

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

**AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN
GRAVIMÉTRICA DE SAPONINAS
ESTEROIDALES CONTENIDAS EN
Yucca elephantipes (izote)**

Dennis Edward Santizo Corzo

Químico Farmacéutico

Guatemala, octubre de 2013

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

**AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN
GRAVIMÉTRICA DE SAPONINAS
ESTEROIDALES CONTENIDAS EN
Yucca elephantipes (izote)**

Informe de Tesis

Presentado por
Dennis Edward Santizo Corzo

Para optar al título de
Químico Farmacéutico

Guatemala, octubre de 2013

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cobar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Fayver Manuel de León Mayorga	Vocal IV
Br. Maidy Graciela Córdoba Audón	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A Dios	Por darme la vida y guiar siempre mi camino.
A mi esposa	Gabriela Coronado por todo su amor y estar siempre a mi lado.
A mis hijos	Irene, Sebastián e Ignacio por ser mi inspiración y motivación cada día y como ejemplo para su futuro.
A mis padres	Dennis Santizo y Janette Corzo de Santizo en agradecimiento por todo su cariño, esfuerzo, dedicación y ayuda en todo momento.
A mis hermanos	Alan y Cecil por el cariño y los momentos que hemos compartido, pero sobre todo por su gran apoyo.
A mi suegra	Patricia de León por toda su ayuda y cariño hacia nuestra familia.
A mis comadres y compadres	Corina, Pedro, Analú, Ricardo, Claudia y Melvin por la amistad que hemos compartido y el cariño hacia mis hijos.
A mi amigo	Guillermo Sánchez por esa amistad de tantos años y apoyo hacia mi persona y mi familia en todo momento.
A mis amigos	Cynthia, Noex, Aylin, Lucky, María Silvia, Renato y Aibi por los alegres momentos que hemos compartido.
A la facultad	de Ciencias Químicas y Farmacia
A la Universidad	San Carlos de Guatemala

AGRADECIMIENTOS

A las Licenciadas Cynthia Córdón, Lucrecia de Haase y Aylin Santizo por su ayuda y consejos para culminar este trabajo.

Al Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica por su colaboración en el estudio realizado.

A la Licenciada Beatriz Medinilla como asesora del presente trabajo.

INDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Antecedentes.....	5
4. Justificación.....	8
5. Objetivos.....	9
6. Materiales y Métodos.....	10
7. Resultados.....	16
8. Discusión.....	19
9. Conclusiones.....	21
10. Recomendaciones.....	22
11. Referencias bibliográficas.....	23
12. Anexos.....	26
13. Anexo I – Clasificación e información botánica de <i>Y. elephantipes</i>	26
14. Anexo II – Información y generalidades de las saponinas.....	30
15. Anexo III – Sitio de recolección de espécimen de <i>Y. elephantipes</i>	38
16. Anexo IV – Propuesta para aislar cada saponina por CCF y HPLC.....	39

1. RESUMEN

Yucca elephantipes es un arbusto que se encuentra desde el sureste de los Estados Unidos hasta Costa Rica. En Guatemala se ha utilizado como planta ornamental, para la construcción de cercados, o es cultivada como bosquecillos para prevenir la erosión, pero en ningún momento se ha utilizado con fines medicinales.

En todo el mundo se han realizado estudios con la finalidad de determinar qué plantas poseen saponinas esteroidales por servir de base para la síntesis de moléculas de núcleo esteroidal (ej. hormonas sexuales, corticoides, etc), por lo que se realizó una revisión de literatura exhaustiva, donde se encontró que varias especies del género *Yucca* han sido estudiadas y poseen saponinas esteroidales en una importante cantidad. Además esta investigación se apoyó en el trabajo de tesis realizado por Lurssen en el cual se cuantificó por medios espectrofotométricos la presencia de saponinas esteroidales en *Yucca elephantipes*.

El objetivo de la investigación consistió en estandarizar un método gravimétrico para poder cuantificar las saponinas esteroidales contenidas en las hojas de *Yucca elephantipes*. Las saponinas fueron extraídas de la muestra vegetal utilizando una serie de solventes de distinta polaridad, iniciando por extraer con solventes apolares todos los compuestos grasos y pigmentos que pudieran interferir en la cuantificación y análisis, hasta llegar a utilizar combinaciones de solventes polares como etanol-agua y butanol-agua, debido a que las saponinas son altamente polares.

La corroboración del producto final obtenido, la mezcla total aislada de saponinas esteroidales, se realizó por cromatografía en capa fina en donde se observaron al menos seis distintos compuestos esteroidales según coloraciones características obtenidas luego de aplicar el reactivo revelador y observar bajo luz ultravioleta a 365nm.

Utilizando este método propuesto por Munday y colaboradores se encontró que el contenido promedio de saponinas esteroidales en las hojas es del $1.1556\% \pm 0.2108$

con un coeficiente de variación de 0.3641%. Se considera que se logró obtener un porcentaje aceptable de saponinas esteroidales totales.

Al comparar estos resultados con el estudio realizado por Lurssen, realizados en la misma especie vegetal, se aprecia fácilmente una gran diferencia entre lo estimado espectrofotométricamente y lo obtenido en la cuantificación gravimétrica. Lo anterior se pudo deber principalmente a dos factores: i) la dificultad que representa trabajar un método gravimétrico con las moléculas íntegras de saponinas, ya que son productos altamente polares, higroscópicos y forman fácilmente espuma; y ii) que se trabajó utilizando una serie de solventes en un gradiente de polaridad y particiones líquido-líquido, por lo que en algún momento se basa en la afinidad que tengan los solventes con que se realizaron las distintas extracciones y constituyen aspectos de suma importancia que pudieron provocar alguna merma importante de la cantidad final obtenida de saponinas esteroidales.

Por último se considera que para facilitar el estudio de saponinas ayudaría el eliminar los monosacáridos de las moléculas de las saponinas y cuantificar únicamente las sapogeninas, que constituyen la porción de interés de las moléculas de las saponinas esteroidales y constituiría una manera más fácil para aislar, cuantificar y estudiar dichos compuestos de interés.

2.INTRODUCCIÓN

Las saponinas son metabolitos secundarios que se presentan en forma de glucósidos y se caracterizan por un número de propiedades en común como la abundante formación de espuma, actividad hemolítica, toxicidad en peces y moluscos, y la formación de complejos con el colesterol. Además las saponinas se dividen en dos grupos, las triterpénicas y las esteroidales.

El presente trabajo de investigación se enfoca principalmente en las saponinas de tipo esteroidal, por las actividades biológicas que poseen y porque fundamentalmente se constituyen en precursores de muchos medicamentos esteroidales tales como hormonas sexuales, corticoides, anticonceptivos orales, vitaminas y diuréticos, aunque se presenta el inconveniente de que las saponinas de tipo esteroidal se encuentren en menor frecuencia en la naturaleza que las del tipo triterpénico. Las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en varias familias de la clase Monocotiledónea, como son: Liliaceae, Dioscoreaceae, Amaryllidaceae (Agavaceae) y Palmae, y se caracterizan por poseer actividad anti-bacterial, anti-fúngica y por provocar reacciones tóxicas para moluscos, renacuajos y peces.

Las plantas que pertenecen al género *Yucca*, de la familia Liliaceae, son quizás las más prometedoras como fuente de esteroides, por lo que han sido estudiadas varias de sus especies, encontrándose rendimientos variables de saponinas. *Yucca elephantipes* es una planta especialmente interesante, ya que mediante cuantificación espectrofotométrica se halló un alto contenido de sapogeninas esteroidales en las partes aéreas, que oscila entre 9 y 10.5%, de lo cual se deduce su potencial utilidad, sobre todo a nivel de la industria farmacéutica (Lurssen, 2001).

Las saponinas esteroidales son compuestos que poseen una estructura compleja formada por un núcleo esteroidal hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona o genina, llamada genéricamente sapogenina.

El presente trabajo de investigación se desarrolló con el objeto fundamental de extraer, aislar y cuantificar mediante un método gravimétrico las saponinas esteroidales presentes en *Yucca elephantipes*.

3. ANTECEDENTES

Alrededor de 1950, Marker y colaboradores, después de una serie de investigaciones, llegaron a la conclusión de que ciertas preparaciones hormonales pueden ser sintetizadas a partir de sapogeninas esteroidales presentes en algunas plantas y desde entonces virtualmente todos los miembros del grupo de hormonas son preparados por conversión de las sapogeninas esteroidales derivados de plantas (Miller, 1973).

Una serie de estudios realizados entre 1976 a 1981 mostraron que un número considerable de especies del género *Yucca* de la familia Liliaceae, contienen cantidades apreciables de saponinas esteroidales. Entre las especies estudiadas se menciona: *Yucca filifera*, *Yucca filamentosa*, *Yucca schottii* y *Yucca gloriosa* (Science News, 1995).

En 1995 se publicó que al alimentar caballos con saponinas provenientes de *Yucca schidigera* se encontró actividad anti-protozoaria, matando a los esporozoitos en el intestino, pero también podría estimular el sistema inmune. Se cree que esto involucra mecanismos para prevenir infecciones microbianas y fúngicas, proporcionar protección contra virus y actuar como un espermicida (Science News, 1995).

Entre los trabajos de tesis sobre la caracterización y cuantificación de saponinas esteroidales en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala se pueden mencionar que en 1971, Pardo investigó el contenido de sapogeninas esteroidales y su transformación enzimática en los tubérculos de *Dioscorea belizensis* en el período de floración y no floración. En dicho estudio se encontró que el contenido de sapogeninas varía según la época de recolección. Es menor cuando el tubérculo tiene de 1-2 años de edad (2.9%) que cuando tiene 3 años o más (9.8%), y se llega a la conclusión de que el contenido de sapogeninas es mayor en períodos de floración que en los de no floración (Pardo, 1971).

