



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

Facultad de Química y Farmacia.

Departamento de Licenciatura en Química.

Extracción de saponinas a partir de la *Furcraea hexapetala* y
estudio de sus propiedades como insecticida

Autor: Ary Rodríguez Alvarez

Tutor: Dr. C. José Orestes Guerra de León

Curso 2015- 2016

Pensamiento

- *“Solo porque entiendas la mecánica de cómo funciona algo no lo hace menos milagroso. Lo que es otra palabra para magia.”*

Bill Comptom (True Blood)

Dedicatoria

A mis abuelos

A mis padres

Agradecimientos

Primeramente, debo agradecer a mi familia, en especial a mi abuela, a mi abuelo y a mi madre, que son la razón por la cual pude llegar hasta aquí, tarde, pero llegué, que es lo que cuenta.

Por otra parte, no puedo dejar de agradecer a Yennifer, gracias a él me he convertido en la persona que soy hoy, y puedo decir que hoy soy mucho mejor que ayer.

A mi tutor José Orestes, por su apoyo y dedicación, sin la cual no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A Aracelys, Sonia, Francisco y Aniwirka por todo su apoyo en el trabajo experimental.

A Liena, por las largas charlas de motivación que me tuvo que dar por teléfono.

A todas las personas que de una forma u otra me han ayudado a la elaboración y culminación de este trabajo.

Resumen

El presente trabajo se realizó en la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Facultad de Química Farmacia, con la colaboración del laboratorio de la Estación Territorial de Protección de Plantas de Yaguaramas, municipio Abreus, provincia Cienfuegos. En este, se evalúa la actividad insecticida del jugo de la planta *Furcraea hexapetala* sobre el *Cylas formicarius* a concentraciones de 100, 50, 25 y 12,5 % (v/v), donde alcanza el máximo de efectividad a las 96 horas con resultados de 88.8, 80, 65 y 65 % respectivamente. Además, se obtienen crudos de saponinas a partir de esta planta mediante procedimientos de extracción y procedimientos de precipitación, de donde se selecciona uno de estos crudos para la realización del ensayo biológico frente al mismo insecto, lográndose el máximo de efectividad a las 96 horas de comenzado el experimento, con valores de 90, 80, 70 y 65 % para concentraciones del crudo de saponinas de 1, 0.5, 0.25 y 0.125 % (m/v) respectivamente. Por otra parte, se establecen condiciones de la hidrólisis ácida de este extracto para su posterior ensayo biológico.

Abstract

The present work was carried out in the Central University Marta Abreu of Las Villas, Ability of Chemical Pharmacy, with the collaboration of the laboratory of the Territorial Station of Protection of Plants of Yaguaramas, municipality Abreus, county Cienfuegos. In this, the insecticide activity of the juice of the plant *Furcraea hexapetala* is evaluated on *Cylas formicarius* to concentrations of 100, 50, 25 and 12,5 %, (v / v) reaching the maximum of effectiveness the 96 hours with results of 88.8, 80, 65 and 65 % respectively. Also, they are obtained raw of saponins starting from this plant mediating extraction procedures and precipitation procedures, of where one of these raw ones is selected for the realization of the biological test in front of the same insect, being achieved the maximum of effectiveness at the 96 hours of having begun the experiment, with values of 90, 80, 70 and 65 % for concentrations of the raw one of saponins of 1, 0.5, 0.25 and 0.125 % (m / v) respectively. On the other hand, conditions of the sour hydrolysis of this extract settle down for their biological later test.

Índice

Índice.....	1
Introducción.....	3
1 Capítulo 1. Revisión bibliográfica.....	5
1.1 Características botánicas de la <i>Furcraea hexapetala</i>	5
1.2 Saponinas y saponinas esteroidales.....	6
1.2.1 Clasificación de las saponinas	6
1.2.2 Clasificación de las saponinas	8
1.2.3 Hidrólisis de las saponinas	10
1.3 Ensayos de reconocimiento de saponinas	10
1.4 Descripción de las propiedades biológicas de las saponinas	11
1.5 Métodos de extracción y purificación de saponinas	12
1.6 Principales saponinas aisladas de la <i>Furcraea hexapetala</i>	14
1.7 Cromatografía	15
1.7.1 Cromatografía en placa delgada	16
1.8 Insecticidas naturales a partir de extractos vegetales.....	16
1.8.1 Insecticidas naturales de uso popular.....	16
1.9 Control biológico de plagas.....	17
1.9.1 <i>Cylas formicarius</i> (Tetuán del boniato).....	17
1.9.2 Lesiones, daños y manejo integrado de la plaga	18
2 Capítulo 2. Materiales y métodos	20
2.1 Equipos, reactivos y materiales	20
2.2 Recolección y preparación del material vegetal	21
2.3 Obtención de crudos de saponinas mediante procedimientos de extracción	22
2.3.1 Procedimiento A. Método clásico de extracción de saponinas.	22
2.3.2 Procedimiento B. Extracción de saponinas a partir del jugo	23
2.3.3 Procedimiento C. Extracción de saponinas mediante el Soxhlet.....	23
2.4 Obtención de crudos de saponinas mediante procedimientos de precipitación	24
2.4.1 Procedimiento I. Desestabilización del sistema disperso mediante la adición de un electrolito.....	24
2.4.2 Procedimiento II. Desestabilización del sistema disperso mediante la variación de la temperatura.....	25
2.4.3 Procedimiento III. Precipitación de saponinas con acetona	25

2.5 Evaluación de la efectividad biológica del jugo de <i>Furcraea hexapetala</i> sobre el <i>Cylas formicarius</i> mediante ensayos "in vitro".....	26
2.6 Evaluación de la efectividad biológica del extracto butanólico obtenido por el Procedimiento A, sobre el <i>Cylas formicarius</i> mediante ensayos "in vitro"	27
2.7 Hidrólisis del extracto rico en saponinas	27
3 Capítulo 3. Análisis y discusión de los resultados	28
3.1 Recolección y preparación del material vegetal	28
3.2 Obtención de crudos de saponinas mediante métodos de extracción	28
3.2.1 Procedimiento A. Método clásico de extracción de saponina.....	28
3.2.2 Procedimiento B. Extracción de saponinas a partir del jugo	29
3.2.3 Procedimiento C. Extracción de saponinas mediante el Soxhlet.....	29
3.2.4 Selección del extracto al que se le aplica el ensayo biológico	30
3.3 Obtención de crudos de saponinas mediante procedimientos de precipitación	32
3.3.1 Procedimiento I. Desestabilización del sistema disperso mediante la adición de NaCl	33
3.3.2 Procedimiento II. Desestabilización del sistema disperso mediante la variación de la temperatura	33
3.3.3 Procedimiento III. Precipitación de saponinas con acetona	34
3.4 Evaluación de la efectividad biológica del jugo de <i>Furcraea hexapetala</i> sobre el <i>Cylas formicarius</i> mediante ensayos "in vitro"	35
3.5 Evaluación de la efectividad biológica del extracto butanólico obtenido por el Procedimiento A, sobre el <i>Cylas formicarius</i> mediante ensayos "in vitro"	37
3.6 Hidrólisis del extracto butanólico	39
Conclusiones	41
Recomendaciones.....	42
Bibliografía	43
Anexos.....	47

Introducción

Desde los orígenes de la humanidad el hombre se ha relacionado con las plantas, primero como fuente de alimentos y posteriormente, a medida que se descubrió sus propiedades, las empleó como medicamentos y materias primas, entre otros propósitos.

Por sus características geográficas, Cuba posee una flora muy exquisita y diversa, la mayor parte de la cual es utilizada por la población debido a las distintas propiedades que estas manifiestan. Dentro de esta categoría se encuentra la familia Agavaceae, constituida por más de 480 especies, estas forman parte de los afloramientos más antiguos, las cuales datan aproximadamente de hace 15 millones de años (Eguiarte, 2000, Álvarez de Zayas, 1996).

Dentro de la diversidad de especies se encuentran las pertenecientes a la *Furcraea hexapetala*, que se conoce con el nombre de “*Magüey*”, vocablo que proviene de la cultura taína. Algunos campesinos de la región central de Cuba siembran esta planta en los perímetros de varios cultivos de interés agrícola, ya que notaron que la misma posee propiedades capaces de repeler el ataque de ácaros, insectos y otras plagas (Castellanos L. ; Fernández 2011b); mientras que otros optaron por fumigar sus plantaciones con el jugo.

Estudios previos de la planta han dado a conocer que entre sus metabolitos secundarios fundamentales se encuentran en mayor proporción las saponinas esteroidales y dentro de estas, destaca la furcreastatina por estar en mayor proporción (Lic. Pérez de Armas, 2011). En la literatura aparecen numerosos reportes de actividad biológica de algunas saponinas frente a diferentes microorganismos (Lic. Pérez de Armas, 2011, Fernández Valero, 2016, Guerra de Leon, 2005, Guerra de Leon 2008, Iannacone, 2013a, Iannacone, 2013b, Sobrino Jiménez, 2016, Castellanos L. ; Fernández 2011a) , lo que permite suponer que el poder insecticida de estas plantas está directamente relacionado con su contenido de saponinas.

Para confirmar esta atribución se requiere comprobar si la actividad biológica tanto del jugo como de la mezcla de saponinas presentes en la planta es adecuada, es decir, si cumple con el valor mínimo de efectividad umbral establecido por Sanidad Vegetal (60 %) y en un segundo plano, desarrollar una metodología simple y económica para obtener un producto rico en saponinas a partir del jugo, con el propósito de implementarla a lo largo del país ya que actualmente existe un

gran interés en utilizar productos naturales de origen vegetal para la fumigación de plantaciones en lugar de sustancias sintéticas.

Por estas razones se propone como **problema científico**:

- ¿Cómo obtener productos ricos en saponinas a partir de la planta *Furcraea hexapetala* para la evaluación de su actividad insecticida frente al *Cylas formicarius*?

Hipótesis:

Mediante procedimientos de extracción y/o precipitación es posible la obtención de productos ricos en saponinas para la evaluación de su actividad insecticida.

Para dar solución a este problema científico se plantea el siguiente **Objetivo General**:

- Obtener un extracto rico en saponinas a partir de la planta *Furcraea hexapetala* para la evaluación de su actividad insecticida frente al *Cylas formicarius*.

Para alcanzar el mismo se proponen los siguientes **Objetivos Específicos**:

- Seleccionar, mediante la comparación de varios métodos extractivos, cuál es el más adecuado para la obtención de extractos ricos en saponinas.
- Ensayar procedimientos de precipitación de saponinas a partir del jugo de la planta.
- Evaluar la actividad biológica del jugo y extractos procedente de la *Furcraea hexapetala* sobre el *Cylas formicarius* mediante ensayos “*in vitro*.”

1 Capítulo 1. Revisión bibliográfica

1.1 Características botánicas de la *Furcraea hexapetala*

La familia *Agavaceae* está constituida por más de 480 especies, estas forman parte de los afloramientos más antiguos que datan aproximadamente de hace 15 millones de años; son nativas de América y se distribuyen desde Dakota del Norte (Estados Unidos), pueden encontrarse desde los Andes hasta Bolivia y Paraguay, incluyendo Centroamérica y las Antillas (Lic. Pérez de Armas, 2011, Eguiarte, 2000, Guillot Ortiz, 2010).

Dichas plantas, por tanto, forman parte de la diversa flora nativa de Cuba, a las cuales la población también les ha dado diversos usos. Ejemplo de ello son las pertenecientes a los géneros *Agave* y *Furcraea*, que se conocen con el nombre de “*Maguey*”, vocablo que proviene de la cultura taína (Guillot Ortiz, 2010).

El género *Furcraea* fue fundado por Ventenat en 1793 a partir de la segregación de dos de las especies conocidas de *Agave* de aquella época: *Agave foetida* L. (Linné, 1753) y *Agave hexapetala* Jacq. (Jacquin, 1760). La separación de *Furcraea* se basó en la existencia de un tubo perigonal brevísimo o ausente, por tanto, los segmentos del perianto casi libres, de filamentos insertos y basalmente dilatados y de un estilo engrosado en su base y trígono (Álvarez de Zayas, 1996) (Guillot Ortiz, 2010).

Tabla I. Clasificación taxonómica de la *Furcraea hexapetala*

<i>Furcraea Hexapetala</i>	
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Liliidae</i>
Orden	<i>Asparagales</i>
Familia	<i>Asparagaceae</i>
Género	<i>Furcraea</i>
Subgénero	<i>Furcraea</i>
Sección	<i>Rigidae</i>
Especie	<i>Furcraea hexapetala</i>

Según Alvarez de Zayas (1996) quien realizó una revisión de las especies cubanas de *Furcraea*; existen en Cuba tres especies: *Furcraea hexapetala* (Jacq.) que abunda en la zona occidental, desde Pinar del Río hasta la parte central del país, *Furcraea tuberosa* (Mill.) que abunda en la zona oriental y *Furcraea antillana* A., la cual se encuentra en todo el archipiélago cubano.

