



Facultad Química-Farmacía

Departamento de Licenciatura Química

Tesis de Diploma

Título: Procedimientos para la extracción de  
saponinas con actividad antiinflamatoria a partir de  
hojas de *Agave brittoniana* Trel

**Autora:** Maydí Fundora Cedeño

**Tutores:** DrC. José Orestes Guerra

MSc. Yisel González Madariaga

Santa Clara

2016



*“La ciencia no tiene anchos caminos reales y  
solo llega alcanzar sus cimas radiantes quien  
sin temor al cansancio trepa por sus senderos  
pedregosos”*

*C. Marx*



*Dedicatoria*

*A mis abuelos Miguel y Gladys in memoriam.*

*A mis padres y mis hermanas.*



*Agradecimientos*

*A mi mamá y mi papá, por su amor incondicional y por todos los sacrificios.*

*A mis hermanas, por su amor infinito.*

*A mi padrastro, por quererme y tolerarme.*  
*A mis tutores Yisel y José Orestes por su orientación y dedicación.*

*A los profesores de la carrera por su contribución en mi formación profesional.*

*A las técnicas de laboratorio Aracelys y Josefa por su gran ayuda.*

*A Yilka, Arianna y Daily por su ayuda.*

*A Leidy Laura por su ayuda y sus consejos.*



*Resumen*

## Resumen

El presente trabajo describe la obtención de crudos de saponinas esteroidales de hojas de *Agave brittoniana* Trel ssp. *Brachypus* a partir de diferentes procedimientos extractivos: maceración en etanol 70% (A), extracción con Soxhlet utilizando como solvente n-butanol (B) y trituración de hojas frescas para obtener directamente el jugo de la planta (C). La CCD (Cromatografía de Capa Delgada) fue utilizada para comparar cualitativamente la composición de los tres crudos obtenidos. A partir del crudo obtenido por la vía de la maceración y posterior separación en embudo, por vez primera se estableció un procedimiento para el fraccionamiento de este crudo utilizando CC (Cromatografía de columna) fase normal. La comparación con patrones de diosgenina y yucagenina se realizó en CCD. Finalmente se procedió a la demostración *in vivo* de la actividad antiinflamatoria de los crudos obtenidos por las diferentes vías extractivas, así como las sapogeninas obtenidas por hidrólisis ácida. El rendimiento obtenido en los tres métodos extractivos A, B y C fue 4,70%, 12,3% y 9,73% respectivamente. Los productos derivados de la planta presentaron propiedades antiinflamatorias *in vivo* más potentes que el antiinflamatorio sintético: indometacina. El crudo de saponinas obtenido por el método A, así como las sapogeninas, fueron los productos de mejores resultados en la evaluación del potencial antiinflamatorio del *A. brittoniana*.

## Abstract

This paper describes the production of crude steroidal saponins *Agave* leaves *brittoniana* Trel ssp. *Brachypus* from different extraction processes: maceration in 70% ethanol (A), Soxhlet extraction as solvent n-butanol (B) and grinding fresh leaves to obtain the juice of the plant (C) directly. The TLC (Thin Layer Chromatography) was used to compare qualitatively the composition of the three crude obtained. From the crude product obtained by means of maceration and subsequent separation funnel, first a process for the fractionation of this crude using normal phase CC (Chromatography Column) was established. Comparison with diosgenin patterns and yuccagenin was held at TLC. Finally, we proceeded to in vivo anti-inflammatory activity of the crude obtained by different routes extractive demonstration and sapogenins obtained by acid hydrolysis. The yield obtained in the three extractive methods A, B and C was 4.70%, 12.3% and 9.73% respectively. Products derived from the plant had more potent than the synthetic anti-inflammatory anti-inflammatory properties in vivo: indomethacin. Crude saponins obtained by the A method and sapogenins were better products in assessing anti-inflammatory potential of *A. brittoniana*.



## Índice

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Introducción.....                                                                              | 1  |
| Capítulo I: Revisión Bibliográfica.....                                                        | 4  |
| 1.1 Proceso inflamatorio .....                                                                 | 5  |
| 1.2 Principales metabolitos responsables de la actividad antiinflamatoria de las plantas ..... | 6  |
| 1.3 Género Agave .....                                                                         | 6  |
| 1.3.1 Diferentes Usos .....                                                                    | 7  |
| 1.3.2 El Agave brittoniana Trel .....                                                          | 8  |
| 1.3.2.1 Fitoquímica del <i>Agave brittoniana</i> T .....                                       | 8  |
| 1.3.2.2 Saponinas y saponinas esteroidales. ....                                               | 10 |
| 1.3.2.3 Saponinas y saponinas mayoritarias del <i>Agave brittoniana</i> T.....                 | 12 |
| 1.3.2.4 Actividad biológica de las saponinas. ....                                             | 14 |
| 1.3.2.5 Actividad antiinflamatoria de las saponinas .....                                      | 14 |
| 1.4 Extracción y aislamiento.....                                                              | 15 |
| 1.5 Hidrolisis de las saponinas.....                                                           | 16 |
| Capítulo II: Materiales y métodos .....                                                        | 18 |
| 2.1. Principales equipos. ....                                                                 | 18 |
| 2.2 Técnicas cromatográficas.....                                                              | 18 |
| 2.3. Reactivos y disolventes.....                                                              | 18 |
| 2.4 Recolección del material vegetal. ....                                                     | 18 |
| 2.4.1 Preparación del material vegetal. ....                                                   | 18 |
| 2.5 Obtención de los extractos.....                                                            | 19 |
| 2.6 Fraccionamiento del crudo de saponinas .....                                               | 20 |
| 2.7 Hidrólisis ácida. ....                                                                     | 21 |
| 2.8 Determinación de la actividad antiinflamatoria en animales de laboratorio.....             | 21 |

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Capítulo III: Discusión de los resultados.....                                                       | 24 |
| 3.1 Resultados de la preparación del material vegetal.....                                           | 24 |
| 3.1.1 Obtención del crudo de saponinas.....                                                          | 24 |
| 3.2 Resultados del fraccionamiento del crudo de saponinas.....                                       | 27 |
| 3.3 Resultados de la hidrólisis ácida del extracto butanólico .....                                  | 28 |
| 3.3.1 Comparación cromatográfica .....                                                               | 28 |
| 3.4 Resultados de la determinación de la actividad antiinflamatoria en animales de laboratorio ..... | 29 |
| Conclusiones.....                                                                                    | 33 |
| Recomendaciones .....                                                                                | 35 |
| Bibliografía.....                                                                                    | 37 |
| Anexos .....                                                                                         | 40 |



## *Introducción*

## Introducción

El uso de la medicina tradicional se remonta a la época prehistórica, la cual es una de las formas más extendidas de medicina, presente en todas las culturas conocidas y posee gran importancia puesto que se utiliza en el tratamiento de muchas enfermedades, así es el caso de las plantas provenientes de la familia de las *Agavaceae* empleadas en México para tratar procesos inflamatorios, artritis y fiebre. Debido a que contiene sustancias con valor nutritivo y medicinal, el hombre también las ha utilizado como fuente de alimento, bebidas y para cubrir diferentes necesidades.

En Cuba las plantas del género *Agave* son conocidas con el nombre de *Maguey*, vocablo que proviene de la cultura taína (Guerra de León, 2005), formado por 300 especies de las cuales 16 crecen en Cuba, distribuidas a lo largo de toda la isla y con un alto porcentaje de endemismo. En la zona central del país se localizan básicamente cuatro (Alvarez de Zayas, 1996), el *Agave grisea*, *Agave acicularis*, *Agave offoyana* y el *Agave brittoniana* T. ssp. *Brachypus*, la que más profundamente ha sido estudiada desde el punto de vista fotoquímico (Macias, 2007), y continuará su estudio en el presente trabajo; además también es utilizado en la medicina para el tratamiento del parásito *Trichomona vaginalis*, (Guerra de León, 2005).

El *Agave brittoniana* T contiene una gran cantidad de metabolitos secundarios entre los cuales se encuentran las saponinas esteroidales que son las que presentan actividad antiinflamatoria (Bernic, 2011) según lo reportado en la literatura, por esta característica dicha planta puede ser usada en el tratamiento de procesos inflamatorios; que ocurre cuando se produce una rotura de la piel o de las mucosas, los microorganismos pueden pasar del medio externo al interno. Como reacción y en un intento de localizar al agente invasor, se produce una reacción en el tejido conectivo vascularizado que se denomina inflamación (Bernic, 2011, Khor, 2011).

En la literatura se han encontrado otras saponinas provenientes de otras plantas que presentan actividad antiinflamatoria, como ejemplo tenemos las saponinas de los *agaves attenuata* (fig 1) (Higgin, 1976) y *furcraea gigantea* (fig 2)(Peng, 2006).

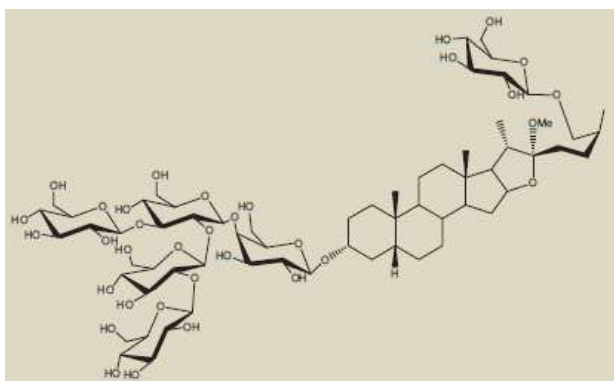


Fig 2: Saponina furostánica del *Agave attenuata*.

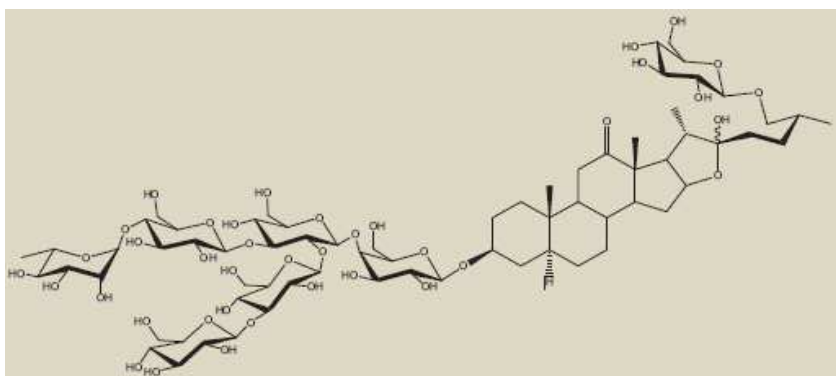


Fig 3: Saponina furostánica del *Agave furcraea gigantea*.

Teniendo en cuenta la información planteada anteriormente proponemos el siguiente **Problema científico:** ¿Cómo obtener productos con actividad antiinflamatoria a partir de hojas de *Agave brittoniana* Trel?

**Hipótesis:** Mediante el uso combinado de técnicas extractivas y cromatográficas es posible extraer de hojas de *Agave brittoniana* Trel productos con actividad antiinflamatoria.

**Objetivo General:** Proponer un procedimiento para la extracción de productos con actividad antiinflamatoria a partir de las hojas de *Agave brittoniana* Trel.

#### Objetivos específicos:

- ❖ Determinar el método extractivo de mayor actividad antiinflamatoria y la composición cualitativa de cada crudo.
- ❖ Determinar la capacidad de fraccionamiento de un crudo de saponinas utilizando cromatografía de columna fase normal.

- ❖ Evaluar *in vivo* la actividad antiinflamatoria de saponinas y sapogeninas esteroidales extraídas.