En 1995, Temaj cuantificó las sapogeninas esteroidales de hojas y rizomas de *Smilax lundellii* (zarzaparrilla). Mediante este estudio se encontró que los rizomas poseen un mayor contenido de sapogeninas esteroidales (12.05%) en comparación con las hojas (9.82%), y que ambas porciones podrían ser de gran utilidad como fuente de materia prima para la síntesis de esteroides. Ese mismo año, Chinchilla determinó cualitativa y cuantitativamente las sapogeninas esteroidales en hojas de *Cestrum nocturnum* (huele de noche), mediante cuantificación gravimétrica. Los resultados mostraron que las hojas contienen 3.33% de sapogeninas totales, por lo que la especie podría ser de utilidad como materia prima para la síntesis de esteroides puesto que el contenido es mayor del 0.1%. Dos años después, Oliva evaluó mediante espectrofotometría el contenido de sapogeninas esteroidales en esta misma planta. En comparación con el trabajo anterior, con este método se encontró un porcentaje mayor en las hojas (4.9%) y una proporción mucho menor en la raíz (0.62%) y el tallo (0.23), llegando a establecerse que todas las porciones evaluadas de la planta podrían ser de utilidad como materia prima para la síntesis de esteroides puesto que en todos los casos se obtuvo más del 0.1%. (Temaj, 1995; Chinchilla, 1995; Oliva, 1997)

En 1999, Porres cuantificó las sapogeninas esteroidales contenidas en frutos, semillas, corteza de *Sapindus saponaria* (jaboncillo), mediante espectrofotometría. Encontró que las semillas poseen un mayor contenido de sapogeninas esteroidales (2.81%) en comparación con el fruto (1.175%) y la corteza (0.04%), por lo cual al haber un contenido mayor del 0.1%, la porción de la planta estudiada podría ser de utilidad como materia prima para la síntesis de esteroides. Mientras que al año siguiente Quevedo investigó la variabilidad en cuanto al contenido de sapogeninas esteroidales en muestras de esta misma especie, pero procedentes de cuatro departamentos de Guatemala (Sacatepéquez, Santa Rosa, Baja Verapaz y Huehuetenango). De acuerdo al estudio efectuado, todas las plantas procedentes de los distintos departamentos contienen un porcentaje mayor de 0.1%, por lo que podrían ser de utilidad como materia prima para la síntesis de núcleos esteroidales, y la muestra proveniente de Huehuetenango es la que presentó mayor concentración (3.66%), seguida por la de Baja Verapaz (3.50%), la de Sacatepéquez (2.40%) y por último la

proveniente de Santa Rosa (1.62%). En ese mismo año Vásquez cuantificó las sapogeninas esteroidales de *Enterolobium cyclocarpum* (conacaste) mediante espectrofotometría. Encontró que los frutos contienen 9.30% de sapogeninas totales, por lo que los frutos podrían ser de utilidad para la síntesis de esteroides, puesto que el rendimiento es mayor del 0.1% (Porres, 1999; Quevedo, 2000; Vásquez, 2000).

Por último en el año 2001, Lurssen cuantificó las sapogeninas esteroidales en flores, hojas y tallos de *Yucca elephantipes* (izote), mediante espectrofotometría. En el respectivo informe se menciona que las flores poseen mayor contenido de sapogeninas esteroidales (10.57%) en comparación con el tallo (10.28%) y las hojas (9.83%), por lo cual todas las porciones de la planta podrían ser de gran utilidad para la síntesis de esteroides, ya que el contenido es mayor al 0.1% (Lurssen, 2001).

De acuerdo a la revisión bibliográfica efectuada, no se encontró información referente a estudios efectuados con respecto al aislamiento y cuantificación mediante un método gravimétrico de las saponinas esteroidales presentes en *Yucca elephantipes*.

4. JUSTIFICACIÓN

Las saponinas esteroidales son precursores de muchos medicamentos esteroidales tales como hormonas sexuales, corticosteroides, contraceptivos orales, vitaminas, diuréticos, y virtualmente todos los miembros del grupo de hormonas son preparados por conversión de las sapogeninas esteroidales derivadas de plantas.

En Guatemala, debido al poco acceso a fuentes bibliográficas actualizadas, carencia de recursos económicos y limitantes en cuanto a disponibilidad de equipo adecuado, se hacen grandes esfuerzos por efectuar investigaciones con respecto a la separación y purificación de compuestos saponínicos, ya que se tiene conocimiento que en el extranjero se utilizan los núcleos esteroidales como materia prima para la síntesis de compuestos relacionados.

Existen plantas nativas que son conocidas por su alto contenido en saponinas esteroidales, como es el caso del izote (*Yucca elephantipes*). Por ello surge la necesidad de establecer un procedimiento para el aislamiento de las saponinas contenidas en *Yucca elephantipes* y evaluar si esta planta contiene un porcentaje adecuado de saponinas esteroidales totales al cuantificarse gravimétricamente, ya que al cuantificarse espectrofotométricamente se encontró que posee un alto contenido de sapogeninas esteroidales que oscila entre 9.5 y 10.5%, según la parte de la planta que se estudie.

Además, a partir del aislamiento de las saponinas presentes en *Yucca elephantipes*, se podrían efectuar otras investigaciones, en donde se aislen cada una de estas saponinas y diluciden sus respectivas estructuras químicas por medio de otras técnicas analíticas (como HPLC, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y pruebas fisicoquímicas). Así mismo la elucidación de las estructuras químicas permitiría elegir el proceso de síntesis más adecuado, factible y sobre todo económico para la obtención de los compuestos esteroidales.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL:

- 5.1.1. Aplicar la metodología para determinar el contenido de saponinas esteroidales en *Yucca elephantipes*.

5.2. ESPECÍFICOS:

- 5.2.1. Estandarizar un método gravimétrico para la extracción y aislamiento de saponinas esteroidales.
- 5.2.2. Cuantificar las saponinas esteroidales contenidas en las hojas de *Yucca elephantipes*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. UNIVERSO DE TRABAJO:

Estuvo constituido por las hojas desecadas de ejemplares de *Yucca elephantipes* (izote), colectadas en el municipio de San Raymundo, departamento de Guatemala.

6.2. MATERIALES:

6.2.1. Recursos Humanos:

Autor: Br. Dennis Edward Santizo Corzo

Asesora: Licda. Beatriz Eugenia Medinilla Aldana,
Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica

6.2.2. Recursos Institucionales:

- Laboratorio del Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Herbario "José Ernesto Carrillo" de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Departamento de Análisis Aplicado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Unidad de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

6.2.3. Recursos Materiales:

Materiales y Equipo de Laboratorio

- Cristalería: Ampolla de decantación, probetas de 5, 10, 25, 50 y 100ml, pipetas de 1.0, 5.0, 10.0 y 25.0ml, embudos, balones aforados de 10 ml, varilla de agitación, refrigerantes, balones con cuello esmerilado 250 y 500ml.
- Molino de cuchillas marca Willey Mill modelo No. 3

- Balanza analítica
- Campana de extracción de gases
- Hornos eléctricos GS Blue M modelo SW 17TA-1
- Cámaras cromatográficas de vidrio
- Placas cromatográficas de sílica gel 60 F-254 (Merck)
- Cámara de luz ultravioleta con lámpara de 365 nm
- Evaporador rotatorio marca Büchi
- Bomba de vacío
- Cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) LaChrom Merck Autosampler L-7200
- Columna LiChroCART 125-4 LiChropher 100 RP-18 con precolumna RP-18
- Filtros de membrana de 0.45µm

Reactivos

- Hexano grado reactivo
- Metanol grado reactivo
- Diclorometano
- Alcohol n-butílico grado reactivo
- Alcohol etílico absoluto
- Cloroformo grado analítico
- Cloruro de antimonio III
- Acetona grado reactivo
- Agua destilada

6.3. PROCEDIMIENTO:

6.3.1. Revisión bibliográfica referente al proyecto de investigación

Recopilar la información necesaria con respecto a procedimientos de extracción y aislamiento de saponinas esteroideas.

6.3.2. Recolección del material vegetal

Recolectar el material vegetal a estudiarse en el municipio de San Raymundo, departamento de Guatemala.

6.3.3. Caracterización de la planta

Caracterizar la planta desde el punto de vista botánico en el Herbario "José Ernesto Carrillo" de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, por el Ingeniero Agrónomo Juan José Castillo.

6.3.4. Dsecación del material vegetal

Fraccionar el material vegetal recolectado a porciones de aproximadamente 1 cm y desecar en horno a una temperatura comprendida entre 30 a 35° centígrados.

6.3.5. Caracterización de las saponinas mediante cromatografía en capa fina (Wagner, 1984)

Preparación del extracto

Extraer 1g del material vegetal pulverizado con 5 mL de metanol, calentando en baño de maría. Evaporar hasta aproximadamente 1 mL.

Fase estacionaria

Cromatoplasas de sílica gel 60 F-254

Fase móvil

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

Preparar la mezcla según las proporciones. Debe emplearse cloroformo grado analítico (el de grado técnico contiene alcohol), la cromatografía debe

realizarse a 20°C, y 30 minutos después de añadir los solventes, para saturar la cámara. A temperaturas mayores la separación de las saponinas no es la adecuada.

Detección

Reactivo de cloruro de antimonio III

Preparar una solución de cloruro de antimonio III al 10% en cloroformo.

Asperjar la cromatoplaca, luego calentar por 5-6 minutos a 110°C.

Evaluar en visible (colores rojo-violeta) o bajo luz ultra violeta de 365 nm (fluorescencia rojo-violeta, celeste y verde).

6.3.6. Aislamiento de las saponinas esteroidales (Munday, 1993)

- Pulverizar el material vegetal desecado en un molino de cuchillas utilizando un mesh # 100.
- Extraer el material vegetal pulverizado con hexano a temperatura ambiente mediante maceración, realizando cambios del solvente extractor cada 24 horas hasta que el extracto hexanoico no presente coloración verde-ocre. Este paso es muy importante, ya que se extraen los productos grasos, que junto a los pigmentos dificultan el aislamiento de los productos polares de interés.
- Secar el material vegetal obtenido para remover el solvente residual.
- Pesar 50 g del material vegetal y someter a reflujo por 30 minutos con 350 mL de diclorometano, filtrar por gravedad. Luego descartar el filtrado.
- Secar con aire a presión el material vegetal extraído, y someter a reflujo con etanol-agua 17:3 (500 mL) por 3 horas y filtrar.
- Concentrar el filtrado al vacío y llevar el volumen a 50 mL con agua. Saturar la solución con cloruro de sodio.
- Extraer las saponinas con 1-butanol saturado con agua (5 porciones de 50 mL), y remover el solvente al vacío.