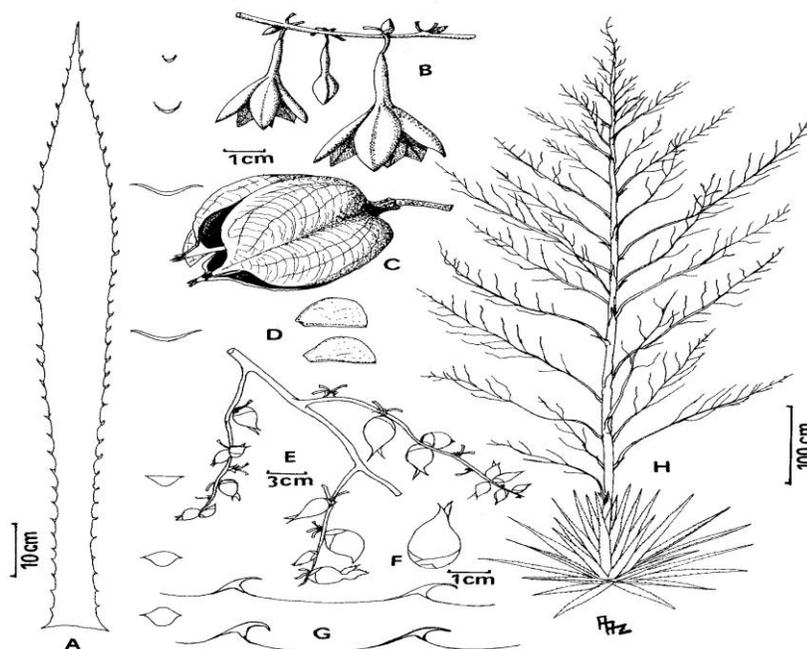


Figura 1. *Furcraea hexapetala* A. Hoja con sus secciones transversales. B. Flores. C. Frutos. D. Semillas. E. Rama con bulbilos. F. Bulbilo. G. Dientes del margen foliar. H. Planta, se muestra la arquitectura general de la inflorescencia.

1.2 Saponinas y sapogeninas esteroidales

1.2.1 Clasificación de las saponinas

Entre los principales metabolitos secundarios aislados de la familia *Agavaceae*, encontramos que las saponinas esteroidales son los más frecuentes (Arias Suárez, 2015, Guerra de Leon, 2005, Lic. Pérez de Armas, 2011, Calle, 2016).

Las saponinas son productos de defensa de los vegetales contra sus patógenos, especialmente hongos, y se encuentran sobre todo en las zonas más externas de las plantas (Mostacero, 2002).

Estas son glicósidos en los cuales varias unidades de monosacáridos se enlazan mediante enlace glicosídico a un resto denominado aglicón. El aglicón puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidal y en función de esto las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales respectivamente (Guerra de Leon, 2005, López Luengo, 2001, Marston, 1995).

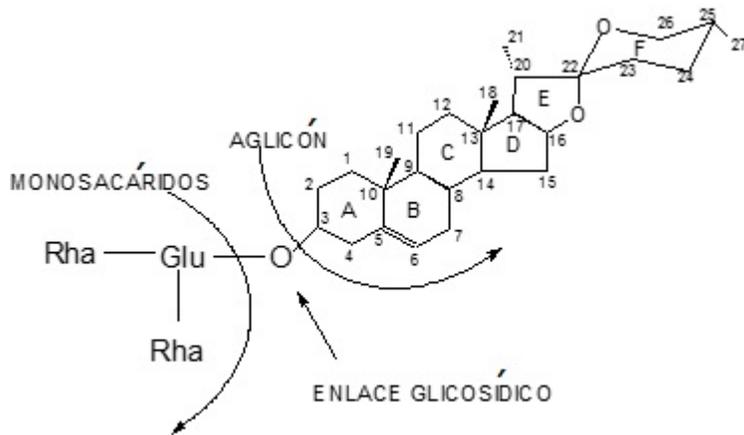


Figura2. Ejemplo de saponina esteroidal

Saponinas triterpenoides

Las saponinas triterpenoides pertenecen a un largo grupo de compuestos que contienen una configuración de cuatro a cinco anillos o 30 carbonos con varios oxígenos unidos. Los triterpenos son ensamblados a partir del isopreno (C5) a través de la vía del mevalonato citosólico para formar un compuesto de treinta carbonos. Todas las moléculas triterpénicas se derivan del dammarano y se subdividen en Pentacíclicas y Tetracíclicas. Las saponinas triterpénicas pentacíclicas son más frecuentes y pueden ser derivadas del oleano o del ursano. Las saponinas triterpénicas tetracíclicas conservan la estructura básica del dammarano, con 3 anillos de 6 carbonos y uno de 5 (Siller Juárez, 2012, Marston, 1995).

Saponinas esteroidales

Las saponinas esteroidales, en comparación con las saponinas triterpenoides están menos distribuidas en la naturaleza y se encuentran en muchas familias monocotiledóneas. Se sintetizan también por la ruta del ácido mevalónico. Este tipo de saponinas se subdividen en dos grupos principales: los derivados del estrostanol y los derivados del furostanol (Marston, 1995, López Luengo, 2001).

Los derivados del estirostano son estructuras hexacíclicas de 27 carbonos que derivan del ciclopanoperhidrofenantreno con dos ciclos de 5 y 6 miembros y una cadena lateral en la posición 17 (Madland, 2013).

Los derivados del furostano poseen un ciclo menos que el estirostano, pero también tienen un esqueleto de 27 carbonos; es decir, son aquellas saponinas en donde el anillo F está abierto y se consideran precursores biosintéticos de las saponinas derivadas del estirostano (Siller Juárez, 2012).

1.2.2 Clasificación de las sapogeninas

Las sapogeninas (aglicón) constituyen la porción lipofílica o no azucarada de la saponina obtenida por hidrólisis y pueden ser de naturaleza triterpénica o esteroidea (Rojas Crisanch, 2010).

Las sapogeninas esteroidales poseen el esqueleto base tetracíclico característico de los esteroides, con la particularidad de que la cadena lateral que se origina a partir de C-17; puede adoptar varias configuraciones (Agrawal 1985, Lic. Santos Morell, 2004) y en función de estas se clasifican en:

Sapogeninas estirostánicas: la cadena lateral forma dos anillos adicionales (E y F) que están contenidos en planos perpendiculares entre sí. En estas el átomo de carbono común a los dos nuevos anillos está unido a dos átomos de oxígeno (estructura cetálica) por lo que a esta “cadena” lateral se le ha dado el nombre de cadena estirocetálica (Guerra de Leon, 2005).

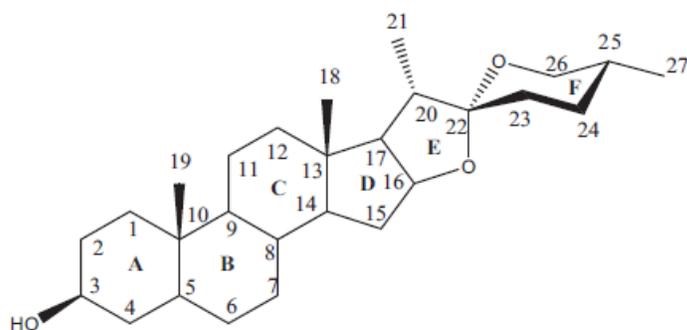


Figura 3. Ejemplo de saponina estirostánica

- **Sapogeninas furostánicas:** similares a las esteroideas pero con el anillo F abierto.

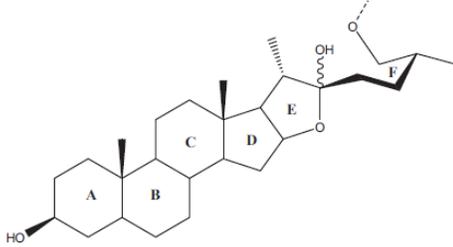


Figura 4. Ejemplo de saponina furostánica

- **Sapogeninas furoesteroideas:** los anillos E y F tienen cinco miembros cada uno.

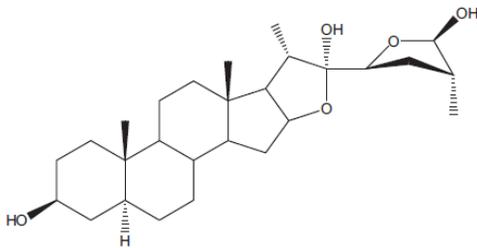


Figura 5. Ejemplo de saponina furoesteroidea

Son rasgos estructurales comunes de estos compuestos, poseer los metilos 18 y 19, dirigidos hacia la cara β de la molécula y fusión “cis” entre los anillos B-C y C-D (Marston, 1995).

Los anillos A y B se pueden unir de forma “trans” o “cis” y en función de esto las sapogeninas pertenecen a la serie 5α (serie del colestano) y 5β (serie del coprostano) respectivamente. También es frecuente encontrar una insaturación entre los carbonos 5 y 6, en estos casos los compuestos pertenecen a la serie Δ^5 (Lic. Santos Morell, 2004).

Depende de la cantidad de uniones a restos de azúcares que presenta el aglicón que las saponinas puedan ser clasificadas como monodesmosídicas, bidesmosídicas o tridesmosídicas (del griego *desmos* = cadena). Estas cadenas de azúcares pueden estar formadas por la combinación de monosacáridos como glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, ácidos urónicos y en raros casos apiosa (Marston, 1995).

1.2.3 Hidrólisis de las saponinas

La hidrólisis de saponinas es un tipo de reacción que a nivel de laboratorio se puede realizar tanto en medio ácido como enzimático. A través de esta se obtienen carbohidratos y un aglicón llamada genéricamente sapogenina, la cual puede tener un esqueleto esteroideal de tipo colano como la esmilagenina (a); de terpeno tipo β -amirina como la chichipegenina (b); tipo α -amirina como el ácido asiático (c); tipo lupeol como la estallogenina (d) o tetracíclico como el panaxadiol (e), con la excepción de la criptogenina (f)(Guerra de Leon, 2005) (Fernandez Valverde, 1996).

1.3 Ensayos de reconocimiento de saponinas

Las saponinas esteroidales se pueden reconocer fácilmente en los análisis fitoquímicos preliminares mediante los ensayos de la espuma, hemólisis de glóbulos rojos, Liebermann-Burchard y ensayos para carbohidratos (Marston, 1995, DENG-JYE, 2003).

Ensayo de la Espuma

Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Puesto que existen otras sustancias que pueden formar también espuma, se debe asumir este ensayo como una prueba presuntiva de la presencia de saponinas esteroidales (Fernandez Valverde, 1996) (Böttcher, 2015, Park, 2005).

Ensayo de Hemólisis

Este ensayo es más confiable que el de la espuma. A una suspensión de glóbulos rojos en solución salina diluida, se añade una solución de la muestra que se presume que es o que contiene saponinas. Si los glóbulos rojos se rompen (lisan o hemolizan), se asume que la prueba es positiva. Este ensayo puede realizarse en tubo de ensayo, en cápsulas Petri con agar-sangre o en cápsulas Petri con gelatina-sangre. Cuando la muestra contiene taninos, deben eliminarse antes de realizar la prueba ya que estos interfieren (Fernandez Valverde, 1996, Guerra de Leon, 2005).

Este ensayo, junto con el de la espuma, cuando ambos resultan positivos en una muestra vegetal (extracto, fracción o sustancia pura) permiten establecer que la muestra es o contiene saponinas. La sola prueba de espuma positiva no es concluyente para determinar la presencia de saponinas.

Además, hay sustancias que interfieren estas dos pruebas como son los taninos. Si la muestra contiene taninos, estos pueden eliminarse pues se absorben en MgO (Marston, 1995).

Ensayo de Liebermann-Burchard

Por la porción esteroideal que poseen las saponinas esteroidales, este ensayo puede confirmar su presencia, por ejemplo en muestras y extractos vegetales, tal como se indicó anteriormente para los esteroides, pero debe tenerse en cuenta que al igual que en el caso de los esteroides y los esteroides en general solamente dan un resultado positivo los que tengan grupos dienos conjugados reales o potenciales. Sin embargo, otras saponinas como las triterpenoides también dan positiva la prueba (Marston, 1995).

Ensayos para carbohidratos

La presencia de carbohidratos ligados puede reconocerse fácilmente mediante ensayos como el de Molisch, el de la Antrona, etc., o mediante análisis por cromatografía en papel, donde se utilizan patrones de carbohidratos como referencia.

1.4 Descripción de las propiedades biológicas de las saponinas

La aplicación biológica de las saponinas está basada en sus propiedades de disrupción de membrana, y en la formación de micelas con esteroides y ácidos biliares. Se cree que forman los principales constituyentes de una gran variedad de plantas medicinales y medicina popular y son consideradas responsables de numerosas propiedades farmacológicas. (Por ejemplo; la raíz ginseng (*Panax ginseng*), una de los más importantes productos orientales usados en todo el mundo, tiene saponinas como el mayor componente bioactivo) (Lic. Pérez de Armas, 2011).

Los estudios sobre las propiedades biológicas de las saponinas se han incrementado 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 forma 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).

Aunque algunas saponinas esteroidales han mostrado diversas actividades biológicas (Castellanos L. ; Fernández 2011a), antimicrobiana, citotóxica (Hu, 1999), antitumoral (Moraga Rubio, 2011), ictiotóxica, molusquicida, insecticida (Lic. Fernández Valero, 2009, Sobrino Jiménez, 2016), antihelmíntica (Soto Vásquez, 2014), expectorante, diurética, cardiovascular, antiinflamatoria (Segundo Armas T. ; Norma Ramos C.; Ana Calderón, T., 2002, Soto Vásquez, 2014), anti-úlceras, espermicida, analgésica, antipirética, sedante, antifertilidad, antihepatotóxica, hemolítica (Hu, 1999), antimicótica, etc.) fundamentalmente se han constituido desde hace bastante tiempo, como precursores únicos de muchos medicamentos esteroidales tales como hormonas sexuales, corticoides, contraceptivos orales y diuréticos (Martínez Martínez, 2001).