## **Capítulo I: Revisión Bibliográfica**

### **1.1 Proceso inflamatorio**

La respuesta inflamatoria ocurre solo en tejidos conectivos vascularizados, con el fin defensivo de aislar y destruir el agente dañino, así como repara el tejido u órgano dañado. Se considera entonces un mecanismo de inmunidad innata, estereotipado, en contraste con la reacción inmune adaptativa, específico para cada agente infeccioso (Bernic, 2011).

Durante la inflamación, se alteran las bases morfológicas del endotelio por acción de los mediadores químicos, produciéndose una alteración de las uniones celulares y las cargas negativas de la membrana basal, produciéndose un aumento de la permeabilidad en los capilares sanguíneos que los constituyen (Bernic, 2011).

Este complejo proceso produce el acúmulo de fluidos y leucocitos en el espacio extravascular. La inflamación puede ser originada por factores endógenos (necrosis tisular o rotura ósea) o factores exógenos como lesiones por agentes mecánicos (corte, etc), físicos (quemaduras), químicos (corrosivos), biológicos (microorganismos) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad). Aunque en algunos casos, como la hipersensibilidad, la inflamación puede tener consecuencias nocivas, por lo general es una respuesta protectora que trata de restaurar los tejidos lesionados.(Bernic and Kane, 2011, Khor et al., 2011)

Los cinco signos cardinales de la inflamación son:

1. rubor (coloración roja)
2. tumor (hinchazón)
3. calor
4. dolor.
5. pérdida de función

La coloración y el calor se deben a un aumento del flujo sanguíneo en el área traumática y a la constricción de las vénulas. Los cambios de la microcirculación son inducidos por mediadores químicos. Estos mediadores, además, aumentan la permeabilidad capilar con lo que los líquidos y las células sanguíneas pasan al espacio extravascular provocando la hinchazón y un aumento de la presión local que es el que origina el dolor.

#### **1.1.1 Tipos de inflamación.**

La inflamación según su duración se divide en aguda y crónica:

- La aguda es de duración relativamente corta (minutos, horas o unos pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente neutrófilos (Bernic, 2011, Khor, 2011).
- La inflamación crónica dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y macrófagos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo (Bernic, 2011, Khor, 2011).

## **1.2 Principales metabolitos responsables de la actividad antiinflamatoria de las plantas**

Tradicionalmente, numerosas especies de plantas han sido empleadas para el tratamiento de la inflamación. Muchas de ellas han sido investigadas en los últimos años y se han descrito los metabolitos secundarios presentes en las mismas que pudieran ser responsables de dicha acción (Alvarez, 2006). Entre estos se encuentran los compuestos fenólicos como los flavonoides, taninos condensados y galotaninos que inhiben algunas dianas moleculares de mediadores de la inflamación en la respuesta inflamatoria (Makkar, 2005). Las cumarinas que poseen significativa actividad antiinflamatoria y antioxidante, inhibiendo tanto la vía de la ciclooxygenasa como la de la lipooxygenasa en el metabolismo del ácido araquidónico (Alvarez, 1995). Las saponinas que tienen múltiples actividades biológicas en dependencia de su estructura: antimicótica, antiviral, anticáncer, hipocolesterolémica, hipoglicémica, antitrombótica, diurética, molusquicida (Cuéllar, 2001). Los reportes como antiinflamatorio son uno de los más citados en la bibliografía.

## **1.3 Género Agave**

### **Características botánicas**

Las plantas pertenecientes al género *Agave* poseen hojas de aspecto carnosas, con un margen comúnmente armado de espinas fuertes, de color castaño oscuro, que se disponen como rosetas rígidas con forma de espiral, en un número que oscila de 50 a 150. Después de varios años de crecimiento, en los agaves se produce una inflorescencia que llega a alcanzar una altura que sobrepasa los 6 metros y agota la planta que muere poco después.

Las flores son en forma de espiga o panoja de escapo largo, perianto de seis partes más o menos embudado, seis estambres comúnmente muy exertos, ovario 3-locular, estigma 3-lobulados, con semillas muy numerosas, negras y aplanadas (Roig, 1974).

### **1.3.1 Diferentes Usos**

El estudio del género *Agave*, se encuentra representado prácticamente por las secciones *Rigidae*, (Enciclopedia) las cuales son cultivadas en gran medida para diversos propósitos como son: a.) la obtención de bebidas alcohólicas como el tequila y el mezcal; b.) la obtención de fibras naturales de gran resistencia c.) La obtención de compuestos esteroidales y otros de uso medicinal y agrícola (Ruvalcaba-Ruiz, 2002).

#### **✓ Uso Medicinal**

Desde tiempos muy antiguos en México, se ha considerado que esta planta tiene propiedades medicinales, sobre todo dentro de la medicina indígena, es utilizada para tratar procesos inflamatorios, artritis y fiebre. Las pencas machacadas y aplicadas en cataplasma provocan supuración; sirve también para desalojar los piojos de las bestias; las infusión de raíz es depurativa y mezclada con raíces de zarzaparrilla se dice que tiene valor curativo (Mrad Ortega, 2002).

Las hojas de estas plantas, en forma de cocimientos, son utilizadas tradicionalmente por una parte de la población cubana, en la cura de enfermedades parasitarias (León, 1946, Roig, 1974).

También existe reportes en la bibliografía de especies de agaves que tienen propiedades curativas tal es el caso del *Agave americana* L. que es utilizada en la India como diurético, antisifilítico, laxante, emenagogo (provoca la evacuación menstrual de las mujeres) y antiescorbútico (Parmar, 1992). En la medicina folclórica china estas plantas son empleadas en el tratamiento de escabiosis (sarna), tumores, disentería y como insecticidas. De igual forma, en las islas Bahamas, el vástago central del *Agave sisalanae* hervido con sal y la decocción se utiliza como remedio para la ictericia. El jugo de las hojas de algunas de estas plantas también es utilizado en el tratamiento de úlceras y la decocción de las raíces como diurético; ejemplo de ello, es el cocimiento de raíces de *Furcraea gigantea*, tomado en Brasil como un remedio efectivo para enfermedades venéreas (Pérez de Armas, 2011).

#### **✓ Uso Agrícola e industrial**

La fibra es utilizada principalmente para la confección de sacos o costales para el empaquetamiento de granos como el café, también son utilizadas para la elaboración de

artículos como alpargatas, colchones, cordelería y tapetes. Las plantas jóvenes son utilizadas para preparar un encurtido; se hierven para quitar lo mucilaginoso y posteriormente se agrega agua, sal y vinagre. Finalmente el sumo de las hojas es utilizado por las lavanderas para el lavado de la ropa delicada (Mrad Ortega, 2002).

Algunos campesinos de la provincia de Cienfuegos (región central-sur de Cuba) siembran esta planta en los perímetros de varios cultivos de interés agrícola, con el objetivo de repeler el ataque de ácaros y otras plagas (Pérez de Armas, 2011).

### **1.3.2 El *Agave brittoniana* Trel**

El *Agave brittoniana* Trel. (fig 1.1) es una de las especies de *Agave*, crece en la región central de la isla de donde es endémica y cuenta con dos subespecies, el *A. brittoniana* T. ssp. *Spirituana* y el *A. brittoniana* T.ssp. *Brachypus* (Alvarez, 1995). Esta es una planta silvestre que crece en terrenos áridos, pedregosos y estériles, posee hojas de color verde grisáceo, carnosas, lineales y lanceoladas, de aproximadamente un metro de largo y veinte centímetros de la ancho, generalmente espinosa y dentadas. Las espinas son de color castaño oscuro, fuertes y de 2-4 mm de largo. Las hojas se encuentran arrosetadas en el ápice del tronco que es simple y leñoso. Poseen capsula oblonga, algo periforme y flores amarillas de 3-3,5 cm de largo (León, 1946).



Fig.1.1 *Agave brittoniana* T. Planta joven

#### **1.3.2.1 Fitoquímica del *Agave brittoniana* T**

La fitoquímica es la ciencia que ha permitido la detección y posteriormente la identificación de los principios activos responsables de alguna propiedad atribuida a alguna planta, tal es el caso de la familia agavácea que se caracteriza por presentar en su composición un alto contenido de fibra constituida por ceras, polialcoholes,

poliazúcares (González-Elizondo, 2004). También estudios previos han detectado la presencia de aminas y/o aminoácidos, grasas, aceites esenciales y esteroides (Guerra de León, 2005) (tabla 1.1). Además, numerosas especies de agave contienen dentro de sus metabolitos secundarios saponinas esteroidales (Agrawal, 1985), las que en dependencia de su estructura pueden presentar múltiples acciones farmacológicas entre las que se encuentra sus propiedades antiinflamatorias, como es el *Agave brittoniana* T (Pérez de Armas, 2011).

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos que producen los organismos vivos y no los emplean en sus funciones vitales. Estos pueden dividirse en dos grupos; aquellos de menor polaridad y los de mayor polaridad. En el primer grupo se encuentran los compuestos lipídicos, como son las ceras que se localizan fundamentalmente en una fina membrana o cutícula que cubre y protege las hojas (Gola, 1966). En el otro grupo se encuentran las saponinas esteroidales que son los metabolitos mayoritarios.

Tabla 1.1. Metabolitos secundarios presentes en el *Agave brittoniana* Trel (Guerra de León, 2005).

| Metabolitos                | Ensayo                  | Hojas |
|----------------------------|-------------------------|-------|
| Alcaloides                 | Dragendorff             | +     |
|                            | Mayer                   | +     |
|                            | Wagner                  | +     |
| Triterpenos y esteroides   | Liebermann-Burchard     | +     |
| Quinonas                   | Borntrager              | -     |
| Cumarinas                  | Baljat                  | -     |
| Aceitesesenciales y grasas | Sudan III               | +     |
| Azúcaresreductores         | Fehling                 | +++   |
| Saponinas                  | Espuma                  | +++   |
| Fenoles y taninos          | Cloruro de hierro (III) | -     |
| Aminoácidos y aminas       | Nihidrina               | +     |
| Flavonoides                | Shinoda                 | -     |
| Glicósido                  | Molish                  | +     |

|                         |               |   |
|-------------------------|---------------|---|
| Glicósidoscardiotónicos | Kedde-Raymond | - |
|-------------------------|---------------|---|

### 1.3.2.2 Saponinas y saponinas esteroideas.

Las saponinas son glicósidos (fig.1.2) en los cuales, varias unidades de monosacáridos (fig1.3) se unen mediante enlace glicosídico, a un resto denominado aglicón o saponigenina. El aglicón puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidea y en función de esto las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas y saponinas esteroideas respectivamente. Llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), y forman una espuma cuando se les agita en agua. Las saponinas son tóxicas por vía parenteral, por sus propiedades hemolíticas. Además pueden formar complejos con esteroides, por lo que podrían interferir en la asimilación de estos por el sistema digestivo, o romper las membranas de las células tras ser absorbidas hacia la corriente sanguínea (Pérez de Armas, 2011).

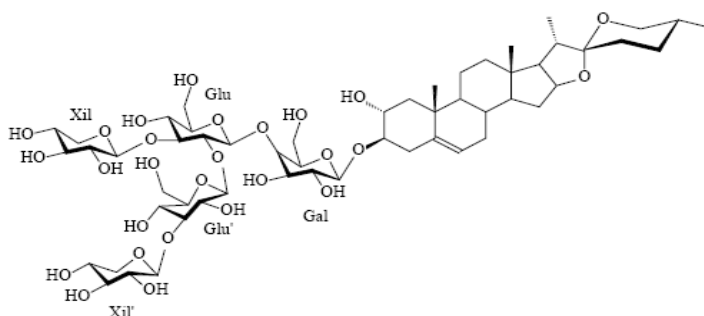


Fig.1.2: Estructura de una saponina esteroidea.