- Agregar metanol al material sólido (20 mL) y filtrar por gravedad, dejando caer sobre acetona (200 mL). El precipitado resultante es el crudo de saponinas y se recupera filtrándolo por gravedad.

6.3.7. Corroboración del aislamiento de las saponinas esteroideas (Medinilla, 1999)

- Disolver el crudo de saponinas con 2 mL de metanol y transferir a un balón aforado de 5 mL y llevar a volumen con metanol.
- Realizar aplicaciones puntuales con capilares con un volumen de 35 μ L de esta solución de saponinas sobre una placa cromatográfica de sílica gel 60 F-254 (Merck), dejando una separación de un centímetro entre cada aplicación.
- Desarrollar las placas cromatográficas utilizando como fase móvil cloroformo-metanol-agua en proporciones 64:50:10.
- Asperjar el reactivo de cloruro de antimonio III, el cual permite observar las saponinas en una cámara de luz ultravioleta a una longitud de onda de 365nm y evaluar en visible la aparición de colores rojo-violeta y bajo luz ultra violeta a 365 nm la aparición de fluorescencia rojo-violeta, celeste y/o verde.

6.4. DISEÑO ESTADÍSTICO DE LA INVESTIGACIÓN

Realizar la cuantificación gravimétrica del crudo de saponinas a partir de un muestreo no probabilístico a conveniencia, de la planta *Yucca elephantipes* recolectada en el municipio de San Raymundo, departamento de Guatemala.

La muestra la constituyen las hojas desecadas de la planta a estudiar *Yucca elephantipes*. Repetir la cuantificación gravimétrica del crudo de saponinas diez veces para que tenga validez estadística.

Evaluar los resultados por medio de estadística descriptiva, la cual incluye las siguientes medidas: media, desviación estándar y coeficiente de variación. Estas pruebas solo se utilizarán para la cuantificación del total de saponinas.

7. RESULTADOS

Tabla No. 1
CUANTIFICACIÓN GRAVIMETRICA DE SAPONINAS
ESTEROIDALES CONTENIDAS EN *Yucca elephantipes*

Muestra No.	Peso muestra vegetal utilizada (gramos)	Peso de saponinas esteroideas extraídas (gramos)	Saponinas esteroideas extraídas (%)
1	50.0585	0.4875	0.9739
2	50.0324	0.4963	0.9920
3	50.0810	0.7042	1.4061
4	50.0177	0.2997	0.5992
5	50.0990	0.7891	1.5751
6	50.0842	0.8161	1.6295
7	50.0684	0.6269	1.2517
8	50.0710	0.8671	1.7318
9	50.0984	0.3631	0.7252
10	50.0407	0.3365	0.6717
PROMEDIO	50.0651	0.5787	1.1556
Desv. Std.	0.0276	0.2108	0.4208
Coeficiente de variación (%)	0.0006	0.3643	0.3641

Tabla No. 2
**RESULTADOS DE LOS CROMATOGRAMAS OBTENIDOS
DURANTE LAS DISTINTAS FASES DE LA METODOLOGÍA
EN LAS HOJAS DE LA PLANTA *Yucca elephantipes***

	[a]	[b]	[c]	[d]	[e]	[f]	
Mancha No.	Muestra vegetal sin tratamiento químico	Muestra vegetal posterior a la extracción con hexano	Muestra vegetal posterior a la extracción con diclorometano	Extracto etanólico previo a la partición con butanol	Extracto butanólico previo a la precipitación en acetona	Total de saponinas esteroidales	Coloración (luz UV 365nm)
	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	
1	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	Rojo intenso
2	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	Rojiza-anaranjada
3	-----	-----	-----	-----	0.85	0.85	Amarillo
4	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	Celeste difuso
5	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	Verde-amarillento
6	-----	-----	-----	-----	0.54	0.54	Celeste
7	0.4400	0.44	0.44	0.44	-----	-----	Anaranjado
8	0.3200	0.32	0.32	0.32	-----	-----	Rojiza-anaranjada

Fase móvil: CLOROFORMO - METANOL - AGUA (64:50:10)

Fase estacionaria: CROMATOPLACA DE SILICA GEL 60 F₂₅₄

Revelador: CLORURO DE ANTIMONIO III al 10% en CLOROFORMO

FIGURA No. 1
CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DURANTE
LAS DISTINTAS ETAPAS DE EXTRACCIÓN HASTA
LA OBTENCIÓN DEL TOTAL DE SAPONINAS ESTEROIDALES

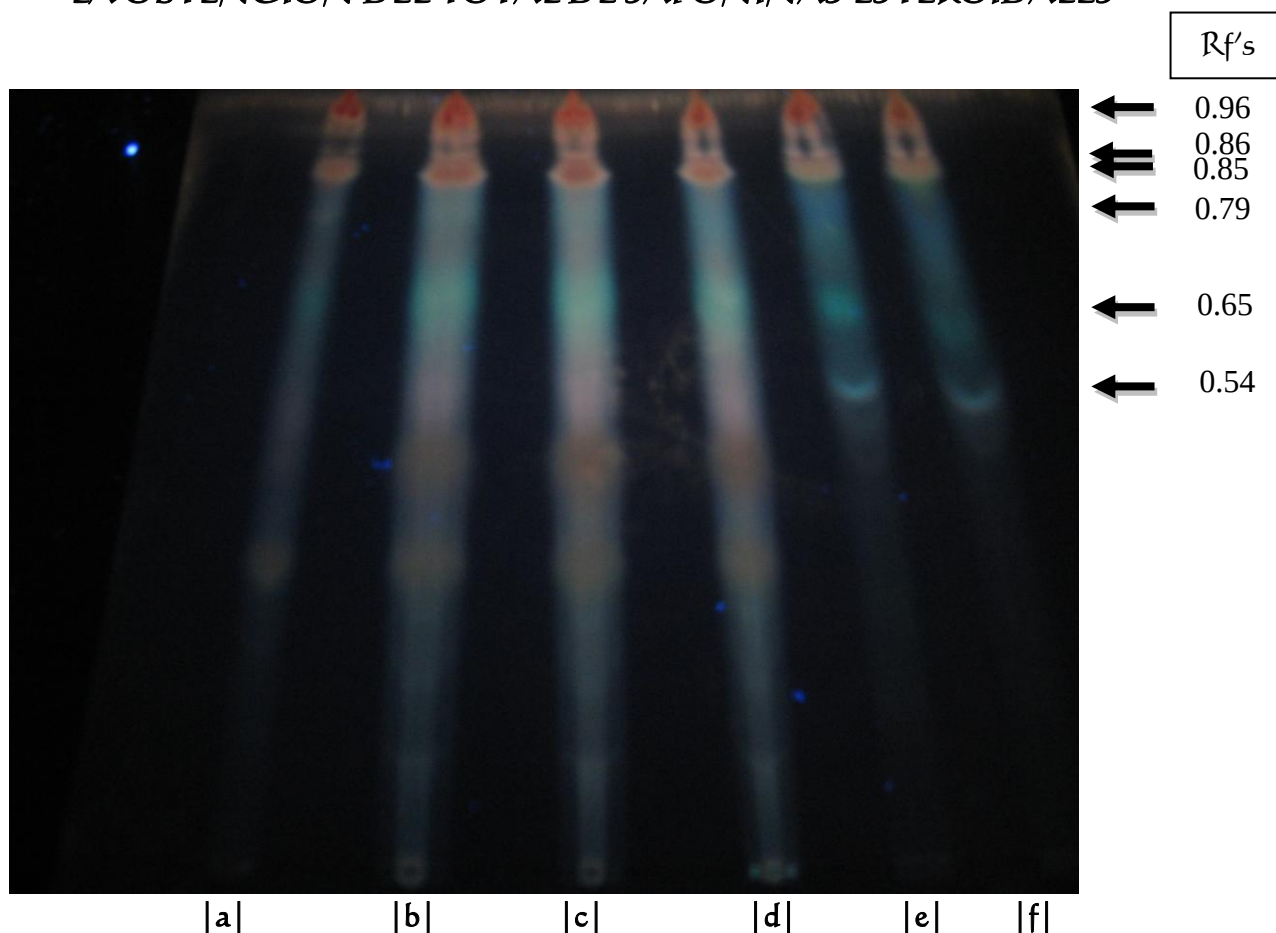


Figura 1 - Cromatograma en capa fina observado bajo luz ultravioleta a 365nm utilizando el revelador de cloruro de antimonio III en las distintas etapas de extracción y aislamiento de saponinas de *Yucca elephantipes*:

- [a] extracto metanólico sin tratamiento químico alguno de la muestra vegetal;
- [b] extracto metanólico de la muestra vegetal posterior al tratamiento con hexano;
- [c] extracto metanólico de la muestra vegetal posterior al tratamiento con diclorometano;
- [d] extracto etanólico obtenido del reflujo con mezcla de etanol-agua al que fue sometido la muestra vegetal;
- [e] extracto metanólico previo a la precipitación de las saponinas con acetona, obtenido de la extracción con 1-butanol ; y
- [f] saponinas esteroideas aisladas (R_f 's marcados a la izquierda de la cromatoplaaca)

Los distintos R_f obtenidos están representados en la Tabla No. 2

8. DISCUSIÓN

Para iniciar se realizó la caracterización de las saponinas del extracto metanólico de las hojas de *Yucca elephantipes* sin ningún tratamiento químico con el revelador de cloruro de antimonio III. Donde se pudo observar bajo luz ultravioleta de 365nm, que las hojas poseían al menos seis saponinas de tipo esteroidal, existiendo la posibilidad de que hubieran un número mayor de estos compuesto por encontrarse algunas bandas traslapadas.

Según el método establecido por Munday y colaboradores, se logró determinar que el contenido promedio de saponinas esteroidales fue de 0.5787g por cada 50g de material vegetal seco pulverizado, lo cual equivale a 1.16% en la muestra vegetal, es decir 11.6 veces al valor de 0.1%, considerado como mínimo para ser aceptado industrialmente en la elaboración de hormonas sexuales, corticosteroides y vitamina D. El análisis estadístico demostró poca dispersión de los datos según la desviación estándar (0.2108) y el coeficiente de variación (0.3641%) obtenidos.

