

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Departamento: Ciencias Farmacéuticas

TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Propuesta metodológica para la cuantificación de saponinas esteroideas en extractos de *Agave brittoniana* T.

Autor: Lisandra Sandelis Zorrilla.

Tutor: Dr.C Leisy Nieto Reyes.

Diciembre 2021

Santa Clara
Copyright©UCLV

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Academic Department: Pharmaceutical Sciences

DIPLOMA THESIS

Title: Methodological proposal for the quantification of steroidal saponins from *Agave brittoniana* T.

Author: Lisandra Sandelis Zorrilla.

Thesis Director: Dr.C Leisy Nieto Reyes.

Diciembre 2021

Santa Clara
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubián” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

Exergo

*"Solo aquellos que se atreven a tener grandes fracasos
terminan consiguiendo grandes éxitos"*

Robert F. Kennedy

Dedicatoria

A mi familia en general por apoyarme en todo momento de la carrera con buenos y alentadores consejos y porque me han guiado por la senda correcta creciendo espiritualmente como una mejor persona

Agradecimientos

A mi tutora Leisy Nieto Reyes por brindarme su apoyo y sabiduría incondicional; porque sin su ayuda no hubiese podido lograr mi objetivo.

A mi madre mil gracias por su amor, apoyo y motivación para culminar esta carrera; siendo esta una recompensa a su esfuerzo y confianza

A todos los profesores de la carrera por la contribución en mi formación como profesional

A mis compañeros de aula, que me apoyaron en los momentos difíciles y me brindaron su apoyo incondicional sin esperar nada a cambio

A mi compañera y amiga Susana por su atención, consejos y ayuda en lo que necesitara a lo largo de la carrera.

Resumen

Resumen

En el trabajo de investigación se realizó una revisión bibliográfica detallada con el fin de proponer una metodología para la cuantificación de saponinas esteroidales en los extractos obtenidos de las hojas de la especie *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus* con fines farmacéuticos. En su desarrollo, se recopilaron, seleccionaron y se analizaron los resultados obtenidos de la revisión bibliográfica acerca de las metodologías analíticas descritas para la determinación cualitativa y cuantitativa de saponinas esteroidales. Se seleccionaron 31 publicaciones según los criterios de inclusión y exclusión preestablecidos. La identificación analítica se describe, mayoritariamente, por los índices de espuma y hemólisis. La técnica de cuantificación más actual es HPLC acoplado a diferentes tipos de detectores. Se recomienda para la cuantificación de saponinas esteroidales de *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus*, en muestras que requieran mayor precisión, la técnica de HPLC-UV-VIS empleando columna C-18 y fase móvil: ácido fórmico acuoso y acetonitrilo y para análisis que requieran menor precisión la técnica Espectrofotometría UV-Vis con el empleo del reactivo de Liebermann Burchard.

Abstract

Abstract

In the research, a detailed bibliographic review was carried out in order to propose a methodology for the quantification of steroidal saponins in the extracts obtained from the leaves of the *Agave brittoniana* Trel species. spp. Brachypus for pharmaceutical purposes. During its development, the results obtained from the bibliographic review about the analytical methodologies described for the qualitative and quantitative determination of steroidal saponins were collected, selected and analyzed. were selected 31 publications according to the pre-established inclusion and exclusion criteria. The analytical identification is described, mainly, by the foam and hemolysis indices. The most current quantification technique is HPLC coupled to different types of detectors. It is recommended for the quantification of steroidal saponins from *Agave brittoniana* Trel. spp. Brachypus, in samples that require greater precision, the HPLC-UV-VIS technique using a C-18 column and mobile phase: aqueous formic acid and acetonitrile and for analyzes that require less precision the UV-Vis spectrophotometry technique with the use of the reagent of Liebermann Burchard.