3-O-((β-D-xilopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil-(1→2))(β-D-xilopiranosil-(1→3))-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-

25R-espiros-5-en-2α, 3β-diol. (Agabritanosido A).

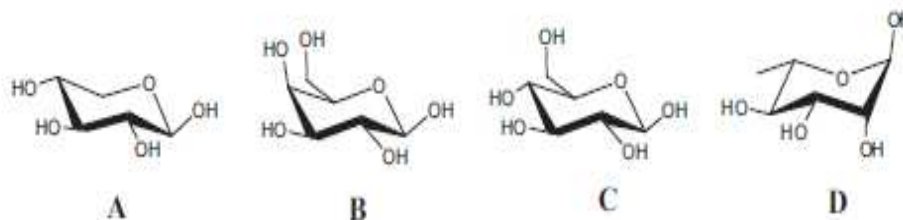


Fig. 1.3: Estructura de los monosacáridos más frecuentes en las saponinas aisladas,  $\beta$ -D-xilosa (A),  $\beta$ -D-galactosa (B),  $\beta$ -D-glucosa (C),  $\alpha$ -L-ramnosa(D)(Pérez de Armas, 2011).

El aglicón en las saponinas esteroidales (sapogeninas) presenta el esqueleto tetracíclico característico de este tipo de compuestos, denominado gonano (ciclopentanoperhidrofenantreno) en el caso de ser saturado.

La característica estructural fundamental de estas saponinas radica en la presencia de dos anillos adicionales que se originan a partir del C-17 del esqueleto base y están contenidos respectivamente en dos planos perpendiculares entre sí (Fig.1.4).

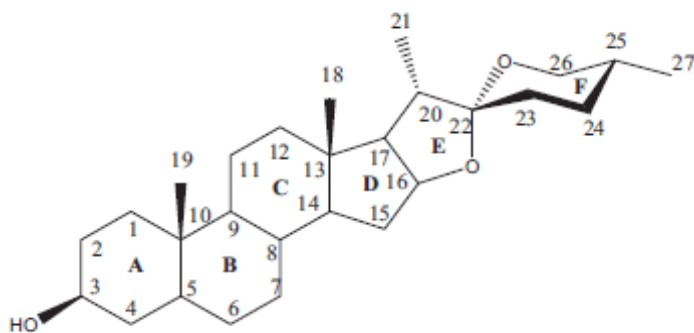


Fig.1.4: Estructura de una saponina esteroideal con dos anillos adicionales a partir de C-17.

Además, el átomo de carbono común a estos nuevos anillos está unido a dos átomos de oxígeno (estructura de una cetal) por lo que a esta cadena lateral se le ha dado el nombre de cadena espirocetálica. Las saponinas pueden clasificarse de acuerdo a la estructura de los anillos E y F en espiroestano, furostanos y furoespiroestano fundamentalmente, siendo el primer grupo el más importante (fig.1.5). Del mismo modo que muchos esteroides naturales, las saponinas presentan una unión trans entre los anillos A y B por lo que se consideran derivados de la serie  $5\alpha$ , además todos presentan grupos metilos en C-10 y C-13 dirigidos hacia la cara  $\beta$  de la molécula. En el caso de que las saponinas posean una insaturación entre C-5 y C-6 se clasifican como  $\Delta^5$ espirostanos(Guerra de León, 2005).

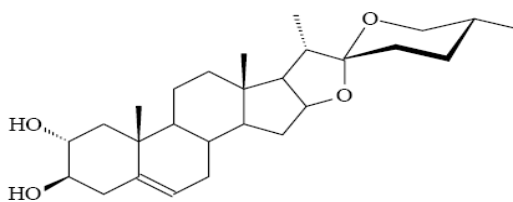


Fig.1.5: Estructura de una Sapogenina espirostánica.

25R-espirost-5-en-2 $\alpha$ , 3 $\beta$ -diol (Yucagenina).

Adicionalmente a otros tres esteroides las sapogeninas presentan centros quirales en C-22y C-25, determinando este último dos series para la clasificación de estos compuestos la serie “iso” (configuración 25 R) y la serie “neo” (configuración 25 S)(Lapin, 1957).

Los enlaces glicosídicos pueden tener configuración  $\alpha$  y  $\beta$  y se establecen entre las posiciones 1-2, 1-4 o 1-6 de las moléculas de monosacáridos. Este resto glicosídico, que puede ser lineal o ramificado generalmente se une con el aglicón a través de C-3 del mismo.

Las saponinas furostánicas son similares a las espirostánicas pero con el anillo F abierto (Pérez de Armas, 2011).(Fig 1.6)

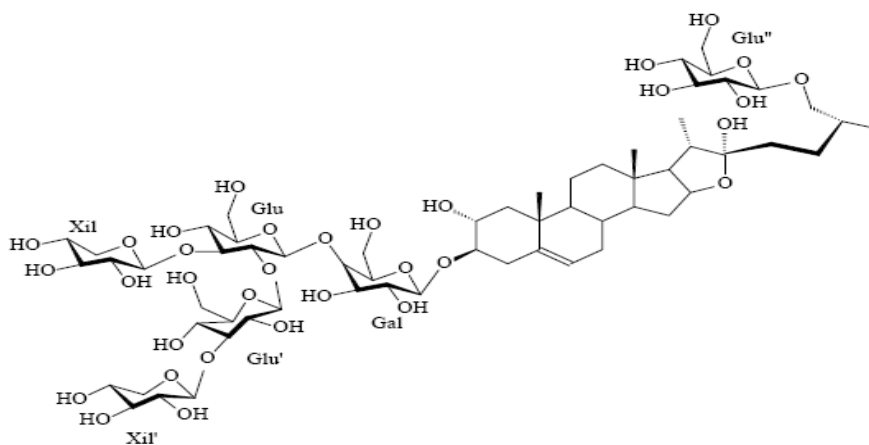


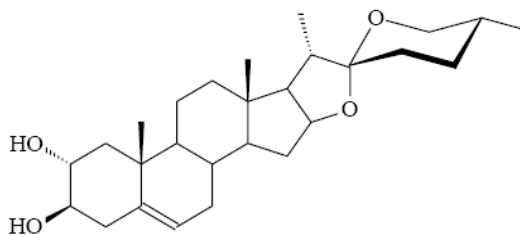
Fig 1.6: Estructura de una saponina furostánica.

### 1.3.2.3. Sapogeninas y saponinas mayoritarias del *Agave brittoniana* T

A continuación se muestran algunas sapogeninas y saponinas mayoritarias del *Agave brittoniana* T aisladas anteriormente (León 2007) las demás estructuras se encuentran en el Anexo A (ver anexo A).

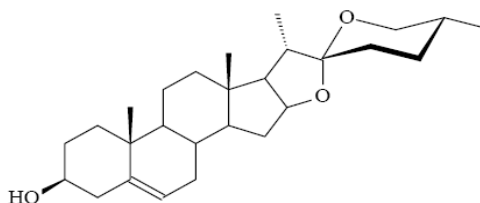
#### Yucagenina

25R-espirost-5-en-2 $\alpha$ , 3 $\beta$ -diol.(Guerra de León, 2005)



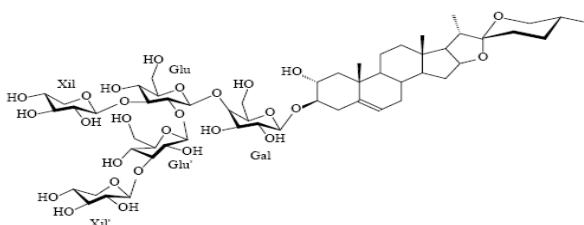
### Diosgenina

25R-espirost-5-en-3 $\beta$ -ol (Guerra de León, 2005).



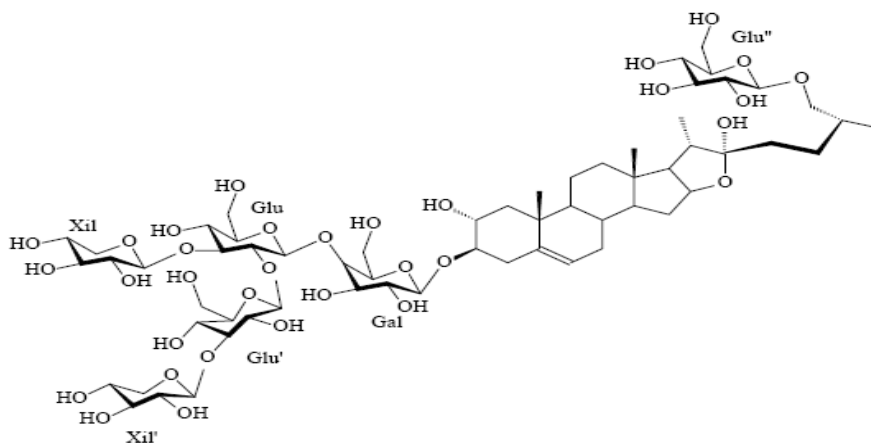
### Agabrittonósido A

3-O-(( $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2))( $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)))- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopiranosil-25R-espiros-5-en-2 $\alpha$ , 3 $\beta$ -diol (Guerra de León, 2005).



### Agabrittonósido B

3-O-(( $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2))( $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)))- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopiranosil-26-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-25R-furost-5-en-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ , 22 $\alpha$ -triol (Guerra de León, 2005).



#### 1.3.2.4 Actividad biológica de las saponinas.

Los estudios sobre las propiedades biológicas de las saponinas se incrementan en la última década, lo cual está relacionado con el hecho de que muchas de las plantas ricas en estos metabolitos son utilizadas por diversas poblaciones como medicina folclórica en el tratamiento de diversas enfermedades, en formas de ungüentos, cocimientos, complementos alimenticios, etc. La medicina tradicional china es un ejemplo donde las saponinas y polifenoles son considerados ingredientes claves, responsables de muchos efectos biológicos observados (Sparg, 2004).

Se conoce como regla general, que las saponinas espirostánicas son más activas que las furostánicas. De éstas, las derivadas de la Hecogenina y Tigogenina son las más encontradas con frecuencia en esta familia de plantas, de las cuales se probó una mayor diversidad de propiedades biológicas. Por otra parte, cuantos más grupos funcionales están presentes en el aglicón, menos activas resultan las saponinas. Por su parte, los restos de azúcares son de importancia en los distintos mecanismos de acción. Así, las saponinas con cadenas glicosídicas de cuatro a seis unidades de azúcares son habitualmente más activas (Kim, 1998)

A continuación se muestran los métodos de extracción para la obtención del crudo de saponinas y el aislamiento de las mismas que se han encontrado en la literatura.

#### 1.3.2.5 Actividad antiinflamatoria de las saponinas

Numerosas plantas contienen saponinas con actividad antiinflamatoria. Dentro de estas podemos citar las saponinas esteroidales de las especies *Dracaenamannii* (Dracaenaceae), *Smilax china* (Liliaceae), así como plantas del género agave, y familias Apiaceae, Araliaceae, Campanulaceae, Combretaceae, Fabaceae, Primulaceae y Ranunculaceae (Takur et al., 2011).