Al evaluar detenidamente el cromatograma obtenido de las saponinas esteroidales aisladas por cromatografía de capa fina, se produjeron seis manchas bien diferenciadas con R_f 's mayores a 0.5, de las cuales se puede inferir que eran saponinas esteroidales debido a las coloraciones características (fluorescencia rojo-violeta, celeste y/o verde) bajo el efecto del revelador y la exposición a luz ultravioleta.

Además al comparar los resultados obtenidos contra el estudio realizado por Lurssen en la misma especie se aprecia fácilmente una gran diferencia entre lo estimado espectrofotométricamente (entre 9.5 a 10%) y lo obtenido en la cuantificación gravimétrica, dicha diferencia se pudo deber a los siguientes puntos críticos:

- i. Las saponinas son metabolitos vegetales muy complicados de estudiar debido a su alta polaridad, son moléculas altamente higroscópicas y tienden a formar abundante espuma en soluciones acuosas, lo cual dificulta el concentrar estos extractos y separar estos compuestos por medio de particiones líquido-líquido.

- ii. Las particiones líquido- líquido se deben realizar exhaustivamente para lograr extraer la mayor cantidad de saponinas, debido a su gran afinidad al agua en soluciones acuosas.
- iii. Diferencias en los estudios realizados, ya que Lurssen cuantifico por espectrofotometría sapogeninas, el sitio de recolección, época de recolección, así como condiciones ambientales.

También se puede observar en la tabla No. 2 y la Figura No. 1 que en todas las etapas realizadas de extracción y aislamiento se mantuvo un monitoreo constante sobre la presencia de las saponinas por medio de cromatografía en capa fina y se pudo observar cómo varios de los compuestos con un R_f menor de 0.5 ya no aparecen en las últimas etapas del aislamiento. Estos eran considerados como posibles saponinas esteroidales debido a la coloración rojiza obtenida al aplicar el reactivo revelador y bajo luz ultravioleta de 365nm, lo cual puede ser debido a que se trabajó con un gradiente de polaridad de apolar a polar y estos compuestos ya no se trasladaron en la partición líquido-líquido con 1-butanol y no fueron cuantificados en el concentrado final de saponinas esteroidales y podría explicar en parte el bajo porcentaje obtenido.

9. CONCLUSIONES

- 9.1. Las hojas de la planta *Yucca elephantipes* contienen al menos seis saponinas de tipo esteroidal
- 9.2. Según el método establecido por Munday y colaboradores se determinó que el contenido medio de saponinas esteroidales en esta especie es de 1.16% en base a su peso seco.
- 9.3. Una causa de la diferencia entre los resultados obtenidos entre el presente estudio de cuantificación gravimétrica y el estudio realizado por Lurssen utilizando un método espectrofotométrico, fue que una porción de saponinas no se logro extraer en las particiones líquido-líquido realizadas con 1-butanol.
- 9.4. Es muy complicado trabajar un método gravimétrico con las moléculas integras de saponinas, ya que son productos altamente polares, higroscópicos y forman espuma fácilmente.

10. RECOMENDACIONES

- 10.1. Continuar con el aislamiento de las saponinas esteroidales presentes en las hojas de la planta *Yucca elephantipes*.
- 10.2. Dilucidar la estructura química de las saponinas esteroidales contenidas en las hojas de *Yucca elephantipes*.
- 10.3. Tomar como base los métodos utilizados en la presente investigación para el estudio del contenido de saponinas esteroidales presentes en troncos y flores de *Yucca elephantipes*.
- 10.4. Evaluar si el contenido de saponinas esteroidales varía según la época del año o el área de recolección.
- 10.5. Realizar un estudio comparativo para establecer las posibles diferencias entre un estudio espectrofotométrico y un estudio gravimétrico en esta especie vegetal.
- 10.6. Seguir realizando estudios de cuantificación gravimétrica en ésta y otras plantas que contengan saponinas esteroidales mediante el aislamiento y cuantificación de las sapogeninas, que constituyen la porción de interés de las moléculas de las saponinas esteroidales y constituiría una manera más fácil para aislar, cuantificar y estudiar dichos compuestos de interés.

11. REFERENCIAS

- Chinchilla C. Determinación cuali-cuantitativa de saponinas esteroidales en hojas de Cestrum nocturnum. Tesis de graduación Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1995. pp. 1-3, 40
- Curso de Farmacognosia y Fitoquímica, Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. 2001. <http://huitoto.udea.edu.co/~farmacogfit/>
- Domínguez, X. Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa. México. 1985. pp 149-155.
- Lalitha T., Seshadri R. & Venkataraman L. Isolation and Properties of Saponins from Madhuca butyracea Seeds. Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 35. 1987. pp 744-748.
- Levin, J. Fundamentos de estadística en la investigación social. 2 edición. Editorial Harla. México. 1979. pp. 424, 59-66.
- Lurssen, L. Cuantificación de saponinas esteroidales en *Yucca elephantipes* (izote). Tesis de graduación Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2001. pp. 1-3, 22.
- Mahato S., Ganguly N. & Sahu N. Steroid saponins. Phytochemistry. Vol. 21. No. 5. 1982. pp. 959-978.
- Medinilla, B. Manual de Fitoquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1999. pp. 8-9.
- Miller, L. Phytochemistry: organic metabolites. Van Nostrand Reinhold Company. EEUU. 1973. pp. 189-193.
- Munday S., Wilkins A., Miles C. et al. Isolation and Structure Elucidation of Dichotomin, a Furostanol Saponin Implicated in Hepatogenous Photosensitization of Sheep Grazing Panicum dichotomiflorum. Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 41. 1993. pp 267-271.
- Nes, D. & Parish, E. Analysis of Sterols and Other Biologically Significant Steroids. Academic Press. EEUU. 1989. pp. 119-125.

- 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. pp. 1-3, 32.
- Pardo, M. 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. 1-3, 40.
- Porres, 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. pp. 1-3, 40.
- Quevedo, M. Cuantificación de sapogeninas esteroidales en muestras de Sapindus saponaria procedentes de cuatro departamentos de Guatemala. Tesis de graduación de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2000. pp. 1-4, 21.
- Romo de Vivar, A. Productos Naturales de la Flora Mexicana. Limusa. México. 1985. pp. 200-206.
- Science News. Scientist tout the value of Saponins. Vol. 148. 1995.
- Silvia, M. et al. Química de los Triterpenos. Organización de los Estados Americanos. Chile. 1992. pp 67-85.
- Temaj, S. Cuantificación de sapogeninas esteroidales en hojas y rizomas de Smilax lundelli. Tesis de Graduación Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1995. pp. 1-3, 50.
- Vásquez, T. Cuantificación de sapogeninas esteroidales en Enterolobium cyclocarpum (conacaste). Tesis de graduación Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2000. pp. 1-3, 17.

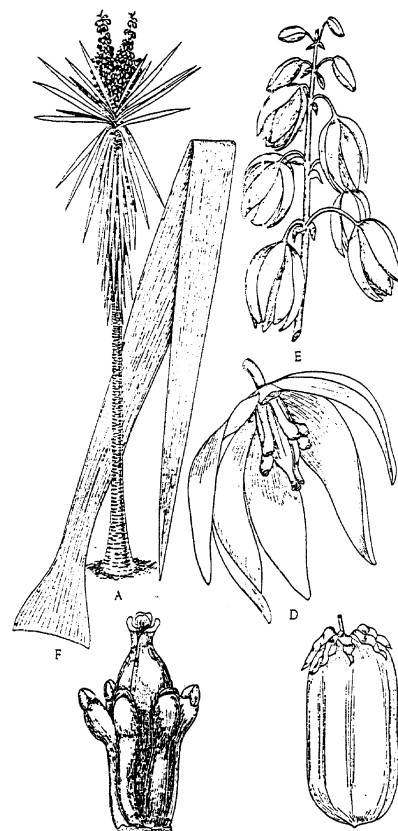
- Wagner, H. et al. Analysis and standarization of pharmaceutical and plant preparations by HPLC and other chromatographic methods. Journal Deutsch Apoth. Ztg. 1985. Vol. 125. No. 30. pp. 1513-1518.
- Wagner, H. et al. Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography Atlas. Editorial Springer-Verlag. Germany. 1984. pp. 225-226, 244.
- Yang T., Kasaj R., Zhou J. et al. Dammarane saponins of leaves and seeds of Panax notoginseng. Phytochemistry. Vol. 22. No. 6. 1983. pp. 1473-1478.

12. ANEXOS

ANEXO No. 1

Clasificación Botánica

Reino:	Vegetal
Sub-Reino:	Embriobionta
División:	Magnoliofita
Clase:	Liliópsida
Sub-Clase:	Liliade
Orden:	Liliales
Familia:	Liliaceae
Género:	<i>Yucca</i>
Especie:	<i>Yucca elephantipes</i>
Nombre común:	Izote



Familia Liliaceae

Hierbas o arbustos perennes, raramente arborescentes, frecuentemente con rizomas o bulbos, la raíz fibrosa frecuentemente delgada y carnosa o como tubérculo; tallo herbáceo o leñoso, algunas veces escandente, folioso, o desnudo; inflorescencia muy variable en forma, las flores pequeñas o frecuentemente largas y llamativas, usualmente perfectas y regulares; perianto inferior y separado del ovario, o raramente adnado a su base, usualmente marcescente y persistente, como corola, los segmento libres o más o menos unidos, normalmente 6, más o menos biserial; estambres usualmente 6, hipogino o adherido al perianto, los segmentos opuestos, los filamentos libres o connatos; anteras largas o cortas, basifija o dorsifija, 2 lóculos, los lóculos dehicentes usualmente mediante un corte longitudinal; ovario superior a parcialmente inferior, usualmente 3 lóculos, raramente 1 lóculo, con placenta axial, el estilo filiforme o columnar, con un pequeño, terminal, capitado o 3 estigmas lobados, o los estilos

algunas veces 3 y apical; óvulos 2 en cada celda; fruto abayado e indehisciente, regularmente seco y capsular y dehisciente loculicidal o septicidal; semillas muchas o pocas, algunas veces por aborción solamente 1; endosperma copioso.