Glosario

Glosario

Sigla	Definición
CCD	Cromatografía de capa delgada
CCF	Cromatografía en capa fina
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a detector por espectroscopía de masa
FAB	Bombardeo con Átomos Rápidos
FD	Desorción de Campo
FQF	Facultad de Química Farmacia
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPLC-ELSD	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector evaporativo de dispersión de luz
HPLC-ESI	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de ionización por electropulverización
HPLC-ESI-MSn	Cromatografía líquida de alta eficacia junto con la MS en tándem de múltiples etapas de ionización por electrospray
HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografía líquida de alta eficacia en tándem de múltiples etapas de ionización por electrospray y la detección MS de triple cuadrupolo
IR	Espectroscopía infrarroja
MS	Espectroscopía de masa
RMN	Resonancia magnética nuclear
RS	Revisión sistemática
RSD	Desviaciones estándar relativas
UCLV	Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
UHPLC	cromatografía líquida de ultra alta eficacia
UTEX	Unidad de Toxicología Experimental, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara
UV-Vis	Espectrofotometría ultravioleta-visible

Índice

1. Introducción	1
Objetivo General:	3
Objetivos específicos	3
2. Revisión bibliográfica	4
2.1. Revisión Sistemática	4
2.2. Generalidades de Agaves	7
Agave brittoniana T	8
2.3. Saponinas	10
Saponinas esteroidales	11
Sapogeninas y saponinas mayoritarias del <i>Agave brittoniana</i> T	13
Cuantificación de saponinas y sapogeninas	14
3. Materiales y métodos.	21
3.1 Diseño metodológico	21
3.2 Análisis de los resultados	23
4. Resultados y discusión.....	24
4.1. Identificación y selección de publicaciones.....	24
4.2 Descripción de las publicaciones seleccionadas según las variables en estudio	30
4.3 Propuesta de metodologías para la cuantificación de saponinas esteroidales de <i>Agave brittoniana</i> T	40
Conclusiones.....	43
Recomendaciones.....	45
Recomendaciones.....	44
Referencias bibliográficas	45

Introducción

1.Introducción

Agave brittoniana Trel., popularmente conocida como Maguey, es una planta oriunda de la región central de Cuba. Pertenece a la familia de las Asparagaceae, una de las más estudiadas en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, que comprende alrededor de 2480 especies. Es oriunda de la región central de Cuba.⁽¹⁾ Crece en terrenos áridos, pedregosos y estériles, como es el caso de la zona protegida Cubanacán, aledaña a la ciudad de Santa Clara. Es una planta de tipo herbáceo suculenta, perenne y monocárpica.⁽²⁾ Posee hojas de color verde grisáceo, carnosas, lineales y lanceoladas, de aproximadamente 1 m de largo y 20 cm de ancho, generalmente espinosas y dentadas, las cuales se encuentran arrocetadas en el ápice del tronco que es simple y leñoso.⁽³⁾

Agave brittoniana T se caracteriza por presentar en su composición un alto contenido de fibra constituida por ceras, polialcoholes, poliazúcares ⁽⁴⁾. En estudios previos han detectado la presencia de aminos y/o aminoácidos, grasas, aceites esenciales y esteroides⁽⁵⁾. Además, contiene saponinas esteroidales dentro de sus metabolitos secundarios, que en, dependencia de su estructura química, pueden presentar múltiples acciones farmacológicas.⁽⁶⁾

Las saponinas son metabolitos secundarios que pertenecen al grupo de los glicósidos, entre los que se incluyen a las sustancias constituidas por azúcares en forma de acetales, son solubles en agua produciendo espumosis cuando las soluciones son agitadas. Están constituidas por un núcleo lipofílico o aglicón, que puede presentar una estructura esteroide o triterpenoide, dependiendo de su naturaleza química, con una o más cadenas de carbohidratos.⁽⁷⁾

Las saponinas esteroidales están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y, aunque en mayor o menor medida se encuentran en una gran cantidad de plantas, son especialmente abundantes en algunas familias, entre ellas la Agavaceae.⁽⁸⁾

Se han empleado diferentes métodos para la determinación de saponinas. Algunos de ellos se basan en sus propiedades físicas (habilidad de formar espuma) o propiedades biológicas (hemólisis, actividad antifúngica). También existen métodos

colorimétricos y, más recientemente, cromatográficos. La ventaja de esta última técnica es que no mide las propiedades generales de las saponinas, sino que es capaz de distinguir componentes individuales de una mezcla. ⁽⁹⁾

Los métodos analíticos más utilizados son: índice de espuma, índice de hemólisis e índice de pescado, que son métodos indirectos no muy confiables. Se han desarrollado metodologías de cuantificación directa a través de reacciones colorimétricas, como son: espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis), cromatografía de capa fina y cromatografía líquida.⁽¹⁰⁾ No obstante, se dificulta su cuantificación por no contar siempre con el estándar requerido, de manera que se debe proceder a la laboriosa actividad de purificación.^(11, 12)