La habilidad de estas sustancias de hinchar y romper eritrocitos lo cual ocasiona que la hemoglobina se libere (actividad *in vitro*), ha sido una de las propiedades más estudiadas de las saponinas. Sin embargo, a pesar de que esta actividad ha sido relacionada con la estructura de la saponina, no existe una aparente semejanza de características entre miembros pertenecientes a este mismo grupo (Siller Juárez, 2012).

La toxicidad de las saponinas contra los insectos, gusanos parásitos, moluscos y peces, así como sus propiedades antifúngicas, antivirales y antibacterianas han sido muy bien documentadas (Siller Juárez, 2012), (Guerra de Leon, 2005) (Lic. Pérez de Armas, 2011) así como su actividad fungicida, antimicrobiana y aleopática (Mastrogiovanni, 2012).

1.5 Métodos de extracción y purificación de saponinas

Las saponinas son compuestos polares, anfifílicos, de peso molecular relativamente elevado, que aparecen como mezclas heterogéneas en el vegetal, lo que hace que su aislamiento y elucidación estructural sean en general muy complejos. Es por eso, que el estudio de la química y las propiedades biológicas de estos compuestos han tenido un mayor desarrollo recientemente, junto con la evolución de las técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

Los métodos tradicionales de purificación de saponinas tales como cromatografía en columna y partición con solventes orgánicos, no son capaces de obtener saponinas puras. El aislamiento de saponinas requiere de una o más técnicas cromatográficas para separarlas de otros compuestos polares que puedan obtenerse en extractos acuosos o alcohólicos (Mastrogiovanni, 2012).

En la literatura se encuentra una gran cantidad de trabajos en los que se reporta la extracción de saponinas (Arias Suárez, 2015, Bonifaz Paredes, 2010, DENG-JYE, 2003, Peña Cerda, 2011). Para obtenerlas de las plantas o animales, el material seco y molido se desengrasa previamente con un solvente apolar (generalmente éter de petróleo o n-hexano). El material vegetal desengrasado se extrae con etanol, metanol, n-butanol, o mezclas de diferentes proporciones de estos alcoholes y agua. El extracto acuoso (libre de alcohol) se liofiliza o se concentra en rotovaporador, y se hace pasar por resinas de intercambio iónico a fin de eliminar sustancias iónicas. Una vez obtenidas las saponinas crudas, se pueden purificar por cromatografía en columna o líquida de alta eficiencia. En el caso de la cromatografía en columna, se puede utilizar sílica gel y eluentes como mezclas de Cloroformo-Metanol-Agua (Martínez Martínez, 2001, Jaramillo)

La extracción de saponinas se puede llevar a cabo por métodos como: soxhlet, microondas, ultrasonido,) y destilación. Para escoger el método se tiene en cuenta las siguientes variables: eficiencia de extracción, factores tecnológicos, ambientales y económicos (De Combarieu, 2003, DENG-JYE, 2003, Flores, 2013, Jaramillo, Jian- Ming, 2004, Peña Cerda, 2011).

La extracción soxhlet es un método cíclico en el que se usa un equipo de tres piezas (balón, cámara extractora y condensador) que se utiliza para extraer compuestos contenidos en materiales sólidos. El compuesto se diluye en el solvente por la afinidad polar que hay entre ambos, produciéndose una solución del compuesto en el disolvente , el cual se concentrará a medida que el ciclo se repita (Pérez Ochoa, 2009).

El método de extracción asistido por ultrasonido (EAU) proporciona una alta eficiencia de contacto en la muestra entre la matriz y el disolvente. Un efecto de cavitación sónica se produce bajo la irradiación del ultrasonido donde se forman microburbujas cuando la presión negativa es suficientemente elevada. Una vez creadas, estas burbujas crecen y se comprimen cuando las presiones son negativas y positivas respectivamente, la constante expansión y compresión genera el colapso de las burbujas en donde se rompen las paredes celulares y facilitan la penetración de solventes en estas, se aumenta la temperatura disminuyendo la viscosidad y estos factores hacen que el fenómeno de transferencia de masa sea mejor (Pérez Ochoa, 2009).

1.6 Principales saponinas aisladas de la *Furcraea hexapetala*

En la bibliografía revisada (Lic. Pérez de Armas, 2011, Calle, 2016) se encuentra que de entre los principales metabolitos secundarios aislados de la *Furcraea hexapetala*, las saponinas esteroidales son las más frecuentes. Dentro de estas se destacan como productos mayoritarios seis saponinas en específico, las cuales han sido extraídas según el siguiente esquema:

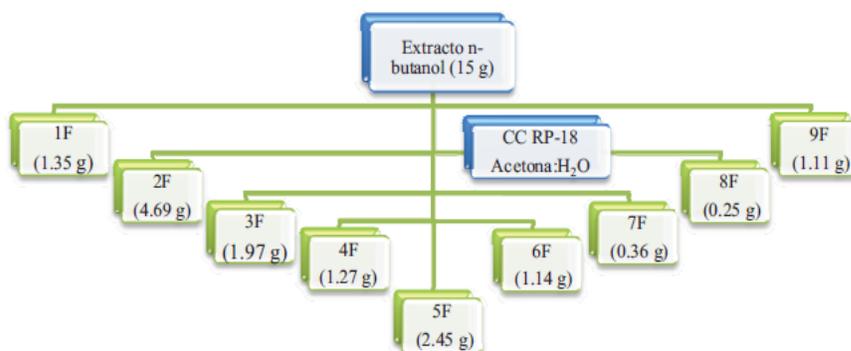
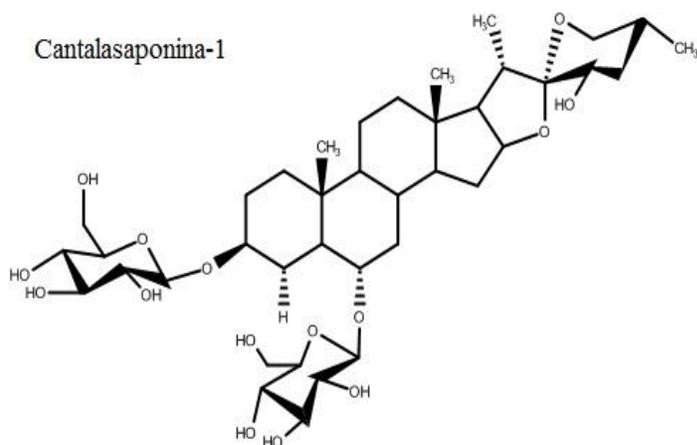
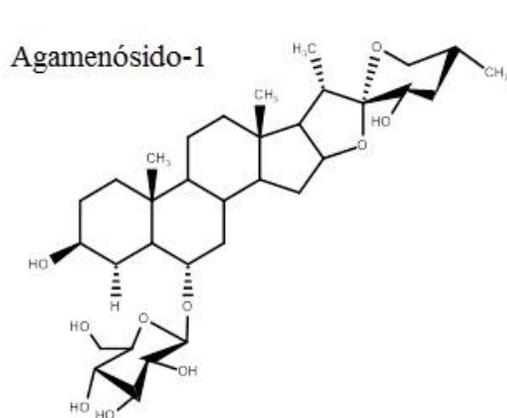
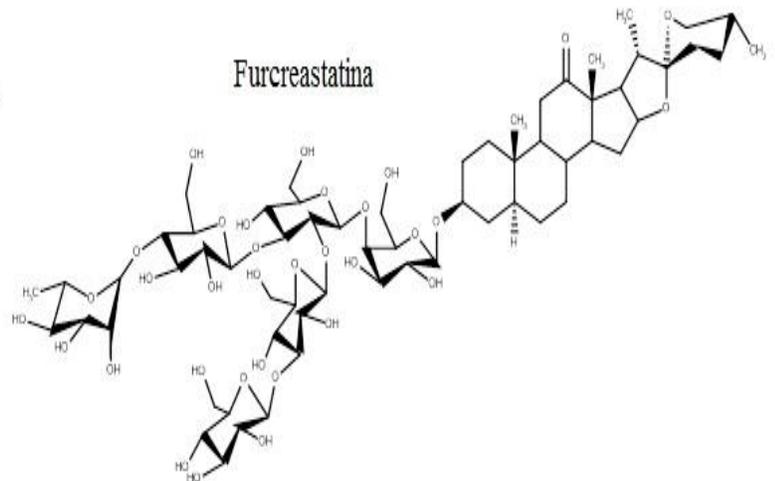
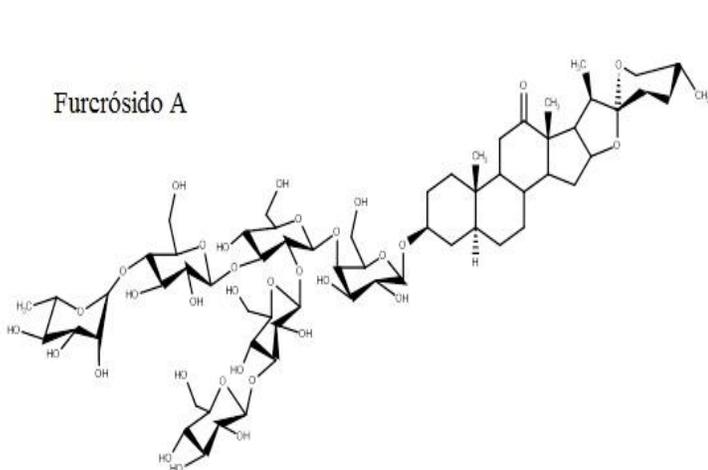
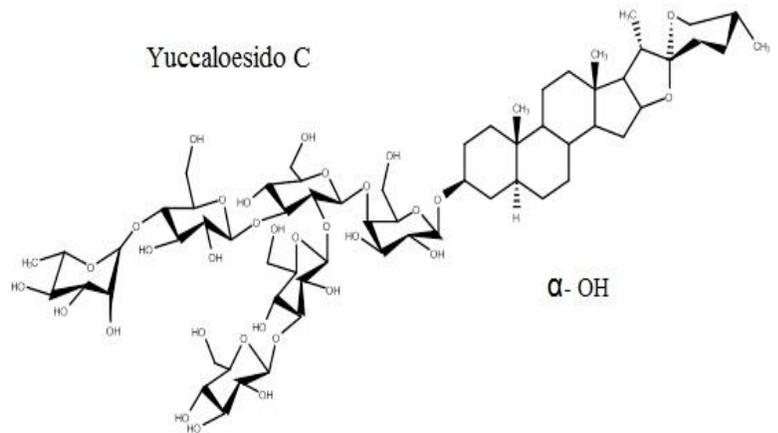
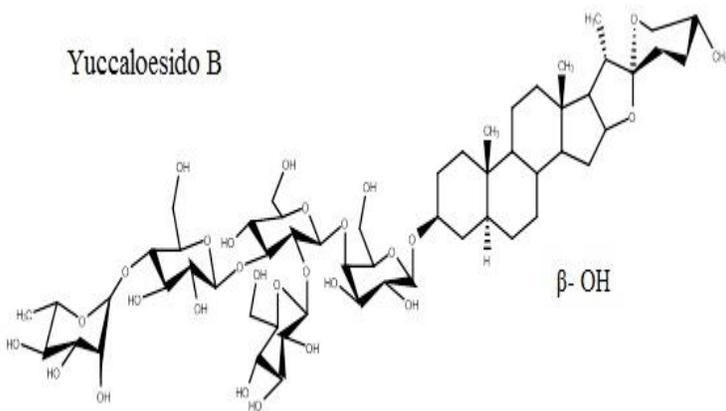


Figura 6. Esquema del fraccionamiento del crudo de saponinas de las hojas de *Furcraea hexapetala*

A continuación, se muestran las estructuras de las principales saponinas aisladas de esta planta (Lic. Pérez de Armas, 2011, Calle, 2016):





1.7 Cromatografía

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra es distribuida entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenida por la fase estacionaria (Lic. Santos Morell, 2004).

La separación se lleva a efecto en una columna tubular rellena de sólido poroso finamente dividido, el cual puede actuar como fase estacionaria propiamente dicha o como soporte de una fase estacionaria líquida. También se puede efectuar mediante la utilización como fase estacionaria de papel de filtro o un sólido finamente dividido colocado en forma de capa fina sobre una placa de vidrio (Fernandez Valverde, 1996).

Esos tres tipos de cromatografía se basan en los mismos principios fundamentales, y se conocen respectivamente como cromatografía en columna, de papel y de capa fina.

1.7.1 Cromatografía en placa delgada

Esta técnica emplea usualmente una base sólida en la cual se adhiere la fase estacionaria que puede ser: sílica gel, alúmina o Kieselguhr, por mencionar algunos. La selección del disolvente, que será la fase móvil, depende de la polaridad de la sustancia en estudio, para la cual debe de llevarse a cabo una serie de pruebas con varios disolventes o mezclas de ellos hasta obtener un desplazamiento adecuado (Zedan Z. Ibraheim, 2003). Las placas cromatográficas se introducen en una cámara previamente saturada de los disolventes seleccionados como sistema móvil (Fernandez Valverde, 1996).