Saponinas aisladas de especies de plantas han mostrado actividad antiinflamatoria aguda al ser evaluada empleando el modelo experimental de edema inducido por carragenina. En un estudio realizado por Gepdiremen et al., (2005), dos saponinas aisladas a partir de *Hederahelix* y dos de *Hederacolchica*, mostraron actividad antiinflamatoria aguda siendo más efectivas en la segunda fase de la inflamación (de 1 a 4 horas después de la administración oral de 0.02 mg/Kg). Zhang et al., (2008) reportaron la inhibición de varios mediadores de la inflamación (IL-18, IL-1 $\beta$  y metaloproteinasas 2 y 9) por saponinas aisladas de *Panaxnotoginseng* en el tratamiento de la alteroesclerosis, enfermedad cardiovascular que se puede desarrollar por etapas inflamatorias crónicas. En estudios previos realizados por Cho et al., (2001)(Kim, 1998) se había reportado que los ginsenósidos (Rb1 and Rb2), obtenidos de las raíces de *Panax ginseng*, suprimieron la producción del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en macrófagos de roedores (RAW264.7) y humanos (U937) estimulados por LPS.

#### **1.4 Extracción y aislamiento**

En la literatura se encuentra una gran cantidad de trabajos en los que se reportan la extracción de saponinas. En los mismos se aprecia la existencia de una metodología común que se puede resumir en los siguientes pasos:

- 1- Proceso de desengrase del material vegetal: El mismo tiene como objetivo eliminar los compuestos lipídicos que posee la planta, que pueden afectar operaciones posteriores. El desengrase puede efectuarse directamente al material vegetal o a extractos obtenidos de este (Rana, 1993).
- 2- Obtención del “crudo” de saponinas: Se realiza la extracción del material vegetal empleando solventes polares tales como metanol, etanol y n-butanol o mezclas hidroalcohólicas de cada uno de ellos. El n-butanol es muy utilizado por su afinidad por estos tipos de compuestos (Rana, 1993).
- 3- Hidrólisis de las saponinas: Generalmente se realiza por vía química utilizando un ácido mineral como catalizador y su finalidad es liberar las saponinas (Marker, 1943).
- 4- Extracción de las saponinas liberadas en el proceso de hidrólisis: En este proceso se utilizan solventes de mediana polaridad como acetato de etilo y cloroformo (Marker, 1943).

Entre los trabajos que utilizan estos procedimientos están los de Marker y Wagener (Marker, 1943) quienes en 1943 logran aislar 13 sapogeninas y las caracterizan mediante métodos químicos laboriosos. Otros trabajos en los que se extraen sapogeninas de plantas del género *Agave* también utilizan la hidrólisis con ácidos minerales con la diferencia de que en unos casos se hidrolizan directamente el jugo que se extrae de las hojas mientras que en otros se hidrolizan los extractos obtenidos por maceración del material vegetal seco con solventes polares (Lapin, 1957, Callow, 1955). También en el trabajo de Leonardo Pérez y Andrea Quitián se utiliza el soxhlet para realizar la extracción del jugo (Pérez Ochoa, 2009).

En el aislamiento y purificación de estos compuestos los métodos cromatográficos juegan un papel importante. En la literatura se reporta el uso de la cromatografía de capa delgada preparativa (CCDP) (Heftman, 1976) y cromatografía de columna (CC) (Usubillaga, 1987). Entre los adsorbentes más utilizados en estas técnicas se encuentran la alúmina, sílicagel de diferentes granulometrías y más recientemente sephadex LH-20 (Hostettmann, 1985, Espejo, 1951). La cromatografía gaseosa (CG) (Hostettmann, 1985, Robaina, 1979) y más recientemente la cromatografía líquida de alta resolución (HPL) (Callow, 1955) así como las técnicas cromatográficas de partición a contracorriente RLCC (Rotation Locular Countercurrent Chromatography) (Hostettmann, 1985, Lapin, 1957) se ha utilizado con estos propósitos.

En algunos trabajos encontrados en la literatura aparece el uso combinado de estas técnicas, especialmente en el caso de las saponinas, que por ser altamente polares y solubles en agua su purificación es una tarea difícil, como ejemplo de esto último son los trabajos de Fukahara y Kubo (Fukahara, 1991) en los cuales se logró la obtención de glicósidos con propiedades alelopáticas combinando técnicas basadas en la partición.

### **1.5 Hidrólisis de las saponinas**

De acuerdo con la literatura la conversión de saponinas a sapogeninas requiere de un proceso de hidrólisis, que facilite el rompimiento del enlace glicosídico. Para este trabajo se consideró una hidrólisis ácida como el método más conveniente, teniendo en cuenta aspectos económicos y técnicos. A través de esta se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada generalmente sapogenina. Su tamaño molecular se encuentra entre los 600 Da y los 2700 Da, pero cuando forman micelas pueden llegar a tener un peso molecular entre 70 y 150 kDa (Guerra de León, 2005).



*Materiales y  
Métodos*

## **Capítulo II: Materiales y métodos**

### **2.1. Principales equipos.**

- Estufa (BinderUSA)
- Molino de cuchillas (KMf 10 basic .IKA<sup>R</sup> WERKE)
- Balanza analítica (Gibertini)
- Balanza técnica (Sartorius BP410).
- Rotoevaporador IKA RV10basic.
- Molino de masa

### **2.2 Técnicas cromatográficas.**

- Cromatografía de columna sobre fase normal utilizando como fase estacionaria SiO<sub>2</sub> con granulometrías 70-230 mesh y 230-400 mesh.
- Placas cromatográficas (soporte de vidrio) Silicagel 60F254 (fase normal)

### **2.3. Reactivos y disolventes.**

Todos los disolventes y reactivos utilizados son de las firmas MERCK y Panreac.

### **2.4 Recolección del material vegetal.**

Las hojas de *Agave brittoniana* T fueron recolectadas en horas de la mañana en el Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. El material recolectado fue trasladado en sacos de polietileno al Laboratorio de Química Orgánica del departamento de Licenciatura en Química de la Facultad de Química-Farmacia y lavado con abundante agua potable. Previo al procesamiento del material, se realizó la comprobación botánica de la especie por un experto, el MsC. Idelfonso Castañeda Noa, profesor auxiliar del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Ejemplares de la planta se compararon con muestras identificadas en el herbario localizado en la citada institución, bajo el número de serie HPVC # 5445.

#### **2.4.1 Preparación del material vegetal.**

Cada hoja de la planta se cortó en pequeños pedazos, retirándole la corteza, luego se secó mediante calor artificial utilizando estufa Binder (USA) a 50°C, extendiendo estos pequeños pedazos en toda la superficie de la estufa. Las hojas se secaron durante 10 días

hasta obtener un peso constante, para luego ser molinadas en un molino de cuchillas con una apertura de malla de 3 mm marca KMf 10 basic .IKA<sup>R</sup> WERKE, logrando obtener un polvo fino.

A la droga seca y molinada se le determinó el contenido de humedad residual para verificar que se encuentra dentro del rango permisible según la Norma Ramal de Salud Publica # 309 (Ochamendi y Durand, 1992 d).

## **2.5 Obtención de los extractos.**

Se prepararon tres crudos por diferentes procedimientos extractivos: Maceración en etanol 70%, extracción por Soxhlet con butanol saturado y el molinado directo de hojas frescas de la planta.

### **A) Extracción por Maceración.**

El material vegetal seco y molinado, se maceró en etanol al 70%, protegido de la luz, durante 7 días, hasta decoloración total de la mezcla. El extracto hidroalcohólico obtenido se evaporó a 40° C bajo presión reducida, hasta obtener una mezcla pastosa que contiene el crudo de metabolitos, la cual fue colocada en la estufa a 40° C hasta su secado total. 10g del extracto seco se resuspendieron en una porción de agua y colocados en un embudo separador añadiendo n-butanol saturado para la obtención del extracto butanólico. Finalmente se rotoevapora hasta que sequedad total.

A demás al extracto hidroalcohólico se le determinó pH, densidad y sólidos totales.

#### Sólidos totales.

$$ST_{(1\text{ ml})} = P_1 - P_0$$

$$ST_{(1L)} = (ST_{(1ml)} * 1000ml) / 1ml$$

Donde:

ST<sub>(1 ml)</sub>- son los sólidos totales contenidos en 1 ml.

P<sub>0</sub>-es la masa del vidrio reloj vacío (g).

P<sub>1</sub> -es la masa del vidrio reloj con la muestra seca (g).

#### Determinación de la densidad relativa.

$$\rho = m/V$$

Donde:

ρ- Densidad relativa (mg/L).

m- Masa de la muestra (g).

V- Volumen del picnómetro (ml).

### **B) Extracción por Soxhlet**

Se utilizó una masa de material vegetal seco de 10g, a la cual se le realizó una extracción con n-hexano y cloroformo como un primer paso para eliminar las grasas durante 1 y 3 horas respectivamente, por último se extrajo con n-butanol para la obtención del crudo de saponinas, al cabo de 4h el extracto se rotoevaporó hasta sequedad total.

### **C) Extracción del Jugo.**

Este procedimiento se realizó en un molino de masa, para ello se utilizaron las hojas verdes sin daño visible.

Una vez obtenido el jugo se procedió a la determinación de los sólidos totales para la preparación posterior del crudo de saponinas a partir del jugo. Se añadió en el embudo separador la cantidad de ml equivalentes a 10g de sólidos totales y se procedió a mezclarlos con n-butanol saturado, de la misma forma que A. Al jugo se le determinó pH, densidad y sólidos totales (ver método A).

Para continuar con la metodología de trabajo se seleccionó el extracto obtenido por el método A puesto que es el que se ha utilizado en la literatura consultada y además es el que mayor efecto antiinflamatorio presentó (ver epígrafe 3.4).

## **2.6 Fraccionamiento del crudo de saponinas**

Para la realización de la columna cromatográfica se escogió como fase estacionaria silicagel fase normal ya que debido a las características económicas de nuestro país no se puede acceder a ella puesto que es muy cara y la que se recomienda la de la marca reconocida como Sephadex.

La columna se preparó por vía húmeda, añadiendo cuidadosamente en la columna de vidrio la silica-gel suspendida en el disolvente de elución (cloroformo/metanol en la proporción 7:3), cuidando la uniformidad del lecho formado para que no se formen burbujas. Para su aplicación a la columna 1g de muestra fue disuelta previamente en metanol y se mezcló con 2g de silica-gel, se rotoevaporó hasta obtener la misma en forma de un sólido completamente seco adsorbido en la sílica, que fue aplicado en la columna.

La comprobación de la separación en la columna se realizó por CCD fase normal utilizando como fase móvil una mezcla de cloroformo/metanol en relación 7:3 y el revelador utilizado fue H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

## 2.7 Hidrólisis ácida.

Se disolvió 1g de crudo en 15ml de etanol, luego fue añadido 5ml de HCl de concentración molar equivalente 2ml/l y calentando a reflujo durante 3 horas, se calentó hasta reducir su volumen a la mitad y por último se realizó una extracción con acetato de etilo.

La comprobación del resultado de la hidrólisis se realizó en CCD (Cromatografía de capa delgada) utilizando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo/n-hexano 2:1y fue revelado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado

## 2.8 Determinación de la actividad antiinflamatoria en animales de laboratorio

Fueron probados los crudos de saponinas obtenidos por el método A y B, así como el crudo de saponinas del método A, obtenido por hidrólisis ácida.

El estudio se desarrolló en ratas Wistar con peso inicial comprendido entre 180 -200 g, a los que se les retiró el alimento 3 horas antes de la administración. Todos los productos del *Agave brittoniana* fueron probados a una dosis de 100mg/kg, por vía oral, empleando jeringuillas de 1 ml. El grupo control recibió solamente el vehículo y el control positivo indometacina (tab 25 mg) como agente antiinflamatorio (7 mg/kg). Una hora después de la administración del producto, se administró el inductor de la inflamación, 0,1 ml de una solución del carragenina (1%) en solución salina fisiológica en la aponeurosis plantar derecha posterior del ratón.

El grosor de la pata inyectada fue medido con cinta métrica, antes y después de la inyección con carragenina. Se realizaron tres réplicas que cumplan con un coeficiente de variación menor del 4 %.