Género *Yucca* L.

Plantas con un cáudice leñoso, acaulescente, o frecuentemente arbóreo, simple o ramificado; hojas agrupadas al ápice del cáudice o a sus ramas, linear-lanceolada, delgadas y rígidas o raramente delgadas y suaves, usualmente espinosa en el ápice, los márgenes enteros o separados en fibras gruesas; flores blancas o crema, en muy largas panículas terminales, pediceladas, pendulosa; perianto persistente, los segmentos distintos o o aproximadamente, lance-ovado, bastante carnosos, más o menos connivente para formar una flor subglobosa; estambres 6, hipoginos, erectos, mucho más cortos que el perianto, los filamentos bastante firmes; anteras pequeñas, sésil al ápice de los filamentos, introrsamente dehisciente; ovario sésil, el estilo columnar, pequeño, dividido en el ápice en 3 lóbulos que son estigmatosos por dentro; óvulos numerosos en cada lóbulo; fruto carnosos y pulposos o esponjosos e indehiscientes, frecuentemente secos y dehiscientes loculicidal; semillas negras, comprimidas fuertemente.

Aproximadamente 25 especies se encuentran en el sur y especialmente sudoeste de los Estados Unidos, México, y este de las Indias. Solamente la especie *Yucca elephantipes* es conocida en América Central, siendo probable que no sea nativa.

Yucca elephantipes Regel

Nombres comunes:

Izote

Palmera (Petén);

Cukil, Quiil, Co'quil (Alta Verapaz, Kekchí);

Pasquiy (Chimaltenango);

Pasqui (Totoncapán)

Común en cultivos o en cercos y bosquecillos por todas partes en tierras bajas y ascendiendo comúnmente en las montañas a elevaciones medias (aproximadamente a 1500 metros); regularmente se han visto arriba de los 2700 metros o posiblemente a un nivel mayor; Petén; Alta Verapaz; Jalapa; Escuintla; Huehuetenango; San Marcos; probablemente en todos los departamentos. Honduras Británica; generalmente distribuida en cultivos en América Central, hacia el sur por lo menos en Costa Rica, también en México.

Plantas usualmente arbóreas, con una corona columna delgada, y unas pocas ramas delgadas pequeñas, el tronco y partes inferiores de las ramas desnudas, la corteza bastante áspera; hojas como daga, rígidas y duras, de un metro de longitud o usualmente más cortas, con márgenes ásperos, con puntas muy afiladas; flores blancas o blanco cremoso, campanuladas, de aproximadamente 4 cm de largo; fruto carnoso, oblongo-ovoide, con carnsa blanca o amarillenta y un corazón con consistencia del papel.

Conocida en Costa Rica como "itabo", un nombre indio, pero casi en todas partes en América Central se conoce como "izote", una palabra derivada del Nahuatl que significa jabón. El nombre Maya reportado de Yucatán es "tuc". En Guatemala la planta es conmemorada geográficamente por el caserío de El Hizote en el Departamento de Santa Rosa (la "H" es absolutamente superflua). El árbol es ornamental, y por dicha razón regularmente es plantada en casas, especialmente para construir cercados. En algunas regiones, como Coatepeque, ésta es plantada como bosquecillos en bajadas empinadas para prevenir la erosión. Es vista frecuentemente, también, en cementerios. La mayoría de las plantas están quizás entre 3 a 4 metros de altura, frecuentemente existen más altas y posiblemente tan alto como 10 metros. Muchas plantas tan altas y regularmente con muchas ramas individuales han sido vistas en Cobán, Retalhuleu, y Patulul.

Las suculentas flores son utilizadas como alimento. Estas tienen un leve sabor amargo pero un sabor agradable finalmente, y constituye un vegetal apetitoso. Usualmente son sumergidas en huevo y fritas, o mezcladas con trozos de carne, y algunas veces se combinan con otros vegetales para preparar ensaladas.

ANEXO No. 2

SAPONINAS

Se conoce con el nombre de saponinas (del latín sapon = jabón) a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de ésta; por lo tanto, al agitar su solución se forma abundante espuma, relativamente estable. (Wagner, 1985)

Las saponinas en forma de coloides hidrofílicos son impermeables en membranas animales.

Todas las saponinas causan hemólisis, por lo tanto son tóxicas para el organismo animal cuando son administradas parenteralmente (1.5 mg/kg de peso es letal). (Science News, 1995)

Mediante hidrólisis de las saponinas se obtienen azúcares y una aglicona, llamada genéricamente sapogenina, la cual puede tener una estructura esteroideal (tipo espirostano) o triterpénico (tipo β -amirina). (Wagner 1985; Domínguez, 1985)

SAPONINAS TRITERPENOIDES.

Tipo de saponinas que poseen el sistema de anillo oleanano, o más raramente ursano o damarano. Muchas son ácidas, debido a la presencia de 1 o 2 grupos carboxilos en la aglicona y/o un grupo azucarado. Otros grupos que contienen oxígeno pueden estar también presentes en las sapogeninas (OH, CH₂OH o CHO). (Science News, 1995)

El carbohidrato usualmente contiene de una a seis unidades de monosacáridos, de los cuales los más comunes son la glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa. (Romo de Vivar, 1985)

SAPONINAS ESTEROIDALES.

Las saponinas esteroideas son glicósidos esteroideas con un núcleo espirostanol que tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos, forman espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas. (Silvia, 1992)

La reacción hemolítica, así como la toxicidad en peces son características de las saponinas. Las saponinas esteroideas tienen la característica adicional de formar “complejos moleculares” con los esteroides que son levemente solubles en agua, como el colesterol. La formación de este complejo podría llegar a ser la causa de muerte cuando se administra parenteralmente. (Curso de Farmacognosia y Fitoquímica Antioquia, 2001)

Otra característica especial de las saponinas esteroideas es la presencia de un grupo acetal o cetona en la cadena lateral de la molécula debido a la simetría del carbono (C-22) de la aceto-cetona. Dichas saponinas pueden existir en forma trans o cis. Además, estas saponinas poseen menos unidades azucaradas que las saponinas triterpenoides, que están constituidas principalmente por glucosa, ramnosa, xilosa y arabinosa, que están unidos al grupo hidroxilo en el C-3 como un oligoglicósido, con una estructura ramificada. (Science News, 1995; Curso de Farmacognosia y Fitoquímica Antioquia, 2001)

Con el incremento del peso molecular debido a la porción azúcar en los glicósidos espirostanol, las características de hemólisis, toxicidad en peces, precipitación con colesterol y actividad anti-fúngica tienden a aumentar. (Curso de Farmacognosia y Fitoquímica Antioquia, 2001)

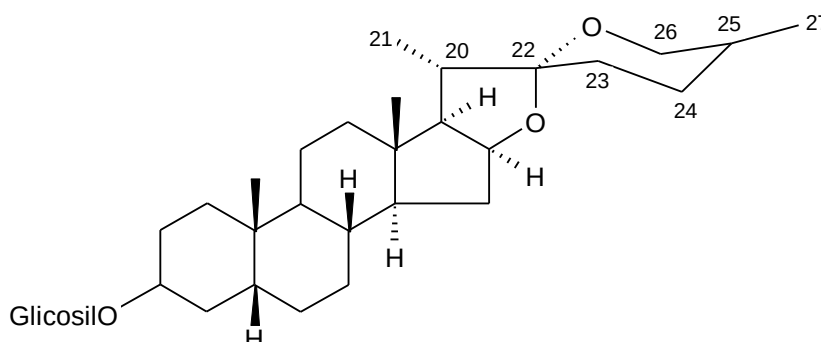
Como O-glicósidos, las saponinas esteroideas se hidrolizan fácilmente en medio ácido o en presencia de enzimas. Ambos procesos liberan una o varias unidades de carbohidratos ligados, y la denominada *sapogenina esteroidea*. (Silvia, 1992)

TIPOS ESTRUCTURALES DE SAPONINAS.

Los estirostanoles son acetales intramoleculares derivados de la 16,26-dihidroxi-22-ceto-esteroide, que consiste de 27 carbonos que poseen un esqueleto (núcleo estirostano), en donde un anillo furano (anillo E) y un anillo pirano (anillo F) están unidos en una forma estiroacetalo en C-22. (Curso de Farmacognosia y Fitoquímica Antioquia, 2001)

Además existen los derivados del furostano que están cercanamente relacionados a los derivados del estirostano y éstos son precursores de los estirostanoles, debido a que ellos poseen un anillo F abierto de estirostano, donde casi todos tienen un enlace OH glicosídico en C-26 y producen el correspondiente derivado estirostano por el tratamiento con β -glucosidasa. Los derivados del furostano se encuentran predominantemente en las plantas frescas. (Curso de Farmacognosia y Fitoquímica Antioquia, 2001)

Las saponinas esteroidales derivadas de estirostanoles y furostanoles, se convierten usualmente en estirostanoles durante el proceso de aislamiento.



