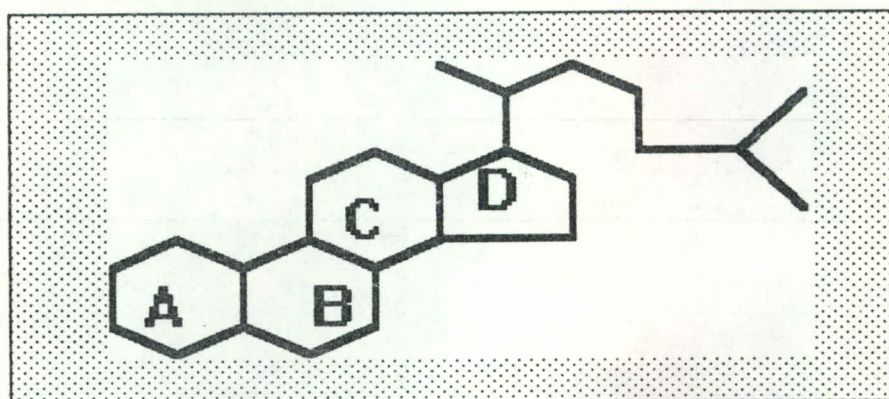
-Cloruro de Antimonio III en cloroformo al 20%.

-Observar bajo luz ultravioleta a 365 nanómetros.

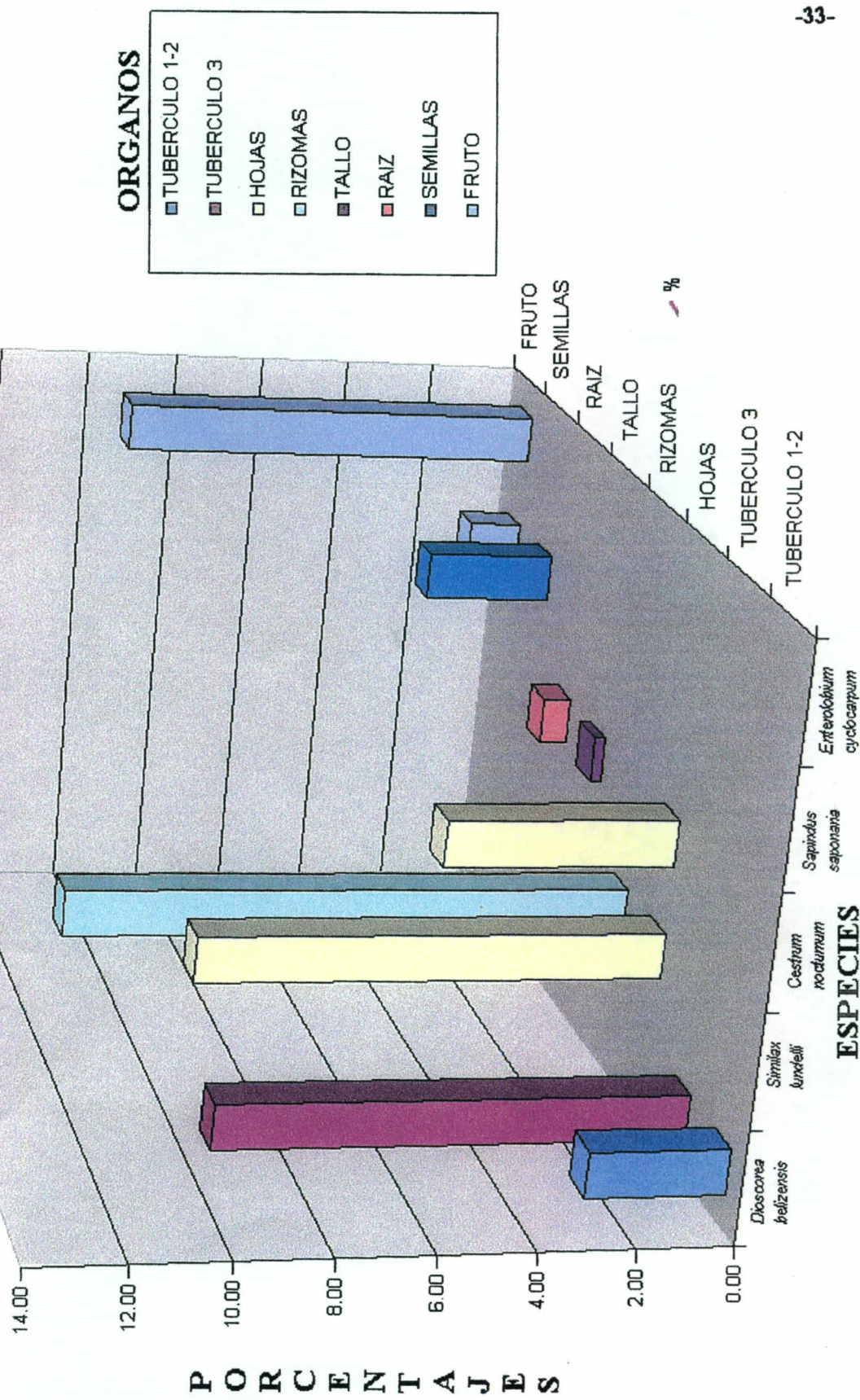
-Calentar la cromatoplasma 5 minutos a 100°C.

Anexo 7

ESTRUCTURAS DEL ESQUELETO ESTEROIDAL



PORCENTAJE DE SAPONINAS EN DIFERENTES ESPECIES
Grafica No. 1





FACULTAD DE AGRONOMIA
CIUDAD UNIVERSITARIA, ZONA 12
GUATEMALA, CENTROAMÉRICA

CONSTANCIA

A QUIEN INTERESE:

Por este medio hago constar que el material vegetal utilizado por THELMA JOHANNA VASQUEZ DE PAZ, en su estudio de investigación de tesis, corresponde a la especie *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb de la familia Mimosaceae.

Se extiende la presente en la ciudad de Guatemala a los doce días del mes de abril de mil novecientos noventa y nueve; y para los usos que a la interesada convenga, se extiende la presente.

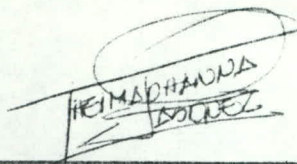
Atentamente,

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

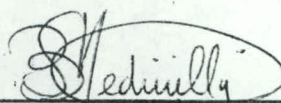
Ing. Agr. Juan José Castillo
COORDINADOR DEL HERBARIO

JJC/elsavdes

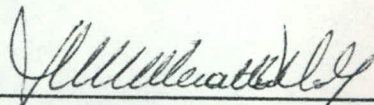




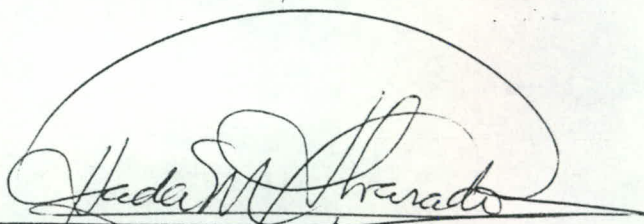
Thelma Johanna Vásquez De Paz
AUTORA



Licenciada Beatriz Medinilla A.
ASESORA



Licenciada Lucrecia Peralta de Madriz.
DIRECTORA



Licenciada Hada Marieta Alvarado Beteta.
DECANA