En la actualidad, y dado por el proceso de globalización, se ha generado la aparición creciente y constante de nueva información, en múltiples artículos y publicaciones, que incluye la relacionada con las plantas medicinales. ^(12, 13). Esto ha generado la necesidad de extractar los resultados en relación a un tema determinado, a la hora de realizar revisiones de la literatura especializada. ⁽¹⁴⁾La manera más sencilla y completa de optimizar el uso de la información es mediante su compilación, a través de las revisiones sistemáticas.⁽¹⁴⁾

El grupo de investigación sobre plantas medicinales de la Facultad de Química Farmacia (FQF) de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y de la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX) de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, han llevado a cabo estudios de caracterización química y farmacológica de las hojas de *Agave brittoniana* T. Se requiere el desarrollo de metodologías analíticas para la cuantificación de saponinas esteroidales en los productos desarrollados.

Teniendo en consideración la amplia presencia de metodologías analíticas descritas para la cuantificación de saponinas esteroidales, en artículos y publicaciones, que pudieran ser ajustadas a las condiciones de nuestros laboratorios; se fundamenta el siguiente trabajo.

Se considera como **principal problema científico** que no se cuenta con una técnica analítica precisa, confiable y segura, que permita la cuantificación de saponinas esteroidales en los extractos obtenidos a partir de las hojas de la especie *Agave brittoniana* Trel. spp. Brachypus.

Hipótesis:

La propuesta de técnicas analíticas precisas, confiables y seguras permitirán establecer la metodología de cuantificación de las saponinas esteroidales de *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus* para su ulterior empleo con fines farmacéuticos.

Objetivo General:

Proponer metodologías para la cuantificación de saponinas esteroidales en los extractos obtenidos de las hojas de la especie *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus* con fines farmacéuticos.

Objetivos específicos

1. Recopilar e interpretar los resultados obtenidos de la revisión de los estudios primarios seleccionados acerca de las metodologías analíticas descritas para la determinación cualitativa y cuantitativa de saponinas esteroidales.
2. Recomendar metodologías para la cuantificación de saponinas esteroidales en los extractos obtenidos de hojas de *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus*, ajustadas a las condiciones de laboratorio disponibles.

Revisión bibliográfica

2.Revisión bibliográfica

2.1. Revisión Sistemática

Las Revisiones Sistemáticas son un diseño de investigación observacional y retrospectivo, que sintetiza los resultados de múltiples investigaciones primarias. Son parte esencial de la medicina basada en la evidencia por su rigurosa metodología, identificando los estudios relevantes para responder preguntas específicas de la práctica clínica. El término metanálisis se reserva para la combinación numérica de los datos. No todas las revisiones sistemáticas lo incluyen. Las revisiones sistemáticas son tan populares que han tenido un crecimiento vertiginoso en los últimos años.^(15, 16)

Las diferencias están dadas fundamentalmente por el uso de métodos estadísticos, que permite la combinación y análisis cuantitativo de los resultados obtenidos en cada estudio.^(15, 17)

Una revisión sistemática (RS), es un artículo de “síntesis de la evidencia disponible”, en el que se realiza una revisión de aspectos cuantitativos y cualitativos de estudios originales. El propósito es contestar a una pregunta de investigación mediante un proceso sistemático y explícito para identificar, seleccionar y evaluar críticamente la investigación relevante. Constituyen una herramienta esencial para:^(16, 17)

- Sintetizar la información científica disponible, el estado de la cuestión.
- Incrementar la validez de las conclusiones de estudios individuales.
- Identificar áreas de incertidumbre donde sea necesario realizar una investigación.

Existen diferentes modelos de revisiones sistemáticas según su ámbito de aplicación. En un principio se desarrollaron para cuestiones relativas al entorno sanitario, para la mejora de la atención y avanzar en la investigación, pero hoy en día ya se aplican a las diferentes áreas científicas.⁽¹⁵⁾

Metodología de la revisión sistemática

Aunque existen diferentes modos de orientar las revisiones de la bibliografía científica, las revisiones sistemáticas se consideran la forma más fiable. La metodología empleada en una revisión sistemática, no difiere, por su rigor, de las investigaciones convencionales, llevándose a cabo en seis pasos:⁽¹⁷⁾