1.8 Insecticidas naturales a partir de extractos vegetales

A partir de la necesidad por encontrar una nueva alternativa natural para el control de insectos plagas y para remplazar los pesticidas sintéticos, aparecen los insecticidas botánicos que ofrecen seguridad para el medio ambiente y una eficiente opción agronómica.

Muchas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas con importancia contra insectos y plagas. La selección de plantas que contengan metabolitos secundarios capaces de ser utilizados como insecticidas naturales deben ser de fácil cultivo y con principios activos potentes, con alta estabilidad química y de óptima producción (Bonifaz Paredes, 2010).

1.8.1 Insecticidas naturales de uso popular

La búsqueda de métodos para la protección natural de cultivos sigue vigente a pesar de que el mercado ofrece una variedad de productos muy amplia. La naturaleza nos proporciona medios para la protección de cultivos que merecen nuestra atención. Estos se originan en la naturaleza intrínseca de las especies y que surgen de su lucha por la supervivencia. La protección natural de cultivos reduce el riesgo de la resistencia en los insectos, tiene menos consecuencias letales para los enemigos naturales, reduce la aparición de plagas secundarias, es menos nocivo para el hombre y no ocasiona daños al Medio Ambiente.

Como alternativa, los productos naturales provienen de una gran variedad de plantas, estos inhiben, repelen, disuaden o eliminan insectos plagas de distinto tipo, también estimulan procesos vitales de los cultivos para fortalecerlos y así protegerse de los ataques de las distintas pestes.

1.9 Control biológico de plagas

Las plagas y pestes son el conjunto de anormalidades que ocurren durante el crecimiento y funcionamiento del cultivo causadas por agentes bióticos y abióticos. Esta definición incluye además de insectos, a las enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y aquellas causadas por factores como deficiencias nutricionales, salinidad y granizos (Bonifaz Paredes, 2010).

El control de plagas con productos químicos es cada vez más complicado. La exigencia por los consumidores en la reducción de la aplicación de estos productos es cada vez más notable. Los productos agroquímicos no siempre dan buenos resultados, por lo que, se presta hoy día mucha importancia a una agricultura más biológica, se debe reducir la aplicación de pesticidas durante un tiempo determinado y estar el agricultor obligado a aceptar la no venta de sus productos hasta alcanzar una producción controlada biológicamente (Jiménez Jiménez, 2007).

En el control de plagas se trabaja de diferente forma, se recomienda dejar de curar contra plagas y actuar de forma preventiva (Jiménez Jiménez, 2007). El control biológico es el empleo de otros insectos depredadores para combatir las plagas, de forma que, así se evita o reduce el empleo de plaguicidas que dejan residuos tóxicos en los frutos y plantas y son puros venenos para la salud humana.

1.9.1 *Cylas formicarius* (Tetuán del boniato)

El *Cylas formicarius* es la principal plaga que afecta el cultivo del boniato *Ipomoea batatas* Lin. en Cuba y muchos otros países del mundo (González García).

La hembra realiza la oviposición sobre los tubérculos, lo cual consiste primeramente en excavar, con su aparato bucal, un pequeño orificio en la superficie del mismo, depositar el huevo y después sellar con una sustancia especial que ella segrega. El ciclo de vida en Cuba demora de 35 a 41 días bajo las condiciones climáticas imperantes de abril a mayo, durante el cual pasan a través de las fases de huevo (6- 7 días), larva (19-23 días) con tres estadios y pupa (7-8 días), para el endurecimiento del cuerpo del adulto tarda tres días.

Tabla II. Clasificación científica del *Cylas formicarius* (Tetuán del boniato) (González García)

	<i>Cylas formicarius</i>
Nombre científico	<i>Cylas formicarius</i> var. <i>Elegantulus</i> (Sum)
Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Arthropoda</i>
Clase	<i>Insecta</i>
Orden	<i>Coleoptera</i>
Familia	<i>Curculionidae</i>

1.9.2 Lesiones, daños y manejo integrado de la plaga

El Tetuán adulto se alimenta de cualquier parte de la planta (hojas, peciolos, tallos y raíces tuberosas) sin causar daño económico. El daño importante es causado por las larvas que perforan los tallos y las raíces tuberosas, que se vuelven inservibles hasta para la alimentación animal. La larva induce la formación de furano-terpenoides y cumarinas que dan un sabor amargo, muy desagradable, a la raíz tuberosa. Los tallos infectados cerca del cuello de la raíz se hipertrofian, lo cual interrumpe el flujo de savia (González García, Jiménez Jiménez, 2007).

Actualmente para el control de esta plaga no se recomienda el uso de productos químicos, se recomienda un manejo integral de la plaga a través de la combinación de métodos agrotécnicos y biológicos.

Semilla: Usar semilla procedente de campos sanos, preferiblemente de bancos de semilla.

Desinfección de semilla: Los esquejes se sumergen durante 2 – 3 minutos en una solución de hongo ("Beauveria Bassiana" o *Metarhizium anisopliae*), al 5% (5 kg en 100 L de agua), la que debe estar en agitación constante.

Colindancia entre campos de boniato: Se pueden sembrar dos campos cercanos cuando la diferencia de edad no sea mayor de 30 días. Si esa diferencia es mayor, deberá establecerse la distancia mínima de 1000 metros.

Rotación de cultivos: Debe establecerse como mínimo un año entre dos plantaciones de boniato en la misma área, si las condiciones lo permitieran, lo ideal serían dos años.

Uso del riego: Elimina las grietas y por ende la penetración del insecto.

Cosecha oportuna: Se ha establecido como criterio de cosecha (un máximo de 3% de daños para proceder a la misma y no permitir postergación alguna una vez alcanzado este índice.

Destrucción de residuos de cosecha: Un kilogramo de restos infestados puede proporcionar 2500 insectos entre hembras y machos.

Medios Biológicos. Los principales entomopatógenos que se utilizan para controlar la plaga son: *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Se realizan aplicaciones a toda el área a partir de los 15 días de la plantación y posteriormente 3 más con una frecuencia de 10 días. Si las condiciones de humedad son favorables, el hongo debe quedar establecido. La dosis será de 1 kg/ha.

Trampas de feromonas: Finalmente, la dilución del hongo se aplica en lugar de insecticidas, para controlar los adultos machos atraídos en las trampas de feromonas.

Utilización de hormigas predadoras: *Pheidole megacephala* conocida como Hormiga leona y *Tetramorium guineense* (hormigas del plátano). Se deben hacer introducciones de hormigas en los entornos de los campos, en lugares húmedos y sombreados.

2 Capítulo 2. Materiales y métodos

En este capítulo se presenta el material utilizado y los procedimientos aplicados para la obtención de crudos de saponinas, así como la metodología empleada en la realización de los ensayos biológicos sobre el *Cylas formicarius*. Basándose en la bibliografía revisada (Arias Suárez, 2015, DENG-JYE, 2003, Flores, 2013, Guerra de Leon, 2005, Guerra de Leon 2008, Lic. Pérez de Armas, 2011, Madland, 2013, Marston, 1995, Mastrogiovanni, 2012, Pérez Ochoa, 2009, Siller Juárez, 2012), y en las características de la planta, se presenta un esquema de la trayectoria seguida en la obtención de crudos de saponinas:

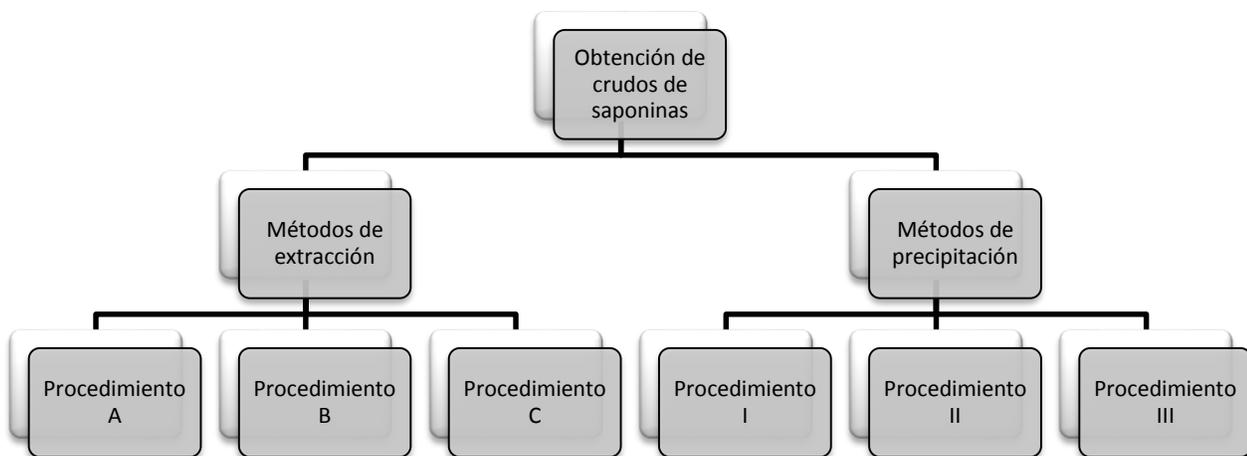


Figura 7. Diagrama de flujo para la obtención de crudos de saponinas

2.1 Equipos, reactivos y materiales

Equipos y utensilios

Estufa P Selecta®

Molino KMf 10 basic. IKA® WERKE

Rotoevaporador de marca IKA RV10 basic

Balanza técnica

Plancha de calentamiento

Embudo separador

Tubos de ensayo

Papel de filtro

Solventes y reactivos*

Éter de petróleo 90- 120°C

n-hexano

Cloroformo

Acetato de etilo

Metanol

Etanol

Butan-1-ol saturado en agua

Ácido sulfúrico

*Los principales reactivos utilizados son puros para análisis y de la firma Panreac.

Materiales.

Placas cromatográficas (soporte de vidrio). Silicagel G-60 (0,25 mm) F₂₅₄ (fase normal)

2.2 Recolección y preparación del material vegetal

El material vegetal fue colectado por la agrónoma MSc. Anjurka Fernández Valero en áreas de la comunidad Babiney, en el municipio de Abreus, en la provincia Cienfuegos. Un ejemplar de esta especie fue clasificado por el botánico Alfredo Noa y depositada en el herbario Dr. Alberto Alonso Triana de la UCLV Marta Abreu de LasVillas con el código 1040ULV.

Las hojas de *Furcraea hexapetala* fueron seleccionadas de plantas adultas de 2 m de altura, que poseían hojas de aproximadamente entre 1.0 y 1.20 m de longitud y 10 cm en la parte más ancha, las cuales se encontraban sobre un tallo de 50 cm de altura y 15 cm de diámetro.

Para su posterior análisis fueron despojadas de una película de cera que las protege y el material resultante se cortó en lascas finas y se colocaron en una estufa para su secado, a una temperatura de 40 °C hasta obtener un peso constante. Finalmente se muele el material mecánicamente hasta obtener un polvo fino.

2.3 Obtención de crudos de saponinas mediante procedimientos de extracción

Para la obtención de extractos enriquecidos en saponinas se evaluaron varios procedimientos con el fin de compararlos en cuanto a rendimiento y composición; en dos de ellos, Procedimiento A y Procedimiento C, se utiliza como materia prima el material vegetal seco y finamente dividido; mientras que en un tercero, Procedimiento B, se parte directamente del jugo.

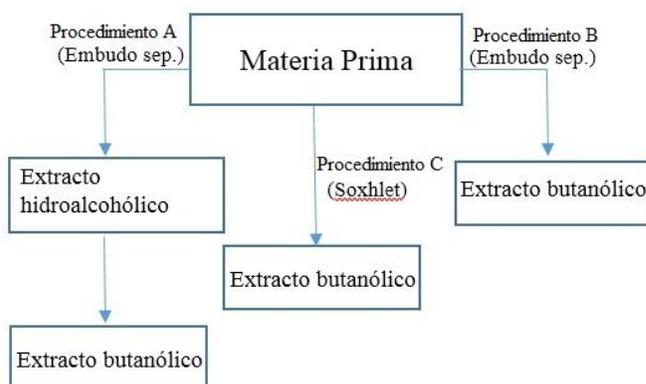


Figura 8. Procedimientos de obtención del extracto butanólico mediante procedimientos de extracción

2.3.1 Procedimiento A. Método clásico de extracción de saponinas.

El material vegetal seco finamente dividido se macera en solución de etanol/agua (7:3 v/v) durante 72 horas, operación que se repite 2 veces más (López de Ruiz, 2003). Los extractos hidroalcohólicos son unidos y concentrados a presión reducida hasta sequedad.

Del sólido obtenido se suspenden en agua 10 g y se extrae tres veces en un embudo separador con n-butanol saturado en agua. Los extractos butanólicos son unidos y rotoevaporados hasta sequedad.

Del producto final se determina el rendimiento de la extracción en base al material vegetal seco:

$$\% \text{ extracción} = \frac{\text{ext buOH} * 100}{MV}$$

Donde

% extracción: rendimiento de la extracción con n-butanol

ext buOH: gramos de extracto butanólico obtenido después de rotovaporar

MV: gramos de material vegetal inicial

2.3.2 Procedimiento B. Extracción de saponinas a partir del jugo

A partir del material vegetal (hojas de *Furcraea hexapetala*) se obtiene el jugo por medio de un trapiche.