Se calcularon los porcentajes de inflamación e inhibición a las 1, 2, 3, 4 y 5 horas de la inyección de la carragenina utilizando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ inflamación fase aguda} = \frac{X_{DI} - X_{AI}}{X_{AI}} \times 100$$

$X_{AI}$ : grosor pata en cm antes de inducción

$X_{DI}$ : grosor pata en cm después de inducción en cada hora

$$\% \text{ inhibición fase aguda} = \frac{X_{\text{control}} - X_{\text{problema}}}{X_{\text{control}}} \times 100$$

$X_{\text{control}}$ : valor medio del porcentaje de inflamación en el grupo control

$X_{\text{problema}}$ : valor medio del porcentaje de inflamación en el grupo problema

Procesamiento estadístico: La significación estadística entre los grupos tratados y el grupo control, se calculó utilizando ANOVA por una vía seguido de un test de Bonferroni, con un nivel de significación de 0,05.



*Resultados y  
Discusión*

## Capítulo III: Discusión de los resultados

### 3.1 Resultados de la preparación del material vegetal

Se obtuvo una masa de 386,19g, con un valor promedio de 1.212% de humedad residual el cual se encuentra dentro del rango permisible según la Norma Ramal de Salud Pública # 309 (Ochamendi y Durand, 1992 d).

#### 3.1.1 Obtención del crudo de saponinas

##### A) Resultados de la extracción por Maceración

Tabla 3.1: Obtención del extracto hidroalcohólico

| Órganos | Masa seca | Extracto hidroalcohólico | % de extracción |
|---------|-----------|--------------------------|-----------------|
| Hojas   | 386.19g   | 57,11g                   | 14.78           |

Tabla 3.2 Propiedades determinadas al extracto hidroalcohólico

| Extracto hidroalcohólico |            |
|--------------------------|------------|
| Densidad                 | 0.89 mg/L  |
| Sólidos totales          | 0.0012 g/L |
| pH                       | 6.5        |

Mediante este método partiendo del material vegetal se obtuvo el extracto hidroalcohólico (tabla 3.1), al cual se le determinaron las siguientes propiedades: densidad, sólidos totales y pH (tabla 3.2).

Tabla 3.3 Obtención del extracto butanólico.

| Órganos | Extracto hidroalcohólico | Extracto butanólico | % de extracción |
|---------|--------------------------|---------------------|-----------------|
| Hojas   | 10g (67.62g MV)          | 3.18g               | 4.70            |

En la obtención del crudo de saponinas a partir del extracto hidroalcohólico se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 3.3.

## B) Resultados de la extracción por Soxhlet

Tabla 3.4: Obtención del extracto butanólico con el Soxhlet.

| Solvente de extracción | Masa del sólido extraído | Tiempo | % de extracción |
|------------------------|--------------------------|--------|-----------------|
| n-hexano               | 0,78                     | 1h     | 7.8             |
| cloroformo             | 0.83                     | 3h     | 8.3             |
| n-butanol              | 1.23g                    | 4h     | 12.3            |

## C) Extracción del Jugo

Tabla 3.5 Obtención del extracto butanólico del jugo.

| Órganos | Extracto hidroalcohólico | Extracto butanólico | % de extracción |
|---------|--------------------------|---------------------|-----------------|
| Hojas   | 10g(21,88g MV)           | 2,13g               | 9,73            |

Tabla 3.6 Propiedades determinadas al Jugo.

| Jugo            |           |
|-----------------|-----------|
| Densidad        | 1.02 mg/L |
| Sólidos totales | 70 g/L    |
| pH              | 5.49      |

Tabla 3.7 Comparación de los métodos.

| Métodos | % extracción |
|---------|--------------|
| A       | 4.70         |
| B       | 12.3         |
| C       | 9,73%        |

De acuerdo con los resultados de los tres métodos, el B es el que obtuvo mayor rendimiento, que puede ser debido a que la extracción se realizó con n-hexano y cloroformo para eliminar las grasas, mientras que por el método A se obtuvo menor rendimiento debido a que contiene un alto por ciento de grasas ya que se acordó no realizar un desengrase previo debido a las emulsiones que se forman por las características tensoactivas que poseen las saponinas. Con el método C se obtuvo un mejor rendimiento que en A puesto que tenía un contenido de sólidos totales mucho mayor, con un valor de 70g/L y A 0,0012g/L.



Fig. 3.1: Cromatograma comparativo.

Donde:

A-Extracto butanólico obtenido por maceración.

B-Extracto butanólico obtenido con el soxhlet.

C-Extracto butanólico obtenido del jugo.

Fase móvil: cloroformo/metanol 7:3.

En el cromatograma presentado anteriormente se muestra la comparación de los tres extractos obtenidos por las diferentes vías, mostrando que por el método A se obtiene una mezcla muy compleja que contiene además de las saponinas compuestos resinosos por eso la mancha que mostró tras ser revelada fue muy intensa y tiene como desventaja que se utiliza una gran cantidad de etanol, se consume mucho tiempo y no es posible realizar un desengrase previo para limpiar el extracto ya que se forman emulsiones, mientras que el método B muestra una mancha más definida pero de baja intensidad debido a que puede que hayan saponinas que no aparezcan, esto se pudo comprobar al realizar la prueba de la espuma que reveló que de los tres métodos el tenía un mayor

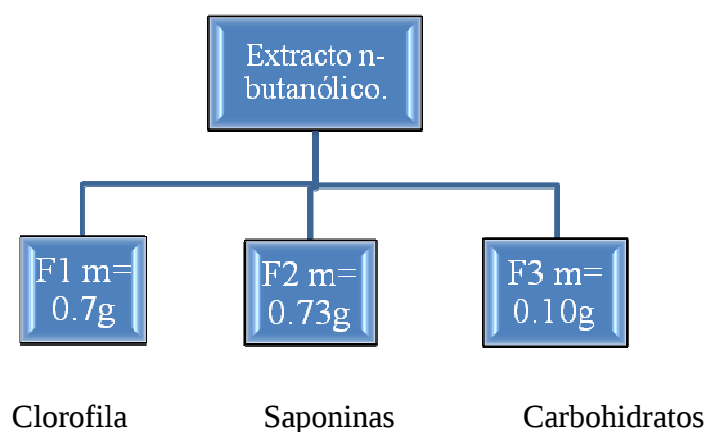
contenido de saponinas, el A por la altura de la espuma y por el tiempo de permanencia; una de sus ventajas es que se ahorra tiempo y etanol ya que la extracción se hace primero con n-hexano y cloroformo, y con la desventaja que se sometió a calentamiento provocando cambios estructurales en los compuestos. El procedimiento C presenta una mancha similar a la del método A aunque es más clara; su ventaja es que es un método más fácil y cómodo en caso de que no se cuente con los materiales necesarios.

Como el método A es el que provoca menor daño en las estructuras y el que mayor resultado mostró en la actividad biológica (ver epígrafe 3.4) fue seleccionado para realizar los estudios posteriores.

### 3.2 Resultados del fraccionamiento del crudo de saponinas

Al correr la columna se observó un aro verde característico de la clorofila y posteriormente descendió un líquido del mismo color del solvente inicialmente adicionado perteneciente a las saponinas ya que son compuestos medianamente polares y por último un aro de color pardo oscuro representativo de los azúcares. Mientras que si se hubiese utilizado fase inversa el orden de salida de los productos sería al revés, salieran los compuestos más polares primero, luego los medianamente polares y por último los compuesto polares; es decir primeramente salen los azúcares, luego las saponinas y finalmente la clorofila. La cromatografía de fase normal tiene como desventaja que una gran cantidad de sólido queda irreversiblemente adsorbido en la sílica.

Inicialmente se obtuvieron 152 fracciones puesto que se duplicó la columna, estas fueron monitoreadas tanto por el método visual como por CCD para agruparlas según su color y su similitud cromatográfica. Finalmente se obtuvieron tres fracciones; la 1 correspondiente a la clorofila, 2 a las saponinas y 3 a los carbohidratos.



### 3.3 Resultados de la hidrólisis ácida del extracto butanólico

Tabla 3.8 Resultados obtenidos en el proceso de hidrólisis.

| Solventes utilizados | Masa del sólido extraído | Color    |
|----------------------|--------------------------|----------|
| Acetato de etilo     | 0.82g                    | Grisaceo |

La hidrólisis fue completa, se pudo comprobar mediante la prueba de la espuma ya que no había indicios de espuma en la muestra de acetato de etilo y tampoco se solubilizó en agua, esta característica es propia de las sapogeninas puesto que son solubles en lípidos.

#### 3.3.1 Comparación cromatográfica

Se realizó una comparación mediante CCD de un patrón de yucagenina y diosgenina con el producto extraído con acetato de etilo (sapogenina). El cromatograma se muestra en la Fig 3.2.

Fig 3.2: Cromatograma.



Donde:

1-Patrón de diosgenina.

2-Patrón de yucagenina.

3-Sapogeninas

Fase móvil: Acetato de etilo/n-hexano 2:1

Revelador: Acido sulfúrico.

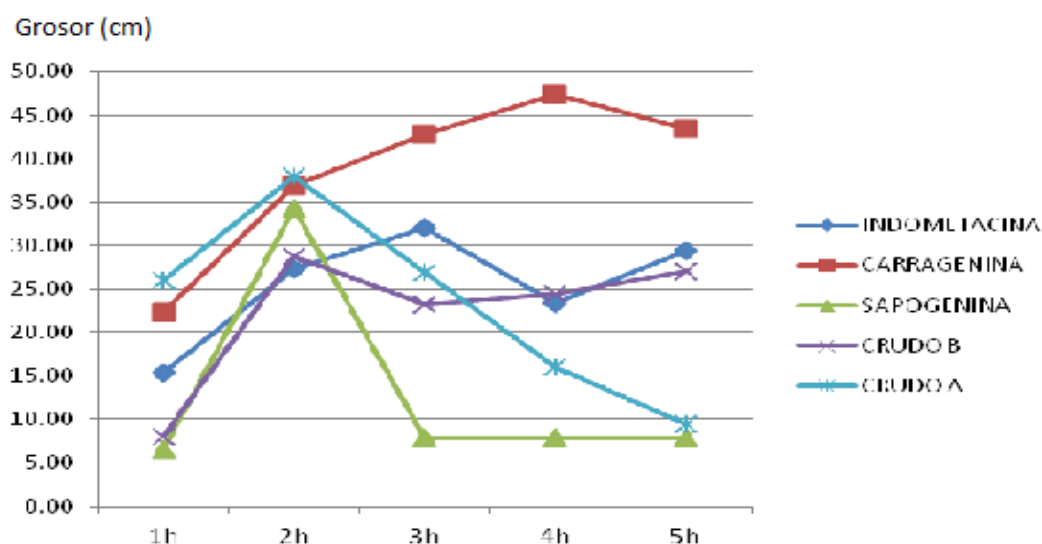
En el cromatograma mostrado se puede apreciar que en la muestra aplicada hay una manchas poco definidas que no se puede asegurar si es diosgenina ya que el patrón tiene

un  $R_f = 1,67$ , pero si tenemos indicios de la presencia de clorogenina con un  $R_f = 0,41$  y yucagnina a un  $R_f = 0,60$  esto coincide con lo reportado en la literatura (Guerra de León, 2005) ya que la mayoría de las saponinas de la planta tiene como esqueleto base la yucagenina, por lo que podemos decir que la hidrólisis fue completa ya que se observa el corrimiento de las manchas en la placa.