1. Formulación de una pregunta claramente definida y concisa. Se establecerán los motivos por los que necesitamos una respuesta.
2. Localización y selección de los estudios relevantes, a través de una búsqueda sistemática que identifique todos los estudios pertinentes.
3. Tratamiento de los resultados obtenidos a partir de la búsqueda. Los documentos obtenidos a partir de todas las estrategias de búsqueda, deberían exportarse a un gestor de referencias (EndNote, Refworks, Mendeley).
4. Evaluación de la validez de los resultados de los estudios incluidos. Los investigadores deben establecer cuáles de los trabajos recuperados serán incluidos finalmente en la revisión, elaborando una lista de criterios de inclusión y exclusión que deberá ser lo más objetiva posible.
5. Extracción de los datos de interés, en base al tipo de estudio y el objeto de la pregunta de investigación. En cada uno de los artículos originales que se revisan, se debe buscar información de interés referente a las características de los estudios (diseño, criterios de inclusión/exclusión o de selección de casos y controles, periodo de selección, periodo de seguimiento, aleatorización, tipo de intervención, etc.).
6. Análisis e interpretación de los resultados (presentación sistemática y una síntesis de las características y resultados de los estudios incluidos).

Definición de la pregunta de investigación

Para iniciar una revisión sistemática es necesario identificar y convertir el problema, la incertidumbre o “laguna del conocimiento” en una pregunta que pueda ser respondida. Formular una pregunta significa reducirla a términos claros y precisos, identificando sus componentes principales. Respecto a la formulación de la pregunta, una de las metodologías más utilizadas, es la pregunta PICO que incluye 4 variables: población, paciente o problema específica que se va a investigar;

intervención que quiere evaluarse, comparación, si procede, con otras técnicas u opciones y desenlace o resultado que ofrecerán la medida de la intervención estudiada. (16, 17).

Búsqueda bibliográfica

La búsqueda se realiza en las bases de datos especializadas del área de investigación. La recopilación de la información debe ser exhaustiva, tanto con estudios publicados como no publicados para evitar incurrir en el sesgo de selección (no incluir estudios relevantes provocando un error sistemático en la estimación del efecto) o en el sesgo de publicación. (16, 18)

La búsqueda de texto libre es más exhaustiva, sirve para construir un vocabulario de sinónimos, pero menos eficiente. Para aumentar la eficiencia se pueden usar campos específicos y operadores especiales (and, or, near...), diseñar una combinación de ambos niveles para que la búsqueda sea más completa, pensar en límites a nuestra búsqueda: campos más allá del texto completo (title, abstract, subjects), idioma o fecha de publicación y utilizar las funcionalidades avanzadas que nos ofrezca la base de datos: gestión de duplicados, guardar el historial de búsqueda, guardar la búsqueda y los resultados. (18, 19)

Selección y valoración crítica de los estudios

Es importante registrar con todo rigor y detalle las características relevantes mediante un formato predeterminado. El registro debe incluir escalas o criterios preestablecidos para definir la validez de los estudios. La evaluación de la calidad de los estudios individuales que se incluyen en las revisiones sistemáticas es necesaria para limitar los sesgos, formarse una idea más precisa de las potenciales comparaciones y guiar la interpretación de los resultados. La selección de los estudios se realizará según los criterios de inclusión y exclusión por dos revisores independientes. Siempre que sea posible, los revisores desconocerán a los autores, la revista y los resultados de los artículos que deben seleccionar. (16, 19)

Extracción de los datos y síntesis de los resultados

La extracción de los datos es el proceso mediante el cual se obtiene la información de los estudios primarios seleccionados a partir de la búsqueda bibliográfica. Una vez finalizada la selección de los artículos, se debe obtener de ellos toda la información referente a la pregunta: cómo se realizó el estudio, quiénes y cuántos

participaron, cuál fue la intervención, cuáles fueron los resultados medidos, cuáles fueron las fuentes de financiamiento, etc. Los datos deben ser tabulados en un formulario de recolección de datos. Además de los datos mencionados, se debe evaluar el riesgo de sesgo de los artículos, ya que las conclusiones de la revisión sistemática podrán ser válidas en la medida en que los estudios que la componen, llamados estudios primarios, sean confiables.^(19, 20)

Conclusiones y recomendaciones

Las conclusiones están justificadas sólo cuando el proceso de recogida, análisis e integración de la información se aplica de forma completa y sistemática. Se debe aprovechar el esfuerzo que conlleva la realización de una revisión sistemática para identificar los huecos del conocimiento sobre el tema y sugerir recomendaciones sobre futuras iniciativas, basándose exclusivamente en el conocimiento revisado.