Figura 9. Obtención del jugo en el trapiche

Del jugo obtenido, se toman 125 mL y se extrae tres veces en un embudo separador con n-butanol saturado en agua. Los extractos butanólicos son unidos y rotoevaporados hasta sequedad.

Del producto final se determina el rendimiento de la extracción:

$$\% \text{ extracción} = \frac{\text{ext buOH} * 100}{ST}$$

Donde

ext buOH: gramos de extracto butanólico obtenido después de rotovaporar

ST: gramos de sólidos totales contenidos en los mililitros de jugo inicial

2.3.3 Procedimiento C. Extracción de saponinas mediante el Soxhlet

Del material vegetal seco finamente dividido, se toman 10 g y se extraen mediante la utilización de un extractor tipo Soxhlet durante 4 horas con cada uno de los siguientes solventes: éter de petróleo, cloroformo y n-butanol saturado en agua.

El extracto butanólico se concentra a presión reducida hasta sequedad.

Del producto final se determina el rendimiento de la extracción:

$$\% \text{ extracción} = \frac{\text{ext buOH} * 100}{MV}$$

Donde

ext buOH: gramos de extracto butanólico obtenido después de rotovaporar

MV: gramos de material vegetal inicial

2.4 Obtención de crudos de saponinas mediante procedimientos de precipitación

Para la obtención de un producto rico en saponinas se parte del jugo de la planta como materia prima, el cual constituye un sistema disperso catalogado como sol lióforo. Con el objetivo de encontrar diferentes vías para obtener las saponinas, se ensayan varios procedimientos de desestabilización de este sistema.

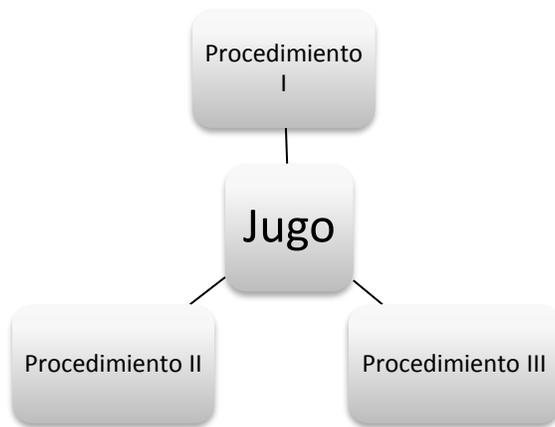


Figura 10. Procedimientos de obtención del extracto butanólico mediante procedimientos de precipitación

2.4.1 Procedimiento I. Desestabilización del sistema disperso mediante la adición de un electrolito

Se preparan 6 tubos de ensayos con igual cantidad de jugo (12,5 mL) y se adiciona a cada uno NaCl, se agita y se deja reposar a temperatura ambiente durante 7 días; a continuación, se presenta el esquema del procedimiento.

Tabla III. Esquema de adición de NaCl al jugo

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Gramos añadidos (g)	0.625	1.25	1.875	2.5	3.125	3.75
Concentración de NaCl (mol/L)*	0.855	1.71	2.56	3.42	4.27	5.13

* Para el cálculo de la concentración se asume que el jugo contiene 100% de agua

2.4.2 Procedimiento II. Desestabilización del sistema disperso mediante la variación de la temperatura

En la realización de este experimento se preparan cuatro muestras con igual cantidad de jugo (30 mL), se toma una como testigo y las demás se someten a $T = 40, 60$ y 80°C respectivamente, se observa cada media hora y se anotan los cambios ocurridos hasta completar un total de 4 horas de calentamiento.

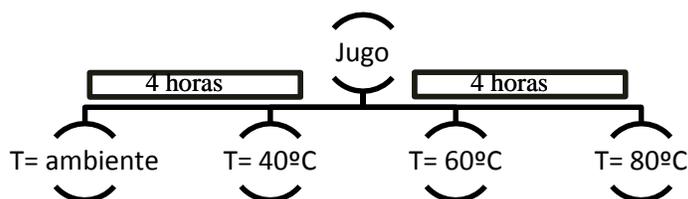


Figura 11. Esquema del procedimiento de variación de la temperatura

Posteriormente se deja reposar en frío ($T \approx 4^{\circ}\text{C}$) y se observan los cambios que puedan ocurrir.

2.4.3 Procedimiento III. Precipitación de saponinas con acetona

En cinco tubos de ensayos se preparan las siguientes proporciones acetona/jugo y se deja reposar en frío aproximadamente una semana hasta que la precipitación sea lo más completa posible.

El jugo a utilizar es filtrado previamente con el objetivo de eliminar los pequeños residuos producto de la molienda de la planta.



Figura 12. Esquema de precipitación de saponinas a partir del jugo filtrado

2.5 Evaluación de la efectividad biológica del jugo de *Furcraea hexapetala* sobre el *Cylas formicarius* mediante ensayos "in vitro"

El experimento se realiza en la Estación Territorial de Protección de plantas Yaguaramas del municipio Abreus, provincia de Cienfuegos, donde se evalúa por contacto la eficacia técnica del extracto butanólico que se obtuvo mediante la Variante A sobre el *Cylas formicarius* (Tetuán del boniato).

El Tetuán se obtiene de un campo de boniato de 35 días de plantado en la Cooperativa de Producción Agropecuaria 28 de enero de la Empresa Agropecuaria Horquita, Municipio Abreus, donde no se habían realizado tratamientos químicos ni biológicos. Estos se mantienen en el laboratorio de la Estación de Protección de Plantas Yaguaramas donde son criados según la metodología establecida (González García).

El jugo vegetal se obtuvo en un trapiche empleado para extraer el jugo de caña de azúcar. El producto obtenido se filtró con gasa y a partir de este se prepararon diferentes concentraciones al 12,5, 25, 50, y 100 % (v/v), donde coincide la primera con la concentración empleada por los agricultores de la zona.

Para la evaluación de la efectividad biológica, se montan cinco placas Petri con 20 insectos cada una, en cuatro de ellas se aplican los preparados del jugo al 100, 50, 25 y 12,5 % (v/v) y en la quinta se aplica solamente agua destilada para que cumpla una función de testigo. En cada ensayo se emplearon cuatro placas por variante, las cuales constituyeron las réplicas.

Las aspersiones se realizan con un aspersor manual sobre los insectos en las placas Petri, los cuales se mantienen sin comida aproximadamente media hora antes del experimento, seguidamente de recibir la dosis del extracto se les permite la alimentación.

Transcurridas las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas posteriores al tratamiento se evalúan los niveles poblacionales de la plaga. Se determina la eficacia técnica de cada tratamiento mediante la utilización de la fórmula de Abbott modificada (Ciba Geygi, 1981).

$$\% \text{ Efectividad} = \left(\frac{A - B}{A} \right) * 100$$

Donde

A: Número de individuos vivos en el testigo

B: Número de individuos vivos en el tratamiento

2.6 Evaluación de la efectividad biológica del extracto butanólico obtenido por el Procedimiento A, sobre el *Cylas formicarius* mediante ensayos "in vitro"

El ensayo se realiza bajo las mismas condiciones descritas en el epígrafe anterior, solo se modifica la preparación del material con que se realiza la aspersión, que en este caso es el extracto butanólico obtenido mediante el Procedimiento A.

A partir del extracto butanólico se preparan diferentes concentraciones al 0.125%, 0.25%, 0.50%, y 1% (masa de extracto/volumen de agua) y se procede de igual forma que con el jugo.

2.7 Hidrólisis del extracto rico en saponinas

Se disuelve 1,0 g del extracto de saponinas en 15 mL de etanol y se añaden 15 mL de HCl de concentración molar equivalente 2 mol/L. La solución se refluja durante tres horas después de lo cual se concentra hasta la tercera parte de su volumen inicial, se disuelve con igual cantidad de agua, se extrae con acetato de etilo y posteriormente con cloroformo. Las soluciones orgánicas se secan y se concentran a presión reducida hasta sequedad.

3 Capítulo 3. Análisis y discusión de los resultados

3.1 Recolección y preparación del material vegetal

Cada hoja de la planta se cortó en pequeños pedazos, retirándole la corteza, posteriormente se secó mediante calor artificial a 40 °C. Las hojas permanecieron aproximadamente 10 días hasta obtener un peso constante, luego fueron molinadas hasta que se logró obtener un polvo fino.

3.2 Obtención de crudos de saponinas mediante métodos de extracción

3.2.1 Procedimiento A. Método clásico de extracción de saponina

Una vez que el material vegetal se encuentra seco y molinado, se procedió a la maceración de 1 kg del polvo fino en etanol/ agua (7:3 v/v), dejándolo en reposo durante 72 horas. Esta operación se repitió 2 veces más.

El extracto hidroalcohólico obtenido se evaporó a 40 °C y presión reducida, hasta obtener un sólido carmelita oscuro. En la Tabla IV se muestra el rendimiento respecto al material vegetal pesado.

Tabla IV. Rendimiento del extracto hidroalcohólico

<i>Material Vegetal Seco</i>	<i>Extracto hidroalcohólico</i>	<i>% de extracción</i>
<i>1 kg</i>	188.96 g	18.89

Del extracto hidroalcohólico se tomaron 10 g y se suspendieron en agua, esta mezcla se extrajo 3 veces con n- butanol saturado en agua, se unieron los extractos y se evaporaron a 40 °C y presión reducida hasta obtener un sólido verde claro (crudo de saponinas). En la Tabla V se muestra el rendimiento respecto al material vegetal seco.

Tabla V. Rendimiento del extracto butanólico

<i>Extracto hidroalcohólico</i>	<i>Extracto butanólico</i>	<i>% de extracción</i>
<i>10 g</i>	3 g	5.66

Este método de extracción, a pesar de ser sencillo, muestra como desventaja la formación de emulsiones violentas a la hora de añadir los solventes, lo cual retrasa el experimento debido a que el mismo debe dejarse reposar por varios días hasta que la emulsión haya disminuido. Por otra

parte, manifiesta como ventaja la no aplicación de calor, lo cual mantiene bajas las probabilidades de obtener en el producto estructuras modificadas.

3.2.2 Procedimiento B. Extracción de saponinas a partir del jugo

El jugo que se obtuvo mediante el proceso de expresión presenta pH= 4.48, densidad 1.57 g/ mL y concentración de sólidos totales de 80 g/L. Del mismo se tomaron 125 mL y se extrajo 3 veces con n-butanol saturado en agua, se unieron los extractos y se evaporaron a 40 °C y presión reducida hasta obtener un sólido verde claro (crudo de saponinas). En la Tabla VI se muestra el rendimiento respecto a la masa de sólidos totales presentes en la muestra de jugo.

Tabla VI. Rendimiento del extracto butanólico

<i>mL de jugo</i>	<i>Extracto butanólico</i>	<i>% de extracción</i>
125	1.53	15.30

Este método presenta como ventaja que es más rápido, ya que se parte directamente del jugo y solo se utiliza un solvente, aunque, como en el método anterior, presenta la formación de emulsiones violentas, lo cual retrasa la realización del trabajo experimental.

3.2.3 Procedimiento C. Extracción de saponinas mediante el Soxhlet

En este procedimiento se utilizaron tres solventes, donde se aumenta la polaridad de los mismos, con el objetivo de obtener un crudo de saponinas más “puro”. Después de cada extracción, se evaporó el solvente a 40 °C y presión reducida hasta obtener un sólido seco. En la Tabla VII se muestra el rendimiento de cada solvente respecto a la masa inicial de material vegetal seco.

Tabla VII. Rendimiento de la extracción mediante el Soxhlet

<i>Solvente</i>	<i>Masa del extracto (g)</i>	<i>Aspecto físico</i>	<i>% de extracción</i>
<i>Éter de petróleo</i>	0.22	Sólido amarillo claro	2.22
<i>Cloroformo</i>	0.19	Sólido verde oscuro	1.97
<i>n- butanol</i>	0.63	Sólido verde claro	6.30

Este método presenta como ventaja la no formación de emulsiones, ya que no existe presencia de agua en el medio, por lo que este factor no afecta ni retrasa el trabajo experimental. Sin embargo, se diferencia de los otros métodos por la aplicación de altas temperaturas, lo cual constituye una seria desventaja, ya que aumenta la probabilidad de desintegración de las estructuras, obteniéndose

asimismo estructuras modificadas. Este fenómeno se demostró más adelante con la realización de cromatografía de capa delgada, ya que se observó la presencia de diosgenina en el extracto butanólico.



Donde

1: Patrón de diosgenina

2: Extracto butanólico obtenido por el Procedimiento C

Fase móvil: acetato de etilo/ n- hexano (1: 2)

Revelador: H_2SO_4 (concentrado)

Figura 13. Cromatograma del extracto butanólico (Procedimiento C) vs diosgenina

3.2.4 Selección del extracto al que se le aplica el ensayo biológico

De acuerdo a la baja disponibilidad de insectos para la realización del ensayo biológico se decidió escoger, en una primera etapa, uno de los extractos para probar su actividad sobre el *Cylas formicarius*. El criterio de selección se basó en considerar el contenido de saponinas en los extractos, ya que se cree que la actividad insecticida de la planta está directamente relacionada con estos metabolitos.