Estructura básica de las saponinas esteroidales del tipo estirostano

Las saponinas tipo furostano son 26-O-glucósidos, y la porción glucosídica es fácilmente liberada por reacciones con enzimas, un anillo cerrado en el 26-OH toma lugar con deshidratación con el 22-OH, lo cual produce un estirostano. Así, el furostano es reconocido con el precursor en la biogénesis de los glucósidos estirostanoles y es llamado su prototipo. Se sabe que los glucósidos estirostanoles

muestran hemólisis, hemaglutinación, acción antibacterial, actividad anti-fúngica, y reacciones tóxicas para moluscos, renacuajos y peces, pero estas acciones son muy leves o no existen en los glicósidos furostanos. (Curso de Farmacognosia y Fitoquímica Antioquia, 2001)

Una hipótesis menciona que la función de las saponinas en las plantas son como una defensa contra bacterias y virus, por lo que, cuando una planta sufre algún daño, el furostanol inmediatamente cambia en espirostanol, por la ayuda de una enzima, para proveer una efectiva actividad antibacterial. (Curso de Farmacognosia y Fitoquímica Antioquia, 2001)

BIOGÉNESIS

La porción esteroide de las saponinas esteroidales (también denominada sapogenina o aglicona esteroide) se origina por la ruta de la acetilCoenzima-A vía ácido mevalónico y escualeno. Una vez formado un precursor esteroide con 27 átomos de carbono (p.ej. colesterol), éste es deshidrogenado para originar 3-colestanona. La colestanona 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 26 restantes, lo que da lugar al anillo espirostanos propiamente dicho. La 3-espirostanona puede ser reducida a 3-espirostanol, el cual puede sufrir procesos enzimáticos de glicosilación para originar las saponinas esteroidales. (Silvia, 1992; Curso de Farmacognosia y Fitoquímica Antioquia, 2001)

DISTRIBUCION NATURAL

Las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en varias familias de la clase Monocotiledónea, como son: Liliaceae, Dioscoreaceae y Amaryllidaceae (Agavaceae) y Palmae. En las dicotiledóneas, se las ha encontrado en las familias Solanaceae y Scrofulariaceae. También se han encontrado en Simarubaceae,

Leguminosae, Zygofillaceae, Primulaceae, y Gramineae. (Curso de Farmacognosia y Fitoquímica Antioquia, 2001)

Tabla 1. Géneros en que se encuentran saponinas esteroidales. (1)

Familia	Géneros
Liliaceae	Yucca, Trillium, Chlorogalum, Smilax, Nolina y Agapanthus
Agavaceae	Agave y Manfreda
Dioscoreaceae	Dioscorea
Scrofulariaceae	Digitalis
Solanaceae	Solanum, Lycopersicon y Cestrum

Las saponinas no se encuentran exclusivamente en el reino vegetal, por lo que en el reino animal, las estrellas de mar constituyen el único ejemplo de animales con saponinas esteroidales. (Silvia, 1992)

NOMENCLATURA

Comúnmente a las saponinas esteroidales se las denomina con nombres vulgares con terminación **-ina**. La IUPAC establece el nombre de éstas a partir del núcleo básico ***espiroetano***. (Silvia, 1992)

EXTRACCION Y AISLAMIENTO

Las saponinas esteroidales, por su carácter glicosídico, son insolubles en solventes apolares. Para obtenerlas de las plantas o animales, el material seco y molido se trata previamente con un solvente apolar (generalmente éter de petróleo o n-hexano). Posteriormente el material ya desengrasado se extrae con etanol, metanol o mezclas en diferentes proporciones de estos alcoholes y agua. El extracto acuoso (libre de alcohol) se liofiliza o se concentra en un evaporador rotatorio, y se hace pasar por resinas de intercambio iónico a fin de eliminar sustancias iónicas. El eluato acuoso se pasa luego a

través de materiales como el Sephadex LH-20 para separar las saponinas de otras moléculas como péptidos y macromoléculas que dificultan su purificación cromatográfica. Una vez obtenidas las saponinas, se pueden purificar por cromatografía en columna o líquida de alta resolución. En el caso de la cromatografía en columna, se puede utilizar sílica gel y como eluyentes mezclas de cloroformo-metanol-agua. (Silvia, 1992)

Un procedimiento de aislamiento típico consiste en utilizar cromatografía en columna empleando como fase estacionaria sílica gel y Sephadex LH-20. Esta última proporciona resultados satisfactorios para la separación de saponinas esteroidales. (23)

CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES

INFRARROJO:

Además de las bandas de absorción características de las sustancias esteroidales, las saponinas y sapogeninas esteroidales presentan varias bandas originadas por tensiones C-O de los anillos pirano y furano, localizadas alrededor de 850, 900, 920 y 987 cm^{-1} . Por otro lado, la intensidad relativa entre las bandas a 900 y 920 cm^{-1} permite determinar la estereoquímica del carbono 25. De acuerdo con esto si la banda a 900 es más intensa que la de 920 cm^{-1} , la configuración del carbono 25 es R, y en el caso inverso es S. Algunos procedimientos para la detección y valoración de sapogeninas esteroidales se basan en estas bandas de absorción. (Silvia, 1992)

ESPECTROMETRÍA DE MASAS :

Las sapogeninas esteroidales presentan espectros de masas 70 eV, en los cuales pueden apreciarse el ión molecular y los fragmentos m/z : 115 y 139, donde uno de estos corresponde al pico base del espectro.

Para las saponinas esteroidales se utilizan actualmente técnicas de Espectrometría de masas con ionización suave como Desorción de Campo (FD) y Bombardeo con Átomos Rápidos (FAB) las cuales permiten además de conocer el peso molecular, establecer los carbohidratos ligados. (Silvia, 1992)

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR:

Las saponinas esteroidales pueden reconocerse en sus espectros de Resonancia Magnética Protónica por las señales de los protones localizados sobre los carbonos unidos a átomos de oxígeno como son: C-16, C-3, C-26, C-18 y C-19. La señal del protón 16 aparece alrededor de 4.5 ppm en forma de un cuartete. La señal del protón 3 aparece alrededor de 3.5 ppm cuando en el carbono 3 existe un grupo hidroxilo. Los protones del C-26 resuenan en 3.3-4.0 ppm (H-26 ecuatorial dd, $J=10$ y 2-3 Hz; H-26 axial dd, $J=10$ y 10 Hz). Los protones del metilo-18 resuenan como un singlete en 0.7-0.8 ppm y los del metilo-19 en 0.9-1.2 ppm, también en forma de singlete. El desplazamiento químico de los protones de los metilos 21 y 27 depende de la estereoquímica del C-25. Así, estos resuenan como dobletes ($J=7$ hz) alrededor de 1.08 y 0.98 ppm respectivamente en isómeros 25S, mientras que en los isómeros 25R resuenan en 0.96 y 0.78 ppm respectivamente. (Silvia, 1992; Science News, 1995)

En los espectros de Resonancia Magnética de Carbono-13, se aprecian las señales de los carbonos 16, 22, 25, 26 y 27, alrededor de 80, 110, 30, 65 y 17 respectivamente. En el caso del isómero 25S los carbonos C-25, C-26 y C-27 resuenan alrededor de 27, 65 y 16 ppm respectivamente, mientras que en el isómero 25R resuenan alrededor de 30, 67 y 17 ppm, respectivamente. Los carbohidratos ligados presentan espectros característicos. (Silvia, 1992)

Debido a que esta última técnica de análisis permite asignaciones estructurales finas, es muy utilizada actualmente, especialmente en experimentos heteronucleares, como HMBC y HMQC. (Silvia, 1992)

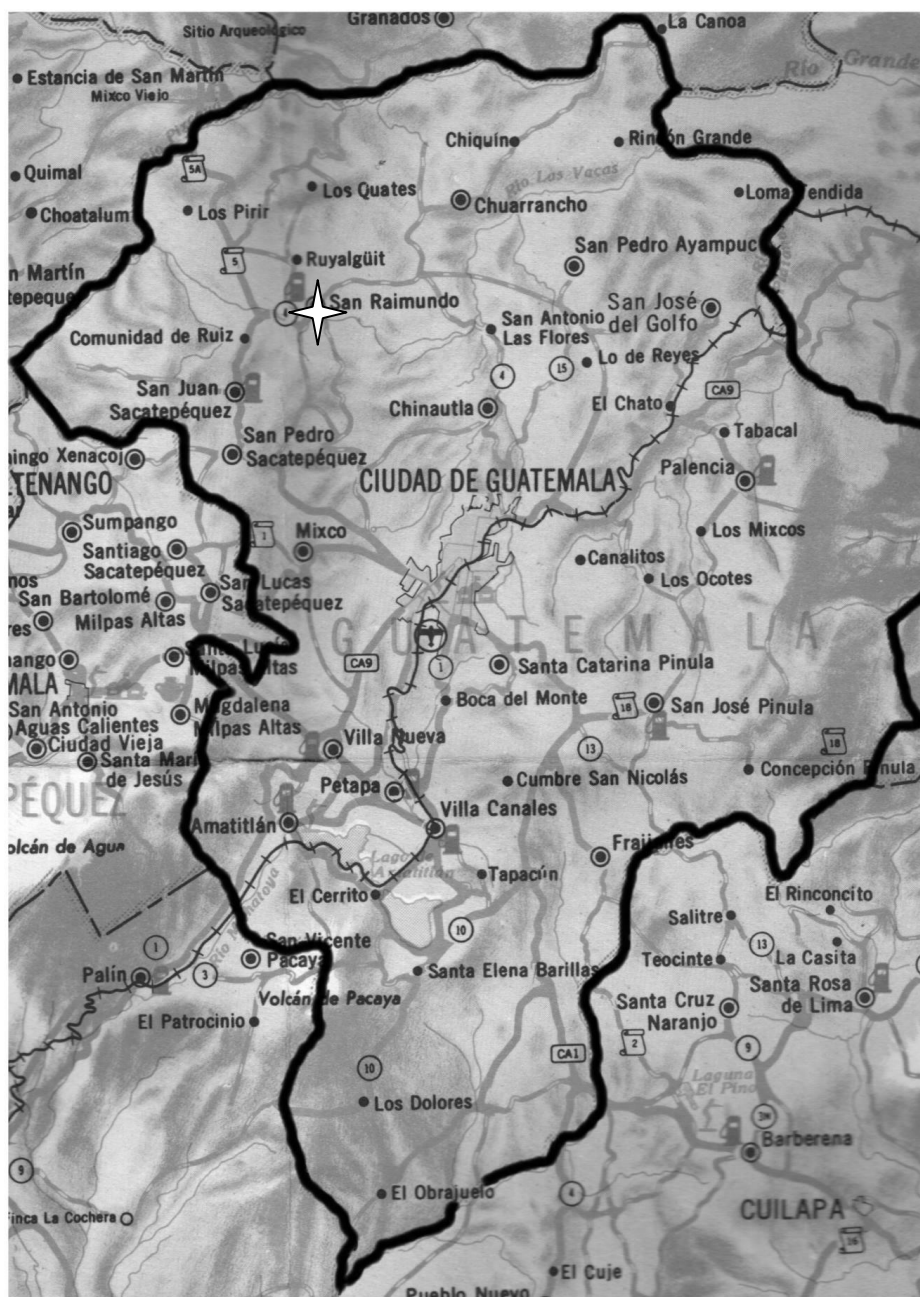
IMPORTANCIA FARMACÉUTICA DE LAS SAPONINAS ESTEROIDALES

Aunque algunas saponinas esteroidales demuestran diversas actividades biológicas (antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, ictiotóxica, molusquicida, insecticida, antihelmíntica, expectorante, diurética, cardiovascular, antiinflamatoria,

anti-úlcero, espermicida, analgésica, antipirética, sedante, antifertilidad, antihepatotóxica, etc.) fundamentalmente se constituyen como precursores únicos de muchos medicamentos esteroidales tales como, hormonas sexuales, corticoides, contraceptivos orales y diuréticos. La producción industrial de estas sustancias requiere una serie de procesos microbiológicos de fermentación, así como una serie de conversiones químicas relativamente complejas, que en su gran mayoría se encuentran patentadas por los grandes laboratorios farmacéuticos. (Miller, 1973; Silvia, 1992; Curso de Farmacognosia y Fitoquímica Antioquia, 2001)