2.2. Generalidades de Agaves

Taxonomía

Agave brittoniana T. Pertenece a la división *Magnoliophyta*, clase *Liliopsida* y subclase *Liliidae*. Se incluye en el orden *Liliales*, familia *Asparagaceae* y género *Agave*. Su nombre común es Maguey ⁽¹⁾.

Familia Asparagaceae. Aspectos generales

Asparagaceae es una de las familias de plantas más estudiadas en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos y comprende 2480 especies. Se encuentra distribuida por casi todo el planeta y habita particularmente en regiones áridas. Incluye hierbas arrosetadas, trepadoras y arbustos. Las asparagáceas son plantas rizomatosas con raíz fusiforme, cilíndrica o tuberosa; tallo erecto, ramificado; hojas alternas, espiraladas, simples y generalmente suculentas. Presentan inflorescencia solitaria axilar, terminal o racimo de flores, las cuales son actinomorfas o zigomorfas, bisexuales o unisexuales. Los frutos son bayas y poseen semillas negras y aplanadas ⁽³⁾.

Género Agave. Características

Se distribuye a lo largo del continente americano. Abarca desde sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, incluyendo todas las islas del Caribe, desde Las Bahamas a Aruba, Curacao y Trinidad y Tobago. Los países con mayor número

de taxones son México, Estados Unidos, Cuba y Guatemala ⁽²¹⁾. Está formado por 300 especies de las cuales 18 crecen en Cuba, localizadas a lo largo de toda la isla y con un alto porcentaje de endemismo ⁽²²⁻²⁴⁾

Agave brittoniana T.

a) Hábitat y distribución

Agave brittoniana T. Es oriunda de la región central de Cuba. Crece en terrenos áridos, pedregosos y estériles, como es el caso de la zona protegida Cubanacán, aledaña a la ciudad de Santa Clara ^(23, 25)

b) Descripción botánica

Es una planta de tipo herbáceo suculenta, perenne y monocárpica⁽²³⁾. Posee hojas de color verde grisáceo, carnosas, lineales y lanceoladas, de aproximadamente 1 m de largo y 20 cm de ancho, generalmente espinosas y dentadas, las cuales se encuentran arrochetadas en el ápice del tronco que es simple y leñoso.⁽²⁵⁾ Las espinas son de color castaño oscuro, fuertes y de 2-4 mm de largo. Presenta cápsula oblonga y flores amarillas de 3-3,5 cm de largo.⁽²⁴⁾ Su inflorescencia emerge del centro de la roseta y puede ser en forma de espiga o ramificada, con las flores creciendo en umbelas sobre los pedúnculos laterales; después de varios años de crecimiento llega a alcanzar una altura que sobrepasa los 6 m y agota la planta que muere poco después. Su reproducción puede ser sexual o asexual, mediante los vástagos que emergen de rizomas de la planta madre ⁽²⁴⁻²⁶⁾.



Figura 1: *Agave brittoniana* spp, planta joven

c) Fitoquímica del *Agave brittoniana* T

La familia agavácea que se caracteriza por presentar en su composición un alto contenido de fibra constituida por ceras, polialcoholes, poliazúcares ^(4, 23). También

estudios previos han detectado la presencia de aminas y/o aminoácidos, grasas, aceites esenciales y esteroides⁽⁵⁾(tabla 1). Además, numerosas especies de agave contienen dentro de sus metabolitos secundarios saponinas esteroidales ^(6, 26), las que en dependencia de su estructura pueden presentar múltiples acciones farmacológicas.⁽²⁶⁾

Tabla 1: Metabolitos secundarios presentes en el Agave brittoniana Trel ^(5, 24, 25).

Metabolito	Ensayo	Resultados
Alcaloides	Dragendorff	+
	Mayer	+
	Wagner	+
Triterpenos y esteroides	Liebermann-Burchard	+
Quinonas	Borntrager	-
Coumarinas	Baljat	-
Aceites esenciales y grasas	Sudan III	+
Azúcares reductores	Fehling	+++
Saponinas	Espuma (Anexo 2)	+++
Fenoles y taninos	Cloruro de hierro (III)	-
Aminoácidos y aminas	Nihidrina	+
Flavonoides	Shinoda	-
Glicósido	Molish	+
Glicósidos cardiotónicos	Kedde-Raymond	-

d) Usos generales

En México, sobre todo dentro de la medicina indígena, es utilizada para tratar procesos inflamatorios, artritis y fiebre⁽²⁵⁾.