Se procedió a la realización del ensayo de la espuma para cada extracto, como indicador de la presencia de saponinas, ya que estas son sustancia anfífilas, tensoactivas, las cuales disminuyen la tensión superficial de la interface agua-aire y facilita la formación de espumas, ensayo que se reporta en varios artículos revisados (Moghimpour, 2015, Chen 2010, Rossi, 2007, Pasaribu, 2014, Böttcher, 2015, Park, 2005, Jianga, 2015, Scotti do Canto, 2010).



Figura 14. Ensayo de la espuma 30 minutos después de comenzado el experimento

En la imagen de la figura 14 se muestran los resultados de la prueba de la espuma, para lo cual se añadió 2 mL de agua destilada a 0.0300 g de cada uno de los extractos obtenidos por los procedimientos A, B y C respectivamente y se agitaron vigorosamente durante 30 segundos, se dejaron en reposo durante 30 minutos, tiempo al cual se capturó la imagen que se presenta. Se observa claramente que existe una amplia diferencia entre los niveles de las capas de espuma y a pesar de que es un ensayo cualitativo para estimar la presencia de saponinas, es válido asumir a priori que el extracto obtenido mediante el procedimiento A presenta un mayor contenido de saponinas pues transcurridos 30 minutos posteriores al proceso de agitación de la suspensión acuosa, persiste una capa de espuma que es la más gruesa de las tres.

Otro de los elementos considerados para la selección del extracto, es que se cuenta con un patrón de furcreastatina, lo que reviste gran importancia debido a la carencia de patrones de saponinas esteroideas en el mercado internacional, esto unido a que en estudios precedentes (Lic. Pérez de Armas, 2011) se ha corroborado que entre las saponinas presentes en esta planta la furcreastatina es un metabolito mayoritario, puede ofrecer información útil a la hora de dilucidar cuál de los compuestos presentes en el crudo pudieran ser responsables de la actividad biológica. En análisis por cromatografía de capa fina (CCF) se demostró que el extracto n-butanólico obtenido por el procedimiento A contenía una mayor concentración de furcreastatina, mientras que los extractos que se obtuvieron por las demás variantes no muestran esta señal.

Lo anterior también se tuvo en cuenta debido a que, actualmente, se realizan trabajos para el aislamiento de furcreastatina y el hecho de contar con un extracto al cual se le evalúe su actividad

insecticida, el cual contenga furcreastatina, sienta precedentes para estudios posteriores con esta saponina.



Donde

F: Furcreastatina

1: Extracto butanólico obtenido por el Procedimiento A

2: Extracto butanólico obtenido por el Procedimiento B

3: Extracto butanólico obtenido por el Procedimiento C

Fase móvil: cloroformo/metanol (7:3)

Revelador: H₂SO₄ (concentrado)

Figura 15. Cromatograma de los extractos obtenidos por las diferentes Variantes

Debido a lo antes expuesto se seleccionó el extracto obtenido por el procedimiento A para la realización del ensayo biológico, sin embargo, debemos aclarar que esto es en una etapa inicial y se requiere evaluar, en un segundo momento, el potencial de los otros extractos.

3.3 Obtención de crudos de saponinas mediante procedimientos de precipitación

Al tener en cuenta los resultados que se presentan en el epígrafe 3.5, se puede suponer que las saponinas presentes en la *Furcraea hexapetala* son causantes de la actividad insecticida, por lo que el siguiente paso es desarrollar un procedimiento de bajo costo y bajo uso de reactivos capaz de conseguir un producto de elevada concentración de saponinas a partir directamente del jugo de la planta.

Al analizar circunstancialmente el jugo, se observa el mismo están presentes partículas dispersas que le proporcionan turbidez formando así un sistema disperso; por lo que se plantea la hipótesis de que, al ser las saponinas moléculas de gran tamaño y elevado peso molecular, la mayoría de estas forman parte la fase dispersa. A partir de esta hipótesis, se toma la decisión de desestabilizar el sistema disperso mediante varios procedimientos.

3.3.1 Procedimiento I. Desestabilización del sistema disperso mediante la adición de NaCl

Al transcurrir 7 días después de haber adicionado el electrolito, las muestras no mostraban ningún cambio notable, por lo que se decide que la adición de este electrolito no desestabiliza el sistema disperso formado en el jugo en estas condiciones.



Figura 16. Adición de NaCl pasados los 7 días de comenzado el experimento

3.3.2 Procedimiento II. Desestabilización del sistema disperso mediante la variación de la temperatura

El procedimiento se lleva a cabo según el esquema de la figura 16 donde se evalúa cada 30 minutos el comportamiento del jugo con la aplicación de calor hasta transcurridas las 4 horas de iniciado el experimento, ya que a este tiempo las muestras no mostraban ningún cambio físico o notable en la composición del jugo, por lo que se decide dejar en reposo y a bajas temperaturas para estudiar periódicamente su comportamiento.

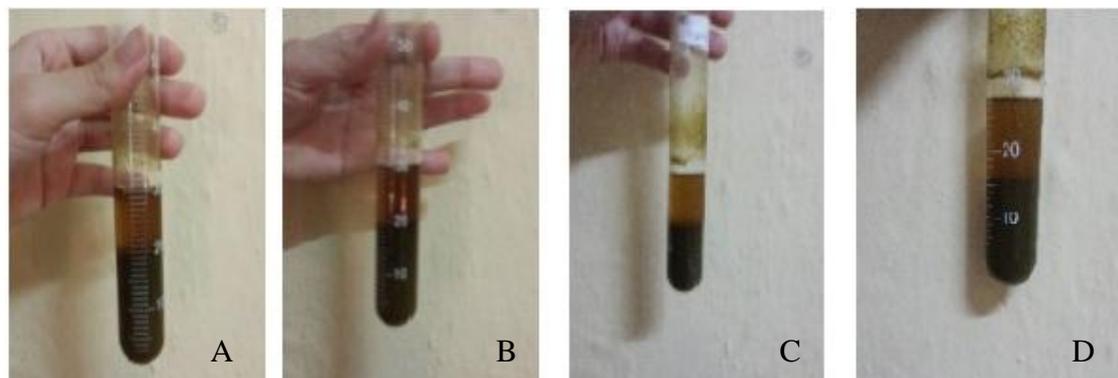


Figura 17. Formación de fases del jugo a los 10 días de finalizado el experimento. A: Testigo. B: T=40°C. C: T= 60°C. D: T= 80°C

Pasados los 2 días de encontrarse las muestras en frío, se observó el inicio de la formación de dos fases en todos los tubos de ensayo, por lo que se decidió continuar con la aplicación de bajas temperaturas hasta que la separación de las fases terminara (aproximadamente 10 días).

Las fases formadas son separadas en frío, ya que al abandonar este ambiente vuelven a unirse y forman nuevamente el sistema disperso por lo que este constituye un proceso reversible. A cada una se le realiza el ensayo de la espuma donde todas manifiestan la presencia de saponinas, aunque se observa que las fases turbias (abajo) presentan mayor persistencia de la espuma con el tiempo.

De aquí podemos deducir que la aplicación de calor no interviene en el proceso de desestabilización del sistema disperso en estas condiciones, ya que a la muestra testigo no se le aplica ningún calentamiento y aun así manifiesta el mismo comportamiento que las demás. Por otra parte, el ambiente a bajas temperaturas es el que provoca la formación en el jugo de dos fases, una clara (arriba) y otra turbia (abajo), ambas con presencia de saponinas, aunque esta última con mayor concentración de las mismas.

Debido a lo expuesto anteriormente se demuestra que la obtención de un crudo rico en saponinas es posible mediante la aplicación de temperaturas frías ($T \approx 4 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.3.3 Procedimiento III. Precipitación de saponinas con acetona

Como se ha reflejado en epígrafes anteriores, dentro de la mezcla de saponinas presentes en la *Furcraea hexapetala*, la furcreatina es la que se encuentra en mayor proporción, por lo que se le atribuye a esta la actividad insecticida de la planta. Con vistas a continuar el estudio, se propone desarrollar un procedimiento de obtención de furcreatina para comprobar su actividad biológica frente al *Cylas formicarius*.

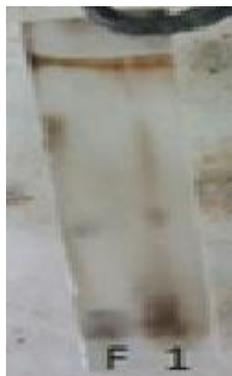
En estudios precedentes se demostró que esta saponina precipitaba en presencia de acetona y a bajas temperaturas, por lo que se decide reproducir este experimento, solo que es cambiado el punto de partida.

Al añadir la acetona al jugo, la precipitación ocurre de manera instantánea, aun así, se deja reposar el producto por una semana en condiciones de bajas temperaturas para garantizar una completa precipitación.

Tabla VIII. Resultado de la precipitación de saponinas con acetona

Proporción acetona/ jugo	Gramos de precipitado	Aspecto físico
7:3	0.26	Sólido de color blanco
6:4	0.1	Sólido de color carmelita oscuro
5:5	0.08	Sólido de color carmelita oscuro
4:6	0.13	Sólido de color carmelita oscuro
3:7	0.12	Sólido de color carmelita oscuro

Nos llamó la atención el producto que se obtiene en la proporción acetona/jugo 7:3, ya que las características que presenta son similares a las reportadas en estudios anteriores (Lic. Pérez de Armas, 2011) para la furcreastatina, por lo que se decide comparar este sólido con un patrón de la misma mediante cromatografía de capa delgada.



Donde

F: Furcreastatina

1: Producto de la precipitación del jugo (proporción acetona/ jugo 7:3)

Fase móvil utilizada: cloroformo/ metanol (7:3)

Revelador: H₂SO₄ (concentrado)

Figura 18. Cromatograma del producto de la precipitación del jugo (proporción acetona/ jugo 7:3)

Con el cromatograma se demuestra la presencia de furcreastatina en el producto obtenido.

3.4 Evaluación de la efectividad biológica del jugo de *Furcraea hexapetala* sobre el *Cylas formicarius* mediante ensayos "in vitro"

Se realizan observaciones diarias y se contabilizan los insectos vivos por placa, donde se garantiza siempre la alimentación de los mismos, para así determinar el porcentaje de efectividad de cada agente por variante a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas de montado el experimento.

Se realizó el análisis estadístico a los resultados obtenidos en la Tabla XIV que se muestra en los Anexos y se aplica el Test de Dixon como criterio de eliminación de los valores erráticos, se

calculó además el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para cada día y cada concentración. A continuación, se muestran los resultados.

Tabla IX. Efectividad técnica por contacto del jugo a diferentes concentraciones sobre *Cylas formicarius* a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas

c(Jugo) %	Día	Réplica				Despreciados	AVERAGE	SD	RSD (%)	Inferior	Superior
		%E ₁	%E ₂	%E ₃	%E ₄						
0	1	0,00	0,00	0,00	0,00	Ninguno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	Ninguno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,00	0,00	0,00	0,00	Ninguno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,00	0,00	0,00	0,00	Ninguno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	Ninguno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	0,00	0,00	0,00	0,00	Ninguno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12,5	1	50,00	50,00	50,00	50,00	Ninguno	50,0	0,0	0,0	50,0	50,0
	2	55,00	55,00	55,00	60,00	%E4	55,0	0,0	0,0	55,0	55,0
	3	60,00	60,00	60,00	70,00	%E4	60,0	0,0	0,0	60,0	60,0
	4	60,00	65,00	65,00	65,00	%E1	65,0	0,0	0,0	65,0	65,0
	5	60,00	65,00	65,00	65,00	%E1	65,0	0,0	0,0	65,0	65,0
	6	60,00	65,00	65,00	65,00	%E1	65,0	0,0	0,0	65,0	65,0
25	1	55,00	60,00	60,00	60,00	%E1	60,0	0,0	0,0	60,0	60,0
	2	60,00	60,00	65,00	65,00	Ninguno	62,5	2,9	4,6	55,3	67,1
	3	60,00	65,00	65,00	70,00	Ninguno	65,0	4,1	6,3	54,9	71,5
	4	65,00	65,00	65,00	75,00	%E4	65,0	0,0	0,0	65,0	65,0
	5	65,00	65,00	65,00	75,00	%E4	65,0	0,0	0,0	65,0	65,0
	6	65,00	65,00	65,00	75,00	%E4	65,0	0,0	0,0	65,0	65,0
50	1	65,00	65,00	65,00	70,00	%E4	65,0	0,0	0,0	65,0	65,0
	2	65,00	70,00	70,00	70,00	%E1	70,0	0,0	0,0	70,0	70,0
	3	70,00	70,00	75,00	75,00	Ninguno	72,5	2,9	4,0	65,3	77,1
	4	75,00	80,00	80,00	80,00	%E1	80,0	0,0	0,0	80,0	80,0
	5	75,00	80,00	80,00	80,00	%E1	80,0	0,0	0,0	80,0	80,0
	6	75,00	80,00	80,00	80,00	%E1	80,0	0,0	0,0	80,0	80,0
100	1	65,00	65,00	70,00	75,00	Ninguno	68,8	4,8	7,0	56,9	76,4
	2	70,00	75,00	75,00	75,00	%E1	75,0	0,0	0,0	75,0	75,0
	3	70,00	75,00	80,00	85,00	Ninguno	77,5	6,5	8,3	61,5	87,8
	4	85,00	85,00	90,00	95,00	Ninguno	88,8	4,8	5,4	76,9	96,4
	5	85,00	85,00	90,00	95,00	Ninguno	88,8	4,8	5,4	76,9	96,4
	6	85,00	85,00	90,00	95,00	Ninguno	88,8	4,8	5,4	76,9	96,4

A continuación, se presenta un resumen de los promedios de la efectividad para los días y las concentraciones ensayadas.