### 3.4 Resultados de la determinación de la actividad antiinflamatoria en animales de laboratorio

En el ensayo de inflamación aguda por inducción de edema plantar en rata, fueron evaluados los crudos obtenidos por el método A y B, así como la sapogenina obtenida por hidrólisis ácida. Se decidió no evaluar en los ensayos biológicos, el crudo obtenido por C, porque un examen previo arrojó que a las 2 horas de ser administrado en un animal, este falleció sin poder definir si la causa fue la administración del crudo, que como dato adicional fue el producto más ácido de los obtenidos a partir de la planta ( $pH = 5.49$ ).

Los porcentajes de inflamación se muestran en la tabla de porcentajes de Inflamación en cada grupo experimental en Modelo agudo por inducción de Edema plantar por administración de carragenina. Los resultados se expresan como la  $MEDIA \pm DE$  (cm) (ver anexo B).

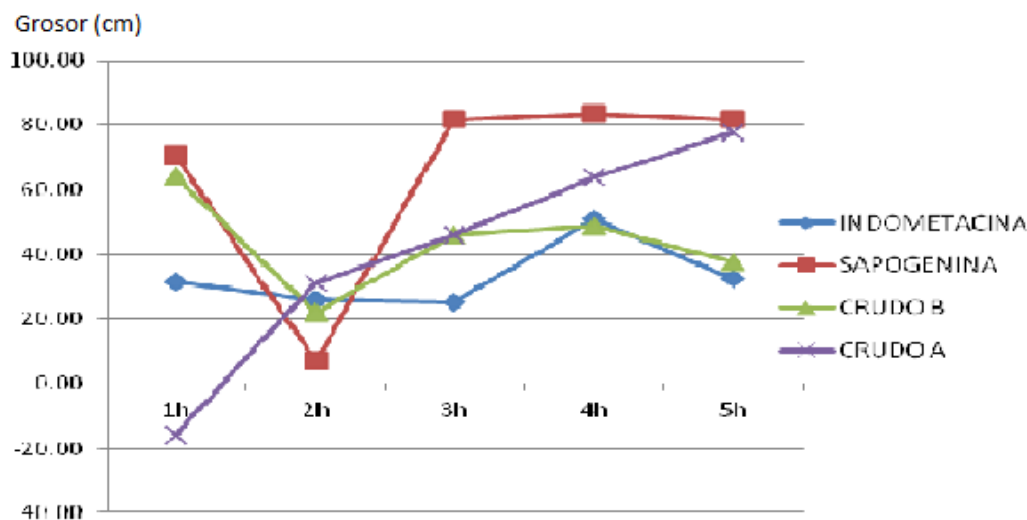


**Fig 3.3 Porcentaje de Inflamación en modelo agudo.** El crudo A y B se corresponden con los obtenidos por los métodos extractivos A y B anteriormente descritos

El crudo A y B se corresponden con los obtenidos por los métodos extractivos A y B anteriormente descritos.

Los resultados muestran un potente efecto antiinflamatorio de los crudos de saponinas y sapogeninas, incluso mayor que la indometacina, fármaco antiinflamatorio utilizado como antiinflamatorio sintético. El test ANOVA de un factor, demuestra diferencias entre los grupos y para cada una de las horas en que se hizo el muestreo, excepto a las 2 horas, donde es máximo el efecto de la carragenina, lo que coincide con otros reportes (Suyenaga, 2002). Un test de Bonferroni nos demuestra que a las 4 horas de administrada la carragenina (ver Anexo B, fig: 4). todos los grupos de tratamiento habían reducido significativamente el porcentaje de inflamación. Debemos señalar que a las 3 horas de inducida la inflamación la sapogenina era el producto con mayor reducción de la inflamación aguda. Al finalizar el estudio los productos A (ver Anexo B, fig: 1), B (ver Anexo B, fig: 1) y el crudo de sapogeninas (ver Anexo B, fig: 3) redujeron significativamente el por ciento de inflamación sin diferencias significativas entre ellos.

El gráfico que se muestra a continuación representa los porcentajes medio de inhibición por grupo obtenidos durante el estudio.



**Fig 3.4 Porcentaje de Inhibición en modelo agudo de Inflamación. El crudo A y B se corresponden con los obtenidos por los métodos extractivos A y B anteriormente descritos.**

Los resultados aplicando ANOVA de una vía demuestran diferencias desde la primera hora de aplicado el inductor ( $\alpha < 0,01$ ). El test de Bonferroni permitió demostrar que el crudo obtenido por el método A y el crudo de sapogeninas provenientes de este mismo método, son los de mejores resultados, presentando por cientos de inhibición de la inflamación superiores a la Indometacina (ver Anexo B, fig: 5). El crudo obtenido por el método B presenta actividad antiinflamatoria, en este caso inferior a los dos compuestos probados del *A. brittoniana* pero comparable a la indometacina.

El fuerte poder antiinflamatorio observado en los tres productos extraídos de la planta por diferentes métodos, permite demostrar que los procesos extractivos no alteran posiblemente la parte activa de la molécula. Sin embargo las diferencias observadas en el mayor poder antiinflamatorio del crudo obtenido por el método extractivo a partir del embudo separador, y el mayor efecto antiinflamatorio del crudo de sapogenina, demuestra que el anillo esteroidal es el responsable de la actividad antiinflamatoria y que este es absorbido a nivel intestinal y llega a las células diana a través de la circulación sistémica. El proceso extractivo que implica aplicar calor a la muestra, posiblemente destruye en algún grado las estructuras moleculares disminuyendo así la biodisponibilidad y la consecuente efectividad antiinflamatoria del crudo. Estos aspectos deberán ser comprobados en estudios farmacocinéticos y de relación estructura actividad.



*Conclusiones*

## Conclusiones

- El método extractivo de mayor actividad antiinflamatoria fue el de la maceración con un gran contenido de saponinas.
- El procedimiento para el fraccionamiento del crudo de saponinas utilizando cromatografía de columna fase normal, logró una separación eficaz del crudo de saponinas obteniéndose tres fracciones.
- Los crudos de saponinas y sapogeninas mantienen su potencial antiinflamatorio *in vivo*, aunque el crudo proveniente del método extractivo por Soxhlet presenta valores disminuidos con respecto al resto de los productos



*Recomendaciones*

## Recomendaciones

1. Fraccionar por técnicas de MPLC y HPLC los crudos de saponinas obtenidos para lograr la separación de las saponinas en furostánicas y espirostánicas.
2. Realizarle un espectro IR a los tres extractos obtenidos para comprobar si ocurrieron cambios estructurales en las moléculas.
3. Diseñar modelos predictivos para dilucidar actividad antiinflamatoria de saponinas presentes en la planta, así como su posible mecanismo de acción.
4. Evaluar *in vivo* la actividad antiinflamatoria de saponinas purificadas presente en el *Agave brittoniana* Trel.



*Referencias  
Bibliográficas*

## Bibliografía

- AGRAWAL, E. 1985. "Carbon-13 spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins". *Phytochem*, 2479-2496.
- ALVAREZ, A. 1995. "Los agaves de las Antillas". *Bol. Soc. Bot. México*, 57, 37-48.
- ALVAREZ, C. P., R. 2006. "Actividad biológica de las saponinas de la corteza de *Inga marginata* Willd". *Revista colombiana de Ciencias Químico – Farmacéuticas*. .
- ALVAREZ DE ZAYAS, A. 1996. "Los agaves de Cuba Central". *Fontqueria*, 44, 117-128.
- BERNIC, S. & KANE, S. 2011. Inflammatory Bowel Disease. In *Diarrhea*. . *Humana Press*, 61-79.
- BERNIC, S. K., S. 2011. "Inflammatory Bowel". In *Diarrhea humana Press*. 61-79.
- CALLOW, R. 1955. "Sapogenins from *Agave sisiliana*". *J. Chem. Soc.*, 1671.
- CUÉLLAR, C. A. A. M., M.M. 2001. "*Farmacognosia y productos naturales*". , La Habana.
- ESPEJO, O. 1951. "Spirostanic diosgenin precursors from *Dioscorea* composite tubers". *Phytochemistry*, 21, 413-416.
- FUKUHARA, K. K., I. 1991. "Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum* by two countercurrent chromatographic methods". *Phytochemistry*, 30, 685-687.
- GOLA, G. 1966. "*Tratado de Botánica*", La Habana.
- GONZÁLEZ-ELIZONDO, M. 2004. "Plantas medicinales del estado de Durango y Zonas aledañas". *Dirección de publicaciones del Instituto Politécnico Nacional*.
- GUERRA DE LEÓN, J. O. 2005. "Compuestos con actividad antiparasitaria del *Agave brittoniana* T.". 116-173, 181-188.
- HEFTMAN, E. 1976. "*Chromatography of steroids*", Amsterdam.
- HIGGIN, J. W. 1976. "A high-performance liquid chromatographic analysis of benzoate esters of sapogenins isolated from *Agave*". *J. Chromatographic*, 121, 329-334.
- HOSTETTMANN, K. H., M; MARSTON, A. 1985
- "*Preparative Chromatography Techniques. Application in Natural Product Isolation*", Berlín.
- KHOR, B., GARDET, A. & XAVIER, R. J. 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474, 307-17.
- KHOR, B. G., A AND XAVIER, R. J. 2011. "Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease". *Nature*, 474, 307-317.
- KIM, D. S. O., S. R.; LEE, I. S.; JUNG, K. Y.; PARK, J. D.; KIM, S. I.; LEE, H. K. 1998. "Anticomplementary activity of Ginseng saponins and their degradation products"
- 47, 397-399.
- LAPIN, H. S., B. 1957. "Sapogenin isolates from Agaves". *J. Soc. Chem*, 1237.
- LEÓN, H. 1946. "*Flora de Cuba*", Cuba, La Habana.
- MACIAS, F. A. G., J. O.; SIMONET, A. M.; NOGUEIRAS, C. M. 2007. "Characterization of the fraction components using 1D TOCSY and 1D ROESY experiments. For new spirostane saponins from *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus*". *Mag. Reson. Chem*, 615-620.
- MAKKAR, H. P. S. S., P. 2005. "Methods in Molecular Biology: Plant Secondary Metabolites." 393.
- MARKER, R. W., R; ULSHAFFER, P. 1943. "Isolation and structure of thirteen steroidal sapogenins". *J. Am. Chem. Soc.*, LXV, 1199.

- MRAD ORTEGA, A. 2002. "Algunos aspectos de los géneros Agave y foucrea como causante de enfermedades ocupacionales". *Química Farmacéutica de la Universidad Nacional de Colombia*, 77-78.
- PARMAR, S. J., H.N; GUPTA,A.K; PRASAD,A.K; GUPTA,S. 1992. "New Antibacterial Tetratriacontanol Derivatives From Agave americana L.". *Tetrahedron*, 48, 1281-1284.
- PENG, Z. J., F; HESHUI,Y;JIE,Z; LI PING,K; BAIS PING,M; XIAN ZHONG,Y. 2006. "The NMR studies on two new furostanol saponins from Agave sisalana leaves" *Mag.Reson.Chem*, 44, 1090-1095.
- PÉREZ DE ARMAS, A. J. 2011. "Estudio fitoquímico de especies nativas de Cuba pertenecientes a la familia Agavaceae y evaluación de sus actividades biológicas".
- PÉREZ OCHOA, J. L. Q. M., L.A. 2009. Evaluaciòn de mètodos de extracciòn de saponinas de los residuos de beneficio del fique".
- RANA, V. 1993. Molluscicidal steroidal glycoside from *Agave cantala*. *Int.J.Pharmacog*, 31, 65-67.
- ROBAINA, C. 1979. "Estudio fitoquímico del Agave fourcroydes". *Revista Cubana de Farmacia*, 59-61.
- ROIG, T. 1974. " *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas en Cuba*", La Habana.
- RUVALCABA-RUIZ, C. A. R.-G., B. 2002. "Aderrantmeiotic behavior in Agave tequilana weber var. azul. *BMC Plant Bioloy*, 1-14.
- SPARG, S. G. L., M.E; STANDEN,J.V. 2004. "Biological activities and distribution of plant saponins". *J. Ethnopharmacol.*, 94, 219-243.
- SUYENAGA, E. R., E; FARIAS, F; SCHAPOVAL, E; CHAVEZ, G; HENRIQUES, A. 2002. Antiinflammatory investigation of some species of Mikania. . *Phytoter Res*, 16, 519-23.
- USUBILLAGA, A. M., G 1987. "Steroidal sapogenins from Solanum sacorpioidum". *Naturals Products*, 50.