Las pencas machacadas y aplicadas en cataplasma provocan supuración. La infusión de raíz es depurativa y mezclada con raíces de Zarzaparrilla se dice que tiene valor curativo. Las hojas, en forma de cocimiento, se emplean tradicionalmente por una parte de la población cubana, en la cura de enfermedades parasitarias.^(23, 27).

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 ^(2, 24, 27)

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^(25, 26, 28). 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 sisalanaes hervido con sal y la decocción se utiliza como remedio para la ictericia.^(26, 27) 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^(25, 26, 29).

2.3. Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios que pertenecen al grupo de los glicósidos, donde se incluyen a las sustancias constituidas por azúcares en forma de acetales, son solubles en agua produciendo espumabilidad cuando las soluciones son agitadas. Tienen un amplio rango de actividades biológicas tales como su acción antimicótica, antiviral, anticancerígena, hipocolesterolémica, hipoglucémica, antitrombótica, diurética, antiinflamatoria y molusquicida.^(29, 30)

Consisten de un núcleo lipofílico que puede presentar una estructura esteroide o triterpenoide, con una o más cadenas de carbohidratos. Al núcleo lipofílico se le denomina aglicón, por ser el grupo que está enlazado a un átomo de carbono anomérico,^(7, 29).

Se clasifican de acuerdo al número de cadenas de azúcares que presentan en su estructura. Así pueden ser mono, di y tridesmósido⁽²⁹⁾.

Las saponinas monodesmósidas tienen solamente una cadena de azúcar la cual normalmente está unida al C-3 de la estructura. Las saponinas bidesmósidas tienen dos cadenas de azúcar; en ellas una cadena está unida por medio de un enlace éter al C-3 y la otra está unida con un enlace éster al C-28 (saponinas triterpénicas) o con un enlace éter al C-26 (saponinas furostánicas).^(29, 30) Las saponinas bidesmósidas son fácilmente transformadas en saponinas monodesmósidas cuando ocurre una hidrólisis en el azúcar esterificado en el C-28 de saponinas

triterpénicas. Estas saponinas no poseen muchas de las propiedades y actividades características de las saponinas monodesmósidas ^(10, 29).

Los monosacáridos más comunes presentes en la estructura de las saponinas son: D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), D-ácido glucorónico (Glca), D-ácido galacturónico (Gala), L-ramnosa (Rha), L-arabinosa (Ara), D-xilosa (Xyl) y D-fucosa (Fuc).

Por hidrólisis de las saponinas se obtienen las sapogeninas esteroidales, de gran interés para la industria farmacéutica por ser precursores en la síntesis de hormonas y corticoides.

Saponinas esteroidales

Las saponinas esteroidales son precursores de muchos medicamentos esteroidales tales como hormonas sexuales, corticosteroides, contraceptivos orales, vitaminas, diuréticos, y virtualmente todos los miembros del grupo de hormonas son preparados por conversión de las sapogeninas esteroidales derivadas de plantas⁽³⁰⁾.

Las saponinas esteroidales son glicósidos esteroidales que tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos, forman espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas.⁽³⁰⁾

La reacción hemolítica, así como la toxicidad en peces son características de las saponinas. Tienen la capacidad de formar “complejos moleculares” con los esteroides que son levemente solubles en agua, como el colesterol. La formación de este complejo podría llegar a ser la causa de muerte cuando se administra parenteralmente.^{(31) (32)}.

Estructura Química

Poseen una estructura compleja formada por un núcleo esteroide hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. Están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y aunque en mayor o menor medida se encuentran en una gran cantidad de plantas, son especialmente abundantes en algunas familias, entre ellas la Agavaceae.⁽⁸⁾ Este tipo de saponinas se subdividen en dos grupos principales; los derivados del espirostanol y los derivados del furostanol (Fig. 2)^(10, 33).