Tabla X. Promedio de la efectividad técnica por contacto del jugo de *Furcraea hexapetala* a diferentes concentraciones sobre *Cylas formicarius* a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas

Concentración del jugo (%)	Efectividad técnica (%)					
	24h	48h	72h	96h	120h	144h
100	68.8	75	77.5	88.8	88.8	88.8
50	65.0	70	72.5	80	80	80
25	60	62.5	65	65	65	65
12.5	50	55	60	65	65	65

Al analizar la efectividad técnica con respecto al tiempo en cada concentración se observa que los resultados alcanzados a las 24h y 48h a concentraciones del jugo equivalentes a 12.5% no son favorables, ya que no cumplen con el valor mínimo (60%) de efectividad umbral establecida por Sanidad Vegetal. En las demás concentraciones los resultados alcanzados son satisfactorios desde los primeros días, aumentado paulatinamente con el transcurso de las horas.

Todas las concentraciones alcanzan el máximo de efectividad a las 96h de comenzado el experimento, las cuales mantienen un valor constante con el transcurso del tiempo. Al comparar el valor máximo en cada concentración (a las 96h), todas sobrepasan el valor mínimo permisible por Sanidad Vegetal, por lo que se tienen elementos para plantear que el jugo de la *Furcraea hexapetala* es efectivo sobre el *Cylas formicarius*.

A partir de este resultado, se plantea que el siguiente paso sería probar que de entre los compuestos presentes en el jugo, las saponinas son las responsables de esta actividad insecticida.

3.5 Evaluación de la efectividad biológica del extracto butanólico obtenido por el Procedimiento A, sobre el *Cylas formicarius* mediante ensayos "in vitro"

Se realizan observaciones diarias y se contabilizan los insectos vivos por placa, donde se garantiza siempre la alimentación de los mismos, para así determinar el porcentaje de efectividad de cada agente por variante a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas de montado el experimento.

Se realizó el análisis estadístico a los resultados obtenidos en la Tabla XV que se muestra en los Anexos y se aplica el Test de Dixon como criterio de eliminación de los valores erráticos, se calculó además el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para cada día y cada concentración. A continuación, se muestran los resultados.

Tabla XI. Efectividad técnica por contacto del extracto butanólico a diferentes concentraciones sobre *Cylas formicarius* a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas

c(extracto) %	Día	Réplica				Despreciados	Average	SD	RSD (%)	Inferior	Superior
		%E1	%E2	%E3	%E4						
0	1	0,00	0,00	0,00	0,00	Ninguno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	Ninguno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,00	0,00	0,00	0,00	Ninguno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,00	0,00	0,00	0,00	Ninguno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	Ninguno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	0,00	0,00	0,00	0,00	Ninguno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,125	1	50,00	55,00	55,00	55,00	%E1	55,0	0,0	0,0	55,0	55,0
	2	55,00	60,00	60,00	60,00	%E1	60,0	0,0	0,0	60,0	60,0
	3	65,00	65,00	65,00	65,00	Ninguno	65,0	0,0	0,0	65,0	65,0
	4	65,00	65,00	65,00	70,00	%E4	65,0	0,0	0,0	65,0	65,0
	5	65,00	65,00	65,00	70,00	%E4	65,0	0,0	0,0	65,0	65,0
	6	65,00	65,00	65,00	70,00	%E4	65,0	0,0	0,0	65,0	65,0
0,25	1	60,00	60,00	65,00	65,00	Ninguno	62,5	2,9	4,6	55,3	67,1
	2	60,00	65,00	65,00	70,00	Ninguno	65,0	4,1	6,3	54,9	71,5
	3	60,00	65,00	75,00	75,00	Ninguno	68,8	7,5	10,9	50,1	80,7
	4	65,00	70,00	70,00	75,00	Ninguno	70,0	4,1	5,8	59,9	76,5
	5	65,00	70,00	70,00	75,00	Ninguno	70,0	4,1	5,8	59,9	76,5
	6	65,00	70,00	70,00	75,00	Ninguno	70,0	4,1	5,8	59,9	76,5
0,5	1	60,00	65,00	75,00	75,00	Ninguno	68,8	7,5	10,9	50,1	80,7
	2	65,00	70,00	70,00	75,00	Ninguno	70,0	4,1	5,8	59,9	76,5
	3	70,00	75,00	75,00	75,00	%E1	75,0	0,0	0,0	75,0	75,0
	4	75,00	80,00	80,00	85,00	Ninguno	80,0	4,1	5,1	69,9	86,5
	5	75,00	80,00	80,00	85,00	Ninguno	80,0	4,1	5,1	69,9	86,5
	6	75,00	80,00	80,00	85,00	Ninguno	80,0	4,1	5,1	69,9	86,5
1	1	70,00	70,00	75,00	80,00	Ninguno	73,8	4,8	6,5	61,9	81,4
	2	70,00	75,00	75,00	80,00	Ninguno	75,0	4,1	5,4	64,9	81,5
	3	75,00	80,00	80,00	85,00	Ninguno	80,0	4,1	5,1	69,9	86,5
	4	85,00	90,00	90,00	95,00	Ninguno	90,0	4,1	4,5	79,9	96,5
	5	85,00	90,00	90,00	95,00	Ninguno	90,0	4,1	4,5	79,9	96,5
	6	85,00	90,00	90,00	95,00	Ninguno	90,0	4,1	4,5	79,9	96,5

A continuación, se presenta un resumen de los promedios de la efectividad para los días y las concentraciones ensayadas.

Tabla XII. Promedio de la efectividad técnica por contacto del extracto butanólico a diferentes concentraciones sobre *Cylas formicarius* a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas

Concentración del extracto butanólico (%)	Efectividad técnica (%)					
	24h	48h	72h	96h	120h	144h
1	73.8	75	80	90	90	90
0.5	68.8	70	75	80	80	80
0.25	62.5	65	68.8	70	70	70
0.125	55	60	65	65	65	65

Al analizar la efectividad técnica con respecto al tiempo en cada concentración se observa que el resultado alcanzado a las 24 h en la concentración equivalente a 0.125% no es favorable, ya que no cumple con el valor mínimo (60%) de efectividad umbral establecida por Sanidad Vegetal. En las demás concentraciones los resultados alcanzados son satisfactorios desde los primeros días, estos aumentan paulatinamente con el transcurso del tiempo.

Al igual que en el jugo, todas las concentraciones alcanzan el máximo de efectividad a las 96h de comenzado el experimento, las cuales se mantienen constantes con el transcurso del tiempo, es decir, el extracto rico en saponinas necesita cuatro días para alcanzar el máximo valor de efectividad técnica.

Si comparamos estos resultados con los que se obtuvieron a partir del jugo, podemos observar que la actividad biológica del extracto butanólico es superior, por lo que se tienen elementos para suponer que las saponinas son las responsables del efecto insecticida.

3.6 Hidrólisis del extracto butanólico

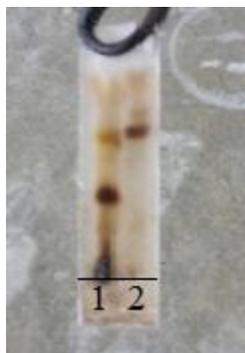
La hidrólisis del extracto butanólico es una reacción que a nivel de laboratorio se puede realizar en medio ácido o por vía enzimática, mediante esta se obtienen carbohidratos (fase acuosa) y sapogeninas (fase orgánica), lo cual permite evaluar si la actividad insecticida de los compuestos aislados se debe a la estructura esteroideal de las saponinas (sapogeninas) o a la estructura de las saponinas como un todo.

Por esta razón se aplicó el procedimiento de hidrólisis clásico que se ha establecido para este tipo de compuestos; como resultado de este experimento, en la fracción de acetato de etilo se obtuvo un sólido de color amarillo tenue, el cual era insoluble en agua y daba negativo al ensayo de la espuma.

Tabla XIII. Rendimiento de la hidrólisis

	<i>Extracción con cloroformo</i>	<i>Extracción con acetato de etilo</i>	<i>Fase Acuosa</i>
<i>% de extracción</i>	11	40	49

Debido a que en el cloroformo se pudieron disolver sapogeninas, se decide unir ambos extractos y compararlos cromatográficamente (CCD) con un patrón de diosgenina.



Donde:

1: Producto de la hidrólisis.

2: Patrón de diosgenina

Fase móvil utilizada: acetato de etilo/n-hexano (1:2)

Revelador: H₂SO₄ (concentrado)

Figura 19. Cromatograma del producto de la hidrólisis

La cromatografía realizada demuestra la presencia de diosgenina y otras sapogeninas en la muestra, lo cual es coherente con las estructuras aisladas por este método, por lo que se decide que el producto obtenido en la fase orgánica está apto para la realización del ensayo biológico.

Conclusiones

- De los procedimientos extractivos ensayados para la obtención de productos ricos en saponinas, el Procedimiento A (método clásico de extracción) es el que arrojó mejores resultados ya que presenta mayor concentración de saponinas.
- De los procedimientos de precipitación que se ensayaron solo dos arrojaron resultados adecuados (Procedimiento II y Procedimiento III), escogiéndose el primero como una vía económica de obtener concentrados de saponinas para la fumigación de los cultivos.
- El jugo presenta una actividad biológica adecuada dentro de los parámetros establecidos, ya que manifiesta un 88.8% de efectividad técnica sobre el *Cylas formicarius* en caso de la solución más concentrada y de un 65% en caso de la solución más diluida
- El crudo de saponinas alcanza un nivel de efectividad técnica adecuada en un menor tiempo que el jugo, muestra un máximo de efectividad correspondiente al 90% en la solución más concentrada y en la solución más diluida un 65%, por lo que la actividad insecticida del extracto butanólico es ligeramente mayor que la del jugo y se tienen elementos para suponer que las saponinas son las responsables de la actividad insecticida de la *Furcraea hexapetala*.
- La obtención de furcreastatina es posible a partir del jugo de la planta, mediante la precipitación con acetona en proporción 7:3 (acetona/ jugo).
- Las condiciones escogidas para la realización de la hidrólisis fueron las adecuadas, obteniéndose un producto apto para la realización del ensayo biológico.

Recomendaciones

- Realizar el ensayo biológico con el producto que se obtiene de la hidrólisis y con los extractos butanólicos obtenidos mediante los Procedimientos B y C.
- Profundizar en el estudio de los productos obtenidos en la precipitación con acetona a partir del jugo.
- Determinar si dentro del crudo de saponinas presentes en la *Furcraea hexapetala*, la furcreastatina es la responsable de la actividad insecticida de esta planta sobre el *Cylas formicarius*.

Bibliografía

- AGRAWAL, P. K. J., D. C.; GUPTA, R. K.; THAKUR, R. S 1985. Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal saponins and steroidal saponins. *Phytochemistry*, 24.
- ÁLVAREZ DE ZAYAS, A. 1996. El género *Furcraea* (Agavaceae) en Cuba. *Anales del Instituto de Biología UNAM*, 67, 18.
- ARIAS SUÁREZ, J. D. 2015. *Evaluación genotóxica de un extracto butanólico de Agave brittoniana T. subsp. brachypus en ratones balb/c*. Tesis de Grado, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- BONIFAZ PAREDES, L. E. 2010. *Determinación de la actividad insecticida de la saponina de quinua (Chenopodium quinoa) hidrolizada y no hidrolizada sobre Drosophila melanogaster.*, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- BÖTTCHER, S. D., STEPHAN 2015. Interfacial Properties of Saponin Extracts and Their Impact on Foam Characteristics. *Food Biophysics*, 10.
- CALLE, J. M. P., ANDY J. ; SIMONET, ANA M. ; GUERRA, JOSÉ O ; MACÍAS, FRANCISCO A. 2016. Steroidal saponins from *Furcraea hexapetala* leaves and their phytotoxic activity.
- CASTELLANOS L. ; FERNÁNDEZ , A. O., ISABEL ; SOTO, RAFAELA; MARTIN CARMEN 2011a. EFECTIVIDAD DEL EXTRACTO DE *Furcraea hexapetala* (Jacq.) Urban SOBRE *Polyphagotarsonemus latus* Banks EN CONDICIONES DE LABORATORIO. *Protección Vegetal*, 26, 3.
- CASTELLANOS L. ; FERNÁNDEZ , A. O., ISABEL ; GUERRA , JOSÈ ORESTES 2011b. Effectiveness of *Furcraea hexapetala* (Jacq.) Urban extract on *Myzus persicae* Zulzer. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 10, 9.
- CHEN, Y.-F. Y., CHAO-HSUN ; CHANG, MING-SHIANG; CIOU , YONG-PING ; HUANG, YU-CHUN 2010. Foam Properties and Detergent Abilities of the Saponins from *Camellia oleifera*. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 10.
- DE COMBARIEU, E. F., N. ; LOVATI, M.; MERCALLI, E. 2003. Furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. *Elsevier*, 74, 9.
- DENG-JYE, Y. T.-J., LU; SUN HWANG, LUCY 2003. Isolation and Identification of Steroidal Saponins in Taiwanese Yam Cultivar (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7.
- EGUIARTE, L. E. S., V; SILVA MONTELLANO, A 2000. Evolución de la familia Agavaceae: Filogénia, biología reproductiva y genética de población. *Bol. Soc. Bot. México*, 66.
- FERNÁNDEZ VALERO, A. C. G., LEÓNIDES ; MARTIN VASALLO , CARMEN VERÓNICA 2016. Eficacia técnica del jugo de dos especies de plantas de la familia Agavaceae contra *Cylas Formicarius Fabricius* en condiciones de laboratorio.
- FERNANDEZ VALVERDE, S. O. 1996. *Selección de mutantes de Chenopodium quinoa Willd en la generación M2, cuantificación de saponinas en las variedades Isluga y Barandales adaptadas al Valle de Toluca*. Tesis de Grado, Universidad Autónoma de México.
- FLORES, T. H. J. T. G. 2013. Estudio comparativo de tres metodologías cuantitativas de extracción de saponinas de la *Melisa Officinalis* "Toronjil". *Per. Quim. Ing. Quím.*, 16, 5.
- GONZÁLEZ GARCÍA, N. A. P., RUBÉN ; GUIBERT SÁNCHEZ, GUILLERMO; RAMOS GÓMEZ, NANCY Cría masiva del tetuán del boniato, *Cylas formicarius elegantulus* Summers, sobre alimento natural.