ANEXO No. 3

Mapa de Recolección de *Yucca elephantipes* (izote)
en el Departamento de Guatemala



✦ Área de colecta (Km. 44)

ANEXO No. 4

PROPUESTA PARA EL AISLAMIENTO INDIVIDUAL DE CADA SAPONINA

Determinación de la saponina de interés por cromatografía en capa fina

- Disolver el crudo de saponinas con 2 mL de metanol y transferir a un balón aforado de 5 mL y llevar a volumen con metanol.
- Realizar aplicaciones puntuales de 35 μ L de esta solución de saponinas sobre una placa cromatográfica de sílica gel 60 F-254 (Merck).
- Desarrollar las placas cromatográficas utilizando como fase móvil cloroformo-metanol-agua en proporciones 64:50:10.
- Asperjar el reactivo de cloruro de antimonio III en cloroformo al 10%, el cual permite observar las saponinas en una cámara de luz ultravioleta a una longitud de onda de 365nm y permite decidir que porción de una cromatoplaqueta sin ningún tratamiento químico puede ser desprendido para proseguir con el aislamiento.

Aislamiento de las saponinas por cromatografía en capa fina

- Luego de decidir que porción de la cromatoplaqueta sin ningún tratamiento químico puede ser desprendido, disolver la porción desprendida en 2 mL de metanol y filtrar utilizando un filtro de membrana de 0.45 μ m y transferir la solución obtenida a un balón aforado de 5mL y llevar a volumen con metanol.
- Realizar aplicaciones puntuales de 35 μ L de esta solución sobre una placa cromatográfica de sílica gel 60 F-254 (Merck), dejando una separación de un centímetro entre cada aplicación, pero ahora utilizando como fase móvil butanol – ácido acético glacial – agua en proporciones 4:1:1, para observar compuestos que pudieran estar traslapados al utilizar la fase móvil anterior. Esta última fase móvil permite una buena separación de las saponinas, aunque el tiempo de desarrollo es de 4 a 5 horas.

- La aplicación del reactivo de cloruro de antimonio III permite observar las saponinas en una cámara de luz ultravioleta a una longitud de onda de 365nm y decidir que porción de una cromatoplaaca sin ningún tratamiento químico puede ser desprendido para proseguir con el aislamiento.

6.4.1. Determinación del aislamiento de las saponinas por HPLC (18)

- Disolver la porción desprendida en 5 mL de metanol y filtrar utilizando un filtro de membrana de 0.45µm y transferir la solución obtenida a un balón aforado de 10mL y llevar a volumen con metanol 30%.
- Tomar una alícuota de 5 ml y pasar a través de un cartucho RP-18 SPE y que eluya con metanol 30% y si queda retenido alguna porción terminar de eluir con metanol 100%.
- Esta solución se debe filtrar con filtro de jeringa antes de inyectarla en el equipo de HPLC.
- Preparar el equipo de HPLC y realizar inyecciones con una jeringa de 50 µL. La fase móvil la constituye un gradiente de 10 minutos de 22 a 28% de acetonitrilo y ácido fosfórico 0.1N. La detección se realizara principalmente a 200nm, y alternativamente a 265 y 348nm con un detector visible / ultravioleta.

**RESULTADOS DEL DESARROLLO CROMATOGRÁFICO
PARA AISLAR UNA SAPONINA ESTEROIDAL
CON TRATAMIENTO QUÍMICO**

Mancha No.	Distancia recorrida (centímetros)	Rf	Coloración (luz UV 365nm)
1	9.00	0.5373	Verde fosforescente
2	12.15	0.7254	Amarillo verdoso fosforescente
3	16.40	0.9791	Verde fosforescente

Distancia recorrida por la fase

movil: 16.8 cm

Fase móvil: BUTANOL - ACIDO ACETICO GLACIAL - AGUA (4:1:1)

Fase estacionaria: CROMATOPLACA DE SILICA GEL 60 F₂₅₄

Revelador: CLORURO DE ANTIMONIO III

CROMATOGRAFIA POR HPLC DEL TOTAL DE SAPONINAS ESTEROIDALES

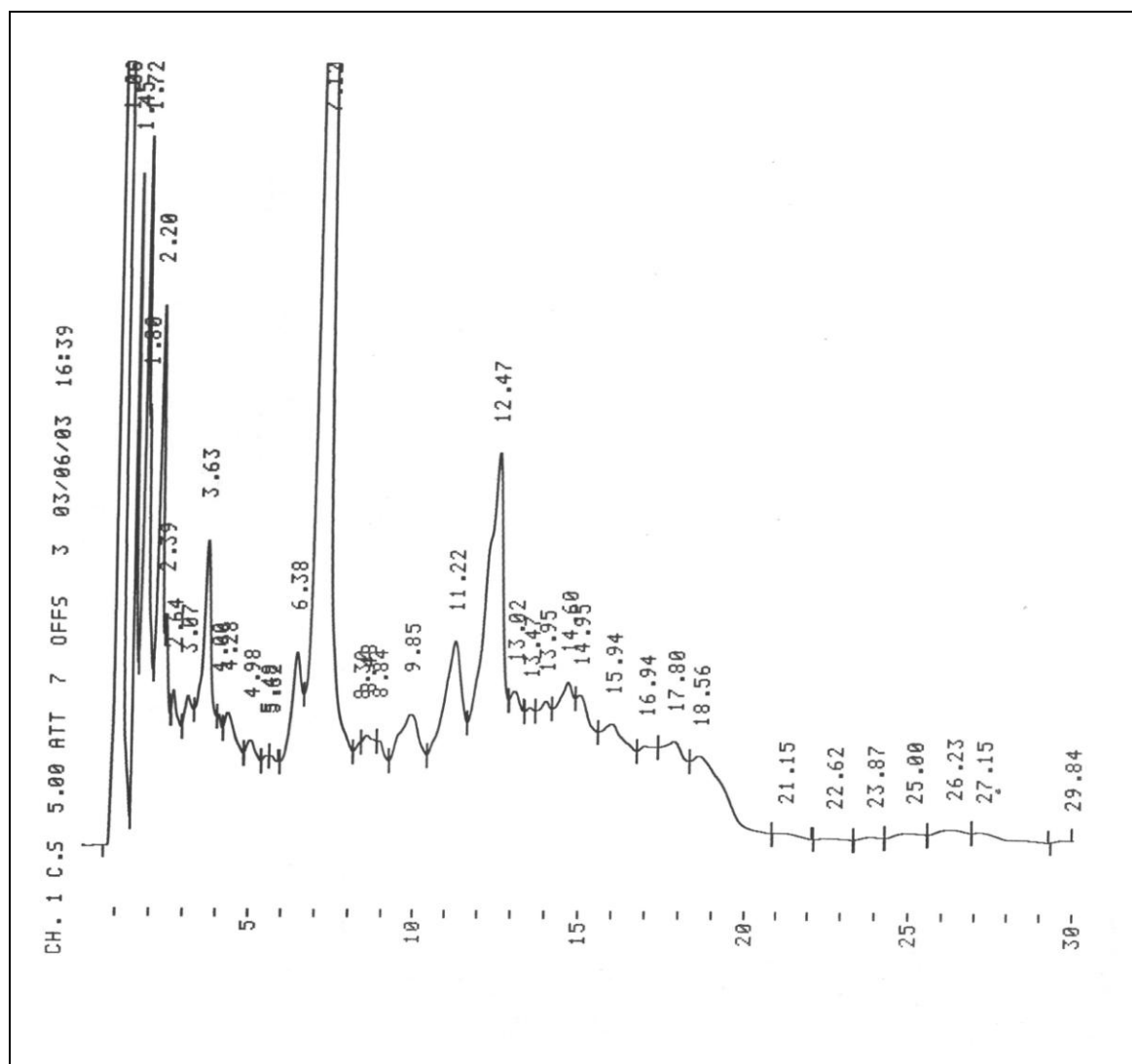


Figura 2 – Cromatograma obtenido por HPLC del total de saponinas esteroidales obtenido en la cuantificación gravimétrica, donde se observa una gran cantidad de compuestos detectados a una longitud de onda de 200nm.