Los derivados del estirostano son estructuras hexacíclicas de 27 carbonos. Su estructura se deriva del cicloptanoperhidrofenantreno con dos heterociclos de 5 y 6 miembros y una cadena lateral en la posición 17.⁽³³⁾

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.⁽³⁴⁾

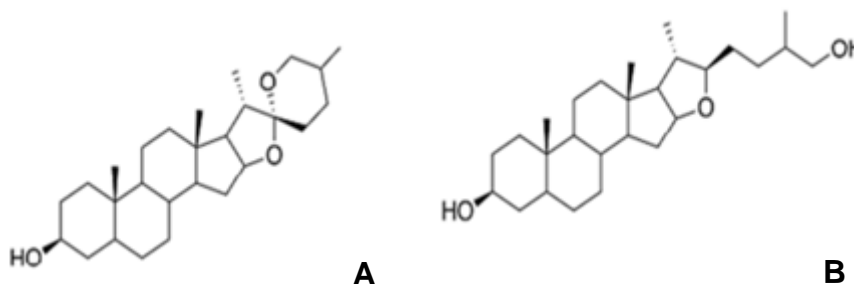


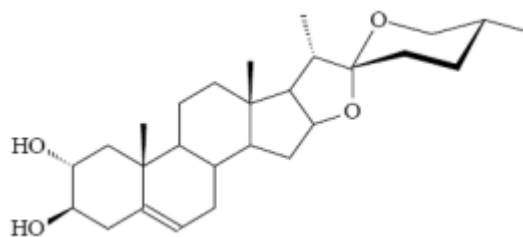
Figura 2: Estructura química de las saponinas esteroidales A) Estructura estirostánica. B) Estructura furostánica.⁽³⁴⁾

Tabla 2: Clasificación de saponinas esteroidales en relación a su nombre común y fuente.⁽³⁵⁾

R	R ₁	R ₂	R ₁₂	C-5	C-25	NOMBRE COMUN	FUENTE
3Glu-1Ram	H	H	H	C-C	-	Sarsaporrillósido	Smilax sp., Liliáceas
3Glu	H	H	H	C=C		Dioscina	Dioscorea sp., Dioscoráceas, "Ñame"
H	H	H	H	C=C		Diosgenina	Dioscorea sp., Dioscoráceas, "Ñame"
H	OH	H	H	C=C		Ruscogenina	Ruscus sp., Liliáceas
H	H	H	O	C-C		Hecogenina	Agave sp., Agaváceas, "Fique"
H	H	H	H	C=C		Yamogenina	-
H	H	OH	H	C-C		Digitogenina	Digitalis sp., Escrofulariáceas

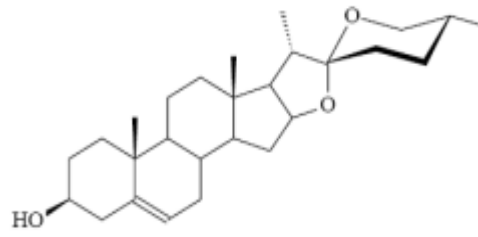
Muy comúnmente, a las saponinas esteroidales se las denomina con nombres vulgares con terminación INA. La IUPAC establece el nombre de estas a partir del núcleo básico estirostano.⁽³⁵⁾

Yucagenina



25R-espirost-5-en-2 α , 3 β -diol.⁽⁵⁾

Diosgenina



25R-espirost-5-en-3 β -ol.⁽⁵⁾

Figura 4: Estructura química de las saponinas esteroidales mayoritarias del *Agave brittoniana* Trell.

También se encontró la presencia de Agabrittonósido A, B y C.

Extracción y aislamiento

Las saponinas esteroidales, por su carácter glicosídico, son insolubles en solventes apolares. Para obtenerlas de las plantas o animales, el material seco y molido se trata previamente con un solvente apolar (generalmente éter de petróleo o n-hexano). Posteriormente el material ya desengrasado se extrae con etanol, metanol o mezclas en diferentes proporciones de estos alcoholes y agua. El extracto acuoso (libre de alcohol) se liofiliza o se concentra en un evaporador rotatorio, y se hace pasar por resinas de intercambio iónico a fin de eliminar sustancias iónicas. El eluato acuoso se pasa luego a través de materiales como el Sephadex LH-20 para separar las saponinas de otras moléculas como péptidos y macromoléculas que dificultan su purificación cromatográfica. Una vez obtenidas las saponinas, se pueden purificar por cromatografía en columna o líquida de alta resolución. En el caso de la cromatografía en columna, se puede utilizar sílica gel y como eluyentes mezclas de cloroformo-metanol-agua^(30, 37).