- GUERRA DE LEON, J. O. 2005. *Compuestos con actividad antiparasitaria del Agave Brittoniana*. T. Doctorado, Universidad de Cádiz, Universidad de La Habana, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- GUERRA DE LEON, J. O. M., ALFREDO; SIMONET, ANA MARÍA; MACÍAS, FRANCISCO ANTONIO; NOGUEIRAS, CLARA, GOMEZ, ALICIA; ESCARIO, JOSE A 2008. Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomona vaginalis*. *Biologia Tropical*, 56, 7.
- GUILLOT ORTIZ, D. D. M., PIET VAN 2010. El género *Furcraea* Ventenat (Agavaceae) en la provincia de Valencia: aspectos históricos, especies y cultivares. *Bouteloua*. Noguera, España: Teruel.
- HU, K. K., H.; DONG, A.; JING, Y.; IWASAKI, S.; YAO, X., 1999. Antineoplastic Agents III: Steroidal glycosides from *Solanum nigrum*. *Planta medica* 65.
- IANNACONE, J. C., CINDY ; DUEÑAS, BRENDA; CASTILLO, LUIS; ALVARIÑO, LORENA; ARGOTA, GEORGE 2013a. TOXICIDAD DE AGAVE AMERICANA Y FURCRAEA ANDINA (ASPARAGACEAE) SOBRE CULEX QUINQUEFASCIATUS (DIPTERA) Y HELEOBIA CUMINGII (MOLLUSCA). *Neotrop. Helminthol.*, 7, 15.
- IANNACONE, J. L. T., MARÍA ISABEL; ALVARIÑO, LORENA ; CEPEDA, CARLA; AYALA, HILDEBRANDO; ARGOTA, GEORGE 2013b. TOXICIDAD DE LOS BIOPLAGUICIDAS AGAVE AMERICANA, FURCRAEA ANDINA (ASPARAGACEAE) Y SAPINDUS SAPONARIA (SAPINDACEAE) SOBRE EL CARACOL INVASOR MELANOIDES TUBERCULATA THIARIDAE). *Neotrop. Helminthol.*, 7, 11.
- JARAMILLO, M. *Introducción al estudio fitoquímico de Chloroleucon Mangense*. Tesis para optar al grado de Doctor en Farmacia., Universidad de Colombia.
- JIAN- MING, J. Y.-J., ZHANG; CHONG- RENG, YANG 2004. Four New Steroid Constituents from the Waste Residue of Fibre Separation from *Agave americana* Leaves. *Chem. Pharm. Bull.*, 52, 5.
- JIANGA, J. W., ZHAOLIANG; LIUA, WEI; GAOA, YANFEI ; GUOA, SHENGHAO ; KANGA, SHUFANG 2015. Separation of Soybean Saponins From Soybean Meal by a Technology of Foam Fractionation and Resin Adsorption. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35.
- JIMÉNEZ JIMÉNEZ, S. F. 2007. LA SEÑALIZACIÓN Y EL PRONÓSTICO DE PLAGAS. ORIGEN, DESARROLLO Y RETOS. *FITOSANIDAD*, 11, 6.
- LIC. FERNÁNDEZ VALERO, A. 2009. *Efectividad del extracto de Furcraea hexapetala (Jacq.) Urban sobre áfidos y ácaros fitófagos*. Tesis de Maestría, Universidad de Cienfuegos Carlos Rafael Rodríguez.
- LIC. PÉREZ DE ARMAS, A. J. 2011. *Estudio fitoquímico de especies nativas de Cuba pertenecientes a la familia Agavaceae y evaluación de sus actividades biológicas*. Tesis de Doctorado, Universidad de Cádiz ;Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- LIC. SANTOS MORELL, T. L. 2004. *La Portulaca olerácea*. L [Online]. 2016].
- LÓPEZ DE RUIZ, R. E. S., RAUL A ; OSVALDO RUIZ, SOHAR 2003. Aislamiento de Esteroles, Bases de Amonio y Saponinas de *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gillies ex Hicken (*Amaranthaceae*). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22, 4.
- LÓPEZ LUENGO, M. T. 2001. Saponósidos. *Doyma Farm*. junio 2001 ed.
- MADLAND, E. 2013. *Extraction, Isolation and Structure Elucidation of Saponins from Herniaria incana*. Dostorado, Norwegian University of Science and Technology.

- MARSTON, H. 1995. *Chemistry and pharmacology of natural products*, USA, Press Syndicate of the University of Cambridge The Pitt Building.
- MARTÍNEZ MARTÍNEZ, A. 2001. SAPONINAS ESTEROIDES. Madellín.
- MASTROGIOVANNI, M. 2012. *Extracción, purificación y caracterización primaria de saponinas de Quillaja brasiliensis*. Tesina de grado, Universidad de la Republica Montevideo.
- MOGHIMIPOUR, E. K., HOSSEIN ; PARKHIDEH, SHAHRZAD ; HANDALI, SOMAYEH 2015. In-vitro Evaluation of Complex Forming Affinity of Total Saponins Extracted from Ziziphus spina-christi and Quillaja saponaria with cholesterol. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6, 6.
- MORAGA RUBIO, A. P. F., JOSÉ ANTONIO; DÍAZ CASTRO, NATHALY ; ROMERO, PEDRO. 2011. *Saponinas triterpénicas procedentes del cormo de crocus sativus como adyuvante en formulaciones de vacunas proteicas*. España patent application PCT/ES2010/070626.
- MOSTACERO, L. M., F; GAMARRA, O 2002. *Taxonomía de las fanerogamas útiles del Perú*, Trujillo, Editorial Normas Legales.
- PARK, J.-Y. P., MINERVA A ; HUNG, YEN-CON; MCWATTERS, KAY H ; EUN, JONG-BANG 2005. Effect of saponins on the foam/flow properties of paste and physical characteristics of akara made from decorticated black-eyed cowpeas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 7.
- PASARIBU, T. A., D.A. ; WINA, E. ; SUMIATI ;SETIYONO, A. 2014. Saponin Content of Sapindus rarak Pericarp Affected by Particle Size and Type of Solvent, its Biological Activity on Eimeria tenella Oocysts. *International Journal of Poultry Science*, 13, 6.
- PEÑA CERDA, M. E. 2011. *DETERMINACIÓN DE LA SAPOGENINA MAYORITARIA OBTENIDA DE LAS SAPONINAS DE HOJAS DE UGNI MOLINAE, TURCZ. (MURTILLA) Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE GLICÓGENO FOSFORILASA A*. Tesis de Grado, UNIVERSIDAD DE CHILE.
- PÉREZ OCHOA, J. L. Q. M., LILI ANDREA. 2009. *Evaluación de Métodos de extracción de saponinas de los residuos del beneficio del fique*. Tesis de Grado, Universidad Industrial de Santander.
- ROJAS CRISTANCHO, L. R. P. M., MARINELA. 2010. *Evaluación del efecto de las saponinas presentes en el bagazo del fique sobre la producción de metano*. Tesis de Grado, Universidad Industrial de Santander
- ROSSI, C. A. D. L., MARCELO; GONZÁLEZ, GABRIELA LAURA; PEREYRA, ANA MARÍA 2007. Presencia de metabolitos secundarios en el follaje de diez leñosas de ramoneo en el bosque xerofítico del chaco árido argentino. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 7, 12.
- SCOTTI DO CANTO, G. T., JANINE ; YANG, SAMANTA ; BORRÉ, GUSTAVO LUÍS ; GAROFO PEIXOTO, MARIA PAULA; GONZÁLEZ ORTEGA, GEORGE 2010. Evaluation of foam properties of saponin from Ilex paraguariensis A. St. Hil. (Aquifoliaceae) fruits. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46, 7.
- SEGUNDO ARMAS T. ; NORMA RAMOS C.; ANA CALDERÓN, T., A. C. L. F. C. P. L. F. V. H. M. F. C. B. C. N. C. E. R. P. D. L. G. 2002. INVESTIGACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS MEDICINALES CON EFECTO HIPOGLICEMIANTE Y DETERMINACIÓN DEL CROMO COMO FACTOR DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA. *Ciencia e Investigación*, 5.

- SILLER JUÁREZ, D. F. 2012. *Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave Lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*. Tesis de Grado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- SOBRINO JIMÉNEZ, J. F. V., ANIURKA; ORTEGA MESEQUER, ISABEL; CASTELLANOS GONZÁLEZ, LEÓNIDES 2016. Efecto insecticida del extracto de *Furcraea hexapetala* (Jacq.) Urban sobre *Plutella xylostella* L. *Centro Agrícola*, 43, 6.
- SOTO VÁSQUEZ, M. R. 2014. Estudio fitoquímico de las hojas, flores y frutos de *Solanum multifidum* Lam. y *Lycianthes lycioides* (L.) Hassl. (Solanaceae) procedentes del Cerro Campana, Región La Libertad-Perú. *ArnaldoA*, 21, 14.
- SPARG, S. G. L., M.E.; STADEN, J 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J.Ethnopharmacol*, 219, 94.
- ZEDAN Z. IBRAHEIM, H. A. H., DAOUD W. BISHAY 2003. Further saponins from *Taverniera aegyptiaca*. *Elsevier*, 62, 5.

Anexos.

Tabla XIV. Mortalidad y efectividad técnica del jugo sobre *Cylas formicarius*.

Concentración del jugo (%)	# de la réplica	Mortalidad de los insectos						Efectividad (%)					
		24h	48h	72h	96h	120h	144h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	1	13	15	14	18	18	18	65	75	70	90	90	90
100	2	14	15	17	19	19	19	70	75	85	95	95	95
100	3	13	14	15	17	17	17	65	70	75	85	85	85
100	4	15	15	16	18	18	18	75	75	80	90	90	90
50	1	13	14	14	16	16	16	65	70	70	80	80	80
50	2	14	14	15	16	16	16	70	70	75	80	80	80
50	3	13	13	14	16	16	16	65	65	70	80	80	80
50	4	13	14	15	15	15	15	65	70	75	75	75	75
25	1	12	12	13	13	13	13	60	60	65	65	65	65
25	2	11	12	12	13	13	13	55	60	60	65	65	65
25	3	12	13	13	13	13	13	60	65	65	65	65	65
25	4	12	13	14	15	15	15	60	65	70	75	75	75
12.5	1	10	11	12	12	12	12	50	55	60	60	60	60
12.5	2	11	11	14	12	13	13	50	55	70	65	65	65
12.5	3	10	11	12	13	13	13	50	55	60	65	65	65
12.5	4	10	12	12	13	13	13	50	60	60	65	65	65

Tabla XV. Mortalidad y efectividad técnica del extracto butanólico sobre Cylas formicarius.

Concentración del extracto butanólico (%)	# de la réplica	Mortalidad de los insectos						Efectividad (%)					
		24h	48h	72h	96h	120h	144h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	14	16	17	19	19	19	70	80	85	95	95	95
1	2	16	15	16	18	18	18	80	75	80	90	90	90
1	3	14	15	16	18	18	18	70	75	80	90	90	90
1	4	15	14	15	17	17	17	75	70	75	85	85	85
0.5	1	15	14	15	16	16	16	75	70	75	80	80	80
0.5	2	15	15	15	16	16	16	75	75	75	80	80	80
0.5	3	12	14	15	17	17	17	60	70	75	85	85	85
0.5	4	13	13	14	15	15	15	65	65	70	75	75	75
0.25	1	12	13	12	13	13	13	60	65	60	65	65	65
0.25	2	12	13	13	14	14	14	60	65	65	70	70	70
0.25	3	13	14	15	15	15	15	65	70	75	75	75	75
0.25	4	13	12	15	14	14	14	65	60	75	70	70	70
0.125	1	10	11	13	14	14	14	50	55	65	70	70	70
0.125	2	11	12	13	12	12	12	55	60	65	65	65	65
0.125	12	11	12	13	13	13	13	55	60	65	65	65	65
0.125	4	11	12	13	13	13	13	55	60	65	65	65	65