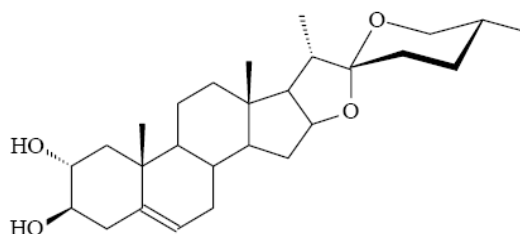


## Anexo A

### Sapogeninas aisladas de la planta

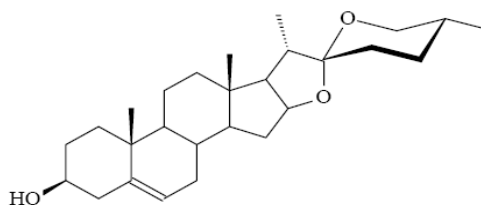
#### Yucagenina (1).

25R-espirost-5-en-2 $\alpha$ , 3 $\beta$ -diol.



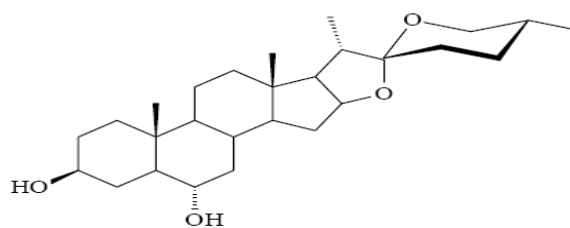
#### Diosgenina (2).

25R-espirost-5-en-3 $\beta$ -ol



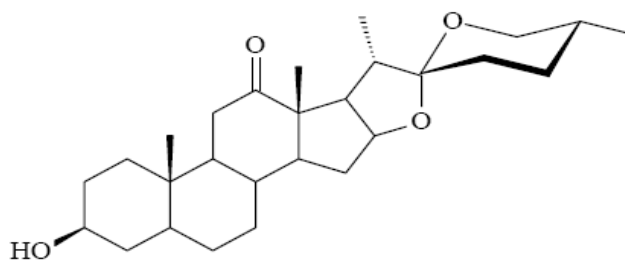
#### Clorogenina (3).

5 $\alpha$ , 25R- espirostano-3 $\beta$ , 6 $\alpha$ -diol



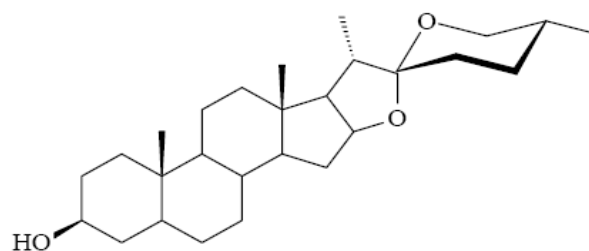
#### Hecogenina (4).

3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ , 25R-espirostan-12-ona



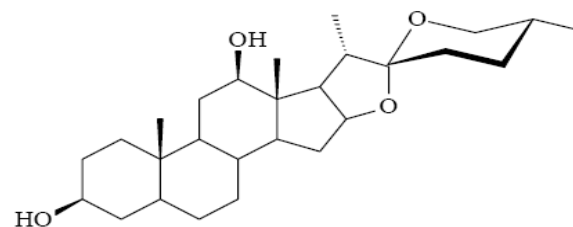
**Tigogenina (5).**

5 $\alpha$ , 25R-espirostan-3 $\beta$ -ol



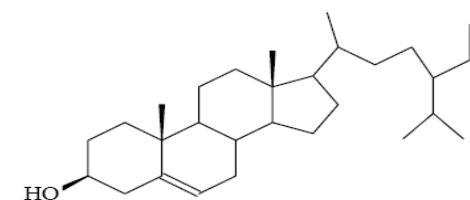
**Rockogenina(6).**

5 $\alpha$ , 25R-espirostano-3 $\beta$ , 12 $\beta$ -diol



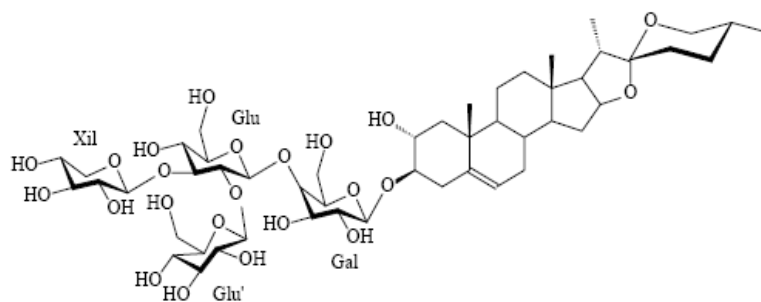
**$\beta$ -Sitosterol (7).**

$\Delta^5$ -estigmastan-3 $\beta$ -ol



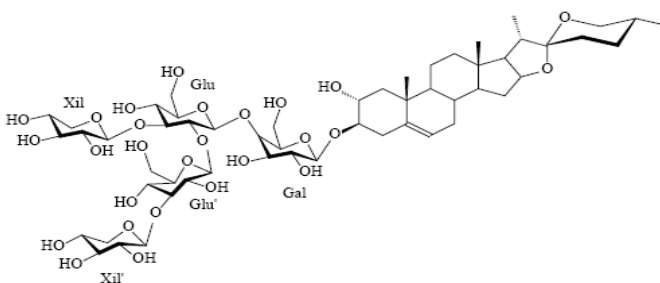
➤ **Saponinas aisladas de la planta.**

**Karataviosido (A) (8).**



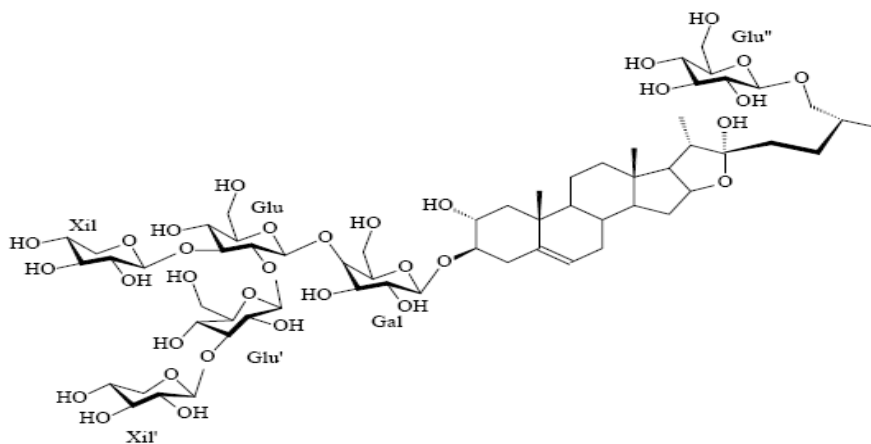
**Agabrittonósido A (9).**

3-*O*-((β-D-xilopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil-(1→2))(β-D-xilopiranosil-(1→3))-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-25*R*-epi-5-en-2α, 3β-diol.



**Agabrittonósido B (10).**

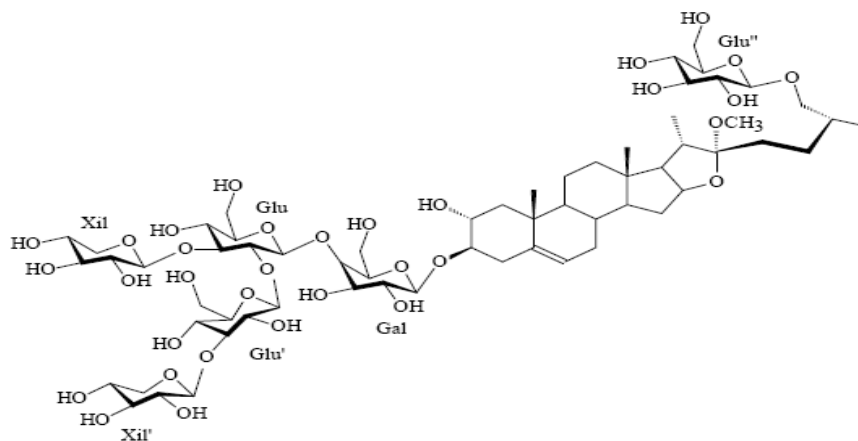
3-*O*-((β-D-xilopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil-(1→2))(β-D-xilopiranosil-(1→3))-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-26-*O*-β-D-glucopiranosil-25*R*-furost-5-en-2α,3β, 22α-triol.



**Agabrittonósido C (11).**

3-*O*-((β-D-xilopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil-(1→2))(β-D-xilopiranosil-(

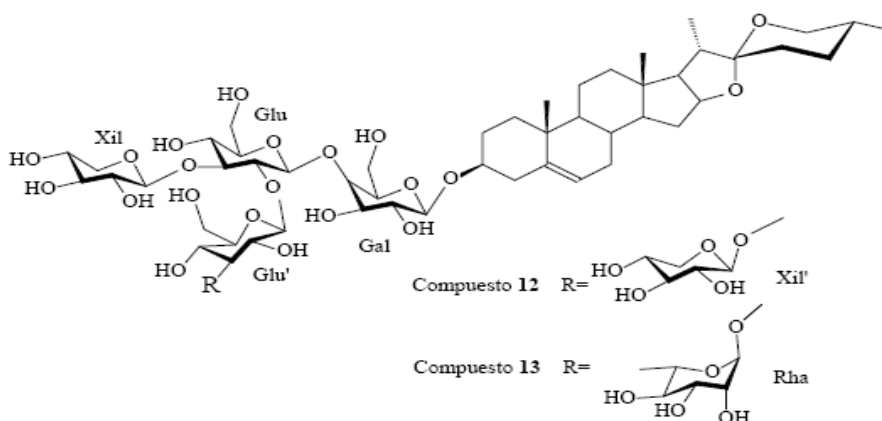
1→3))-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-  
26-O-β-D-glucopiranosil-22α-metoxi-25R-furost-5-  
en-2α, 3β-diol



#### Agabrittonósidos D (12) y E (13).

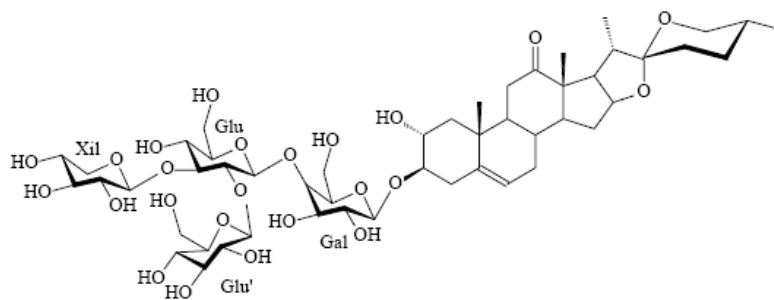
3-O-((β-D-xilopiranosil-(1→3)- β-D-glucopiranosil-(1→2))(β-Dxilopiranosil-(  
1→3))-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-Dgalactopiranosil-  
25R-espiros-5-en-3β-ol (D)

3-O-((α-D-rhamnopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil-(1→2))(β-Dxilopiranosil-(  
1→3))-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-Dgalactopiranosil-  
25R-espiros-5-en-3β-ol(E)



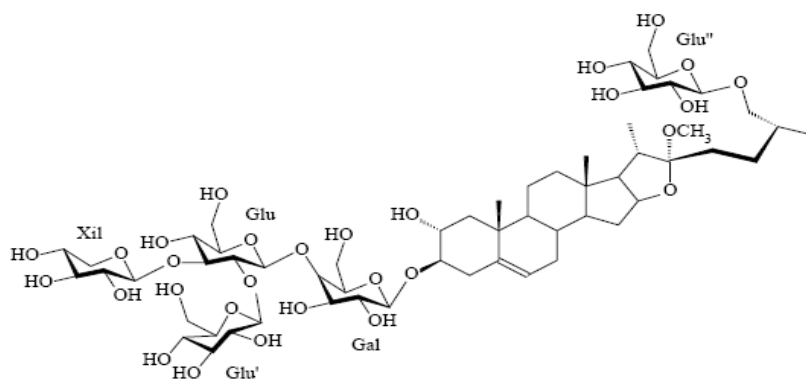
#### Agabrittonósido F (14).