DESARROLLO CROMATOGRÁFICO POR HPLC DE LA SAPONINA AISLADA A 200nm

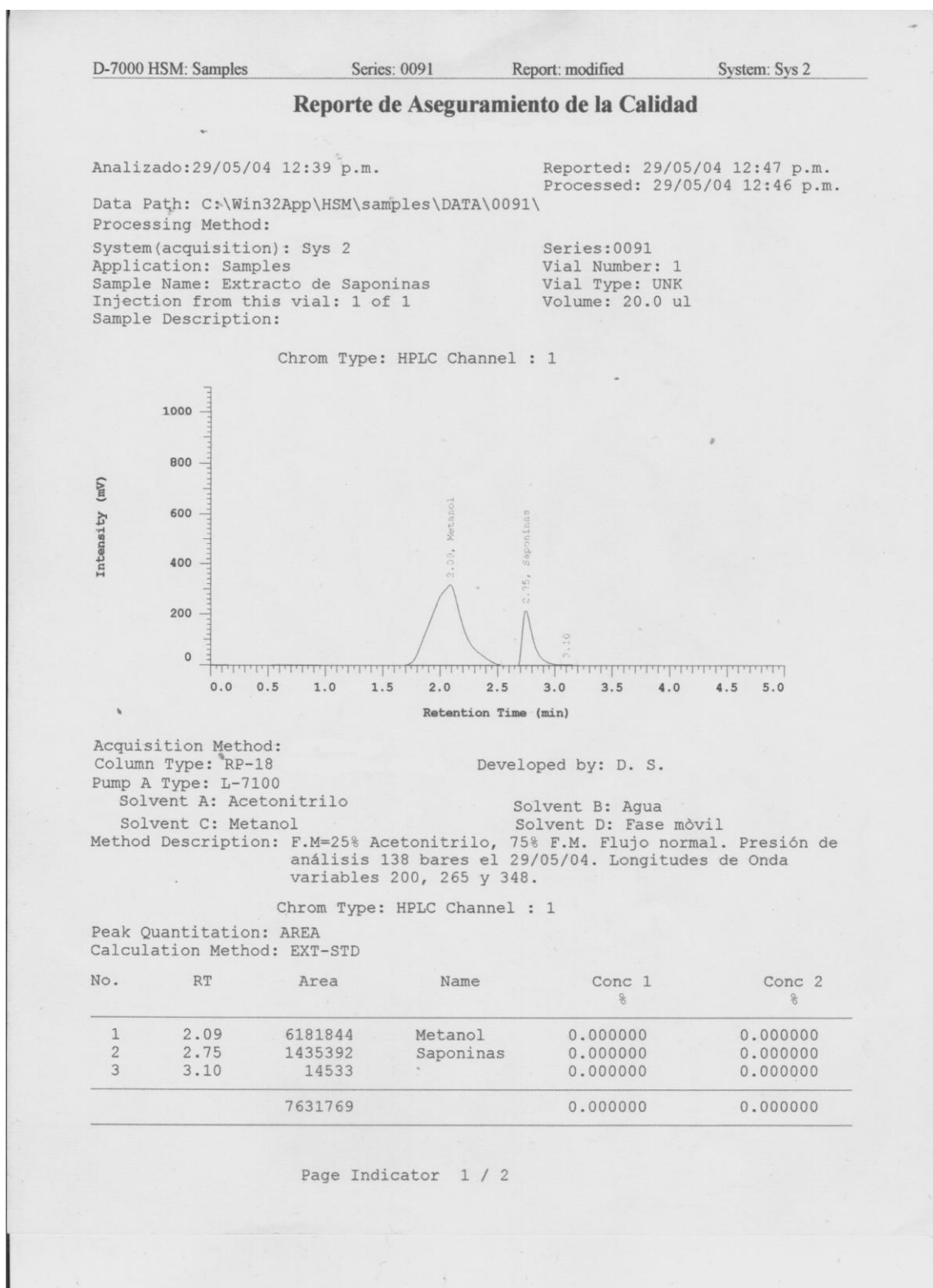


Figura 4 - Imagen obtenida del desarrollo cromatográfico por HPLC de la saponina aislada a una longitud de onda de 200 nm.

DESARROLLO CROMATOGRÁFICO POR HPLC DE LA SAPONINA AISLADA A 265 nm

D-7000 HSM: Samples

Series: 0095

Report: modified

System: Sys 2

Reporte de Aseguramiento de la Calidad

Analizado: 29/05/04 01:19 p.m.

Reported: 29/05/04 01:27 p.m.

Processed: 29/05/04 01:27 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0095\

Processing Method:

System(acquisition): Sys 2

Series: 0095

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: Extracto de Saponinas

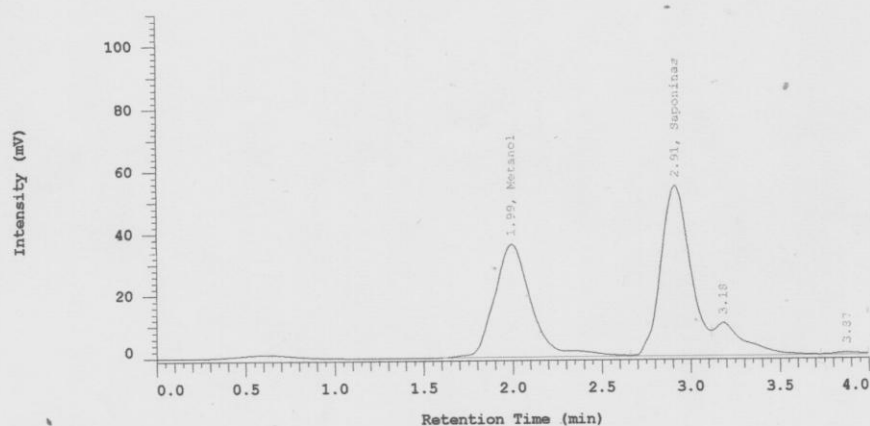
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 20.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method:

Column Type: RP-18

Developed by: D. S.

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Acetonitrilo

Solvent B: Agua

Solvent C: Metanol

Solvent D: Fase mòvil

Method Description: F.M=25% Acetonitrilo, 75% F.M. Flujo normal. Presión de análisis 138 bares el 29/05/04. Longitudes de Onda variables 200, 265 y 348.

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: AREA%

No.	RT	Area	Name	Conc 1	Conc 2
1	1.99	528190		40.777	40.777
2	2.91	626138		48.338	48.338
3	3.18	132091		10.198	10.198
4	3.87	8910		0.688	0.688
		1295329		100.000	100.000

Page Indicator 1 / 2

Figura 5 - Imagen obtenida del desarrollo cromatográfico por HPLC de la saponina aislada a una longitud de onda de 265 nm.

DESARROLLO CROMATOGRÁFICO POR HPLC DE LA SAPONINA AISLADA A 468nm

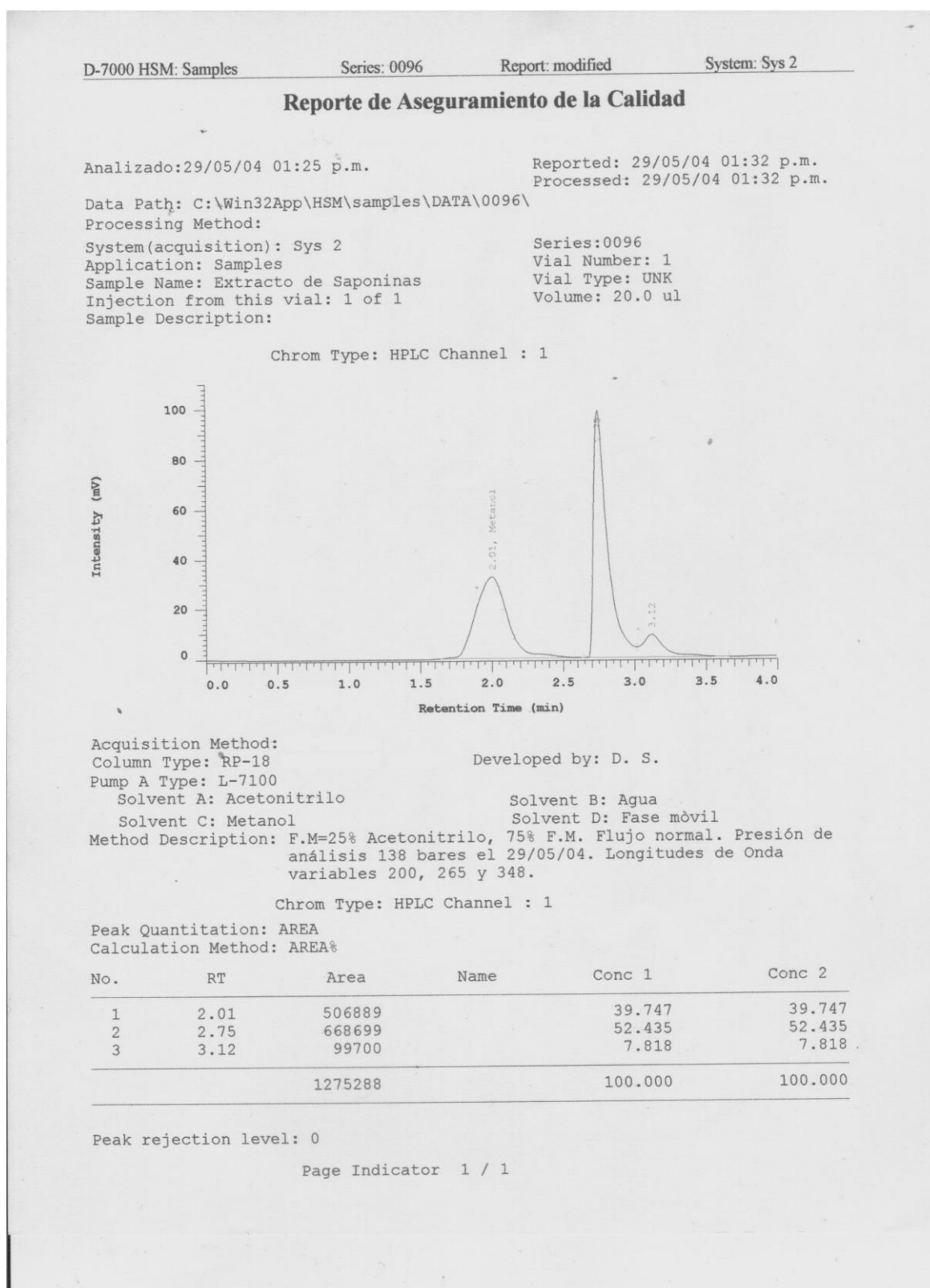


Figura 6 - Imagen obtenida del desarrollo cromatográfico por HPLC de la saponina aislada a una longitud de onda de 468 nm.

Br. Dennis Edward Santizo Corzo

Autor

Licda. Beatriz Eugenia Medinilla Aldana

Asesora

Licda. Lucrecia Martínez de Haase

Revisora

Licda. Lucrecia Martínez de Haase

Directora

Oscar Cobar Pinto, Ph. D.

Decano