3-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)(β-D-xilopiranosil-(1→3))-β-Dglucopiranosil-(1→4)-β-  
D-galactopiranosil-2α, 3β-dihidroxi-25Respirost-5-en-12-ona.



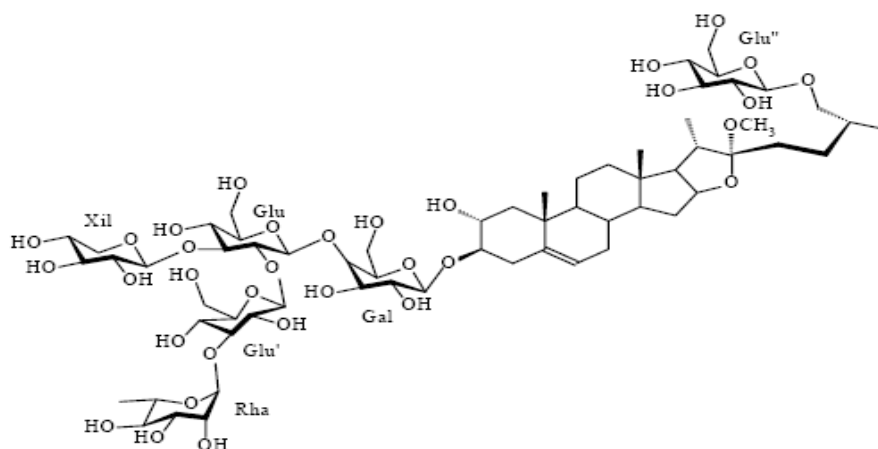
**Agabrittonósido G (15).**

3-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)(β-D-xilopiranosil-(1→3))-β-Dglucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil -26-O-β-Dglucopiranosil-22α-metoxi-25R-furost-5-eno-2α, 3β-diol.



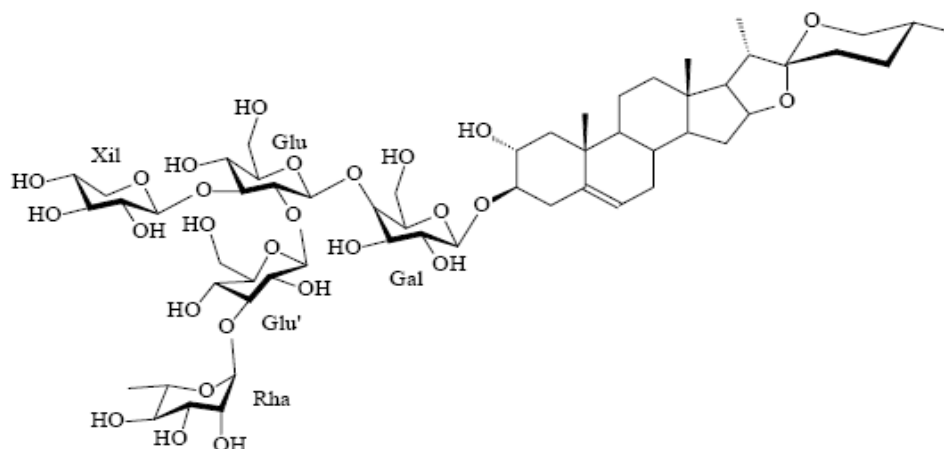
**Agabrittonósido H (16).**

3-O-((α-D-rhamnopyranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil-(1→2)) (β-Dxilopiranosil-(1→3))-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-Dgalactopiranosil-26-O-β-D-glucopiranosil-22α-metoxi-25R-furost-5-eno-2α, 3β-diol.



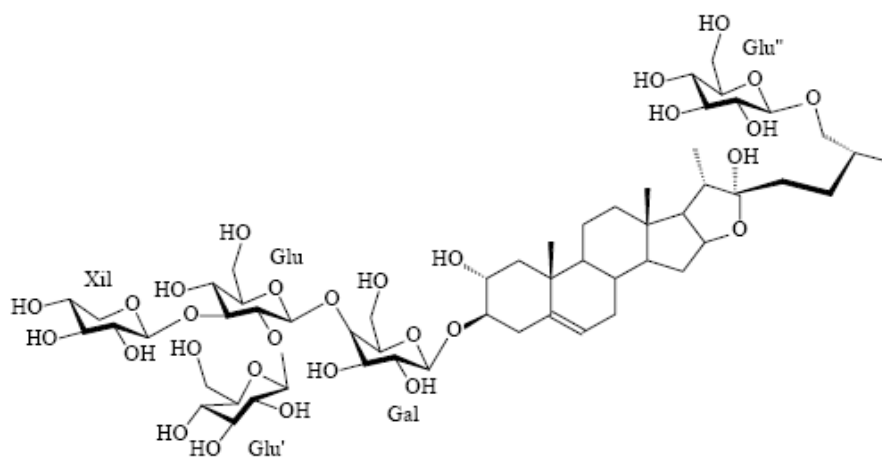
**Agabrittonósido I (17).**

3-O-(( $\alpha$ -D-rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 2)) ( $\beta$ -D-xilopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3))- $\beta$ -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosil-25R-espiros-5-en-2 $\alpha$ , 3 $\beta$ -diol



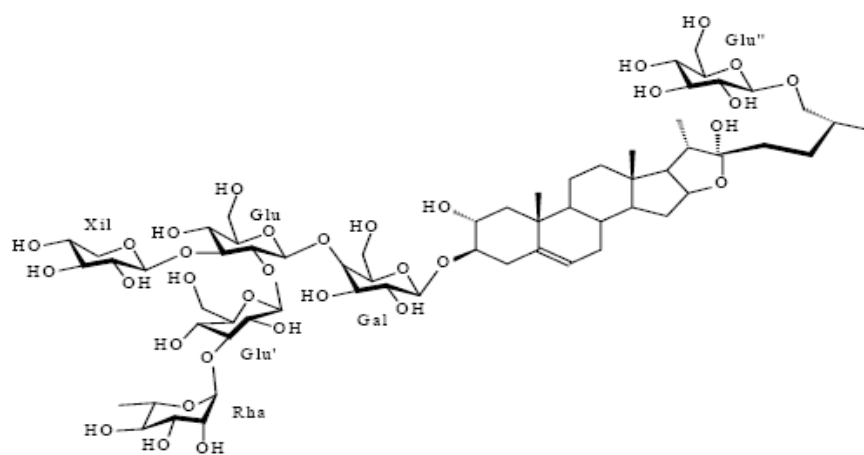
**Agabrittonósido J (18).**

3-O- $\beta$ -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 2) ( $\beta$ -D-xilopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3))- $\beta$ -Dglucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosil-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosil-25R-furost-5-en-2 $\alpha$ , 3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -triol



**Agabrittonósido K (19).**

3-O-(( $\alpha$ -D-rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 2))( $\beta$ -D-xilopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3))- $\beta$ -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Dgalactopyranosil-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosil-25R-furost-5-en-2 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 22 $\alpha$ -triol.



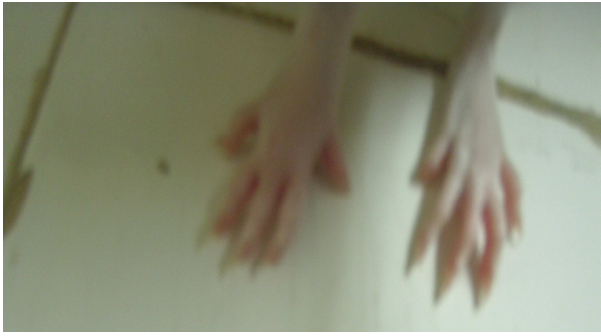
## Anexo B

### Análisis estadístico del muestreo realizado.

**Porcentajes de Inflamación en cada grupo experimental en Modelo agudo por inducción de Edema plantar por administración de carragenina. Los resultados se expresan como la MEDIA  $\pm$  DE (cm)**

| GRUPOS       |             | 1h           | 2h           | 3h           | 4h           | 5h           |
|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| SIN TTO      | Media $\pm$ | 22,37        | 36,88 $\pm$  | 42,84        | 47,40        | 43,40        |
|              | Desv. típ   | $\pm 5,4263$ | 12,6680      | $\pm 7,2714$ | $\pm 5,8405$ | $\pm 7,3495$ |
|              | (cm).       | 6            | 2            | 2            | 7            | 8            |
|              |             |              |              |              |              |              |
| INDOMETACINA | Media $\pm$ | 15,33        | 27,33        | 32,00        | 23,33        | 29,33        |
|              | Desv. típ   | $\pm 3,9327$ | $\pm 3,9327$ | $\pm 14,310$ | $\pm 13,246$ | $\pm 9,3523$ |
|              | (cm).       | 7            | 7            | 8            | 3            | 6            |
|              |             |              |              |              |              |              |
| SAPOGENINA   | Media $\pm$ | 6,61         | 34,30        | 7,89         | 7,89         | 7,89         |
|              | Desv. típ   | $\pm 4,6627$ | $\pm 15,392$ | $\pm 8,0020$ | $\pm 4,0040$ | $\pm 4,0040$ |
|              | (cm).       | 1            | 2            |              | 0            |              |
|              |             |              |              |              |              |              |
| Crudo A      | Media $\pm$ | 25,97        | 37,87        | 26,88        | 16,05        | 9,51         |
|              | Desv. típ   | $\pm 13,367$ | $\pm 12,825$ | $\pm 11,290$ | $\pm 14,138$ | $\pm 9,5318$ |
|              | (cm).       | 4            | 5            | 9            | 8            |              |
|              |             |              |              |              |              |              |
| Crudo B      | Media $\pm$ | 8,22         | 28,50        | 14,41        | 14,33        | 18,41        |
|              | Desv. típ   | $\pm 8,3372$ | $\pm 8,7607$ | $\pm 9,0721$ | $\pm 3,3021$ | $\pm 3,4153$ |
|              | (cm).       |              |              |              |              |              |
|              |             |              |              |              |              |              |

**Imágenes del muestreo realizado.**



**Fig: 1.** Inflamación tratada con extracto butanólico de la maceración (A)



**Fig: 2.** Inflamación provocada por administración de carragenina 1% en la aponeurosis plantar de rata Wistar tratada con el extracto butanólico obtenido por el Soxhlet (B).



**Fig: 3.** Inflamación tratada con saponinas.



**Fig: 4.** Inflamación sin tratamiento.



**Fig: 5.** Inflamación tratada con indometacina.