Un procedimiento de aislamiento típico consiste en utilizar cromatografía en columna empleando como fase estacionaria sílica gel y Sephadex LH-20. Esta última proporciona resultados satisfactorios para la separación de saponinas esteroidales^(34, 38)

Cuantificación de saponinas y sapogeninas

Se han empleado diferentes métodos para la determinación de saponinas. Algunos de ellos que dependen de las propiedades físicas (habilidad de formar espuma) o

propiedades biológicas (hemólisis, actividad antifúngica) de las saponinas ^(9, 30). También existen métodos colorimétricos y más recientemente, cromatográficos.⁽³⁷⁾

La cuantificación cualitativa de saponinas se ha determinado mediante métodos indirectos tales como la prueba de espuma, su capacidad hemolítica o la técnica conocida como índice de pescado, sin embargo estos métodos no son muy confiables puesto que pueden dar un falso positivo.^(38, 39) El método directo de cuantificación se puede realizar por CLAR o por espectrometría, sin embargo, se tiene el problema de no contar siempre con el estándar requerido para su cuantificación, de manera que se debe proceder a la laboriosa actividad de purificación^(11, 12, 37).

El análisis de un compuesto (analito) generalmente requiere la separación de otros compuestos y luego su identificación por métodos analíticos. Una muestra puede ser separada, identificada y cuantificada usando sus propiedades físicas y/o químicas, como densidad, tamaño, solubilidad, entre otras. ^(14, 37, 38)

Los métodos analíticos más utilizados son: índice de espuma, índice de hemólisis, índice de pescado, reacciones colorimétricas, cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía líquida (HPLC).^(10, 40)

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.^(37, 38)

Índice de espuma

Al agitar vigorosamente una solución acuosa de una muestra que contenga saponinas, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar una solución de jabón. Después de la agitación, la mezcla se deja reposar por 15 minutos; al término de este periodo, la presencia de saponinas se evidencia por la espuma sobrenadante. La porción de saponinas se miden de acuerdo a la altura de espuma sobrenadante. Puesto que existen otras sustancias que pueden formar también espuma, se debe asumir este ensayo como una prueba presuntiva de la presencia de saponinas esteroides, 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.^(35, 40)

Índice de hemólisis

Este ensayo es más confiable que el de espuma. La habilidad de las saponinas de romper los eritrocitos se ha utilizado por décadas como método de detección y cuantificación de estos compuestos. El parámetro medido con mayor frecuencia es el cambio de la absorbancia del sobrenadante de una suspensión de eritrocitos hemolizados por una saponina o una mezcla que contiene saponinas.^(10, 40)

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 cajas de Petri con agar-sangre o en cajas de Petri con gelatina-sangre. Cuando la muestra contiene taninos, deben eliminarse antes de realizar la prueba ya que la interfieren, Esto se logra por tratamiento repetido de la muestra con óxido de magnesio, el cual forma complejos insolubles con los taninos, por lo cual es fácil eliminarlos por filtración.^(35, 38, 40)

Ensayo de Liebermann-Burchard

Por la porción esteroide que poseen las saponinas esteroides, 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.^(35, 38, 40)

Índice de pescado

En la detección cualitativa de saponinas, también se he empleado el método denominado índice de pescado. Este se basa en la observación del grado de toxicidad de las saponinas en pescados.^(40, 41)

Reacciones colorimétricas.

Las saponinas también pueden detectarse por métodos colorimétricos, haciendo reaccionar a la saponina con sustancias específicas para dar como resultado compuestos coloreados. El anisaldehído, la vainillina y otros aldehídos aromáticos con un fuerte ácido mineral (sulfúrico, fosforito, ácidos perclóricos), dan como resultados productos coloreados al reaccionar con los productos de deshidratación de los aglicones.⁽³⁹⁾ Con vainillina-ácido sulfúrico, las saponinas espirostanas

presentan dos posibles absorciones, una de ellas localizada alrededor de 422 a 460 nm; mientras que saponinas triterpénicas con un grupo hidroxilo en el C23 presentan un pico localizado entre 460 y 485 nm ⁽³⁹⁻⁴¹⁾

Cromatografía en capa fina (TLC)

El análisis cualitativo de saponinas por cromatografía en capa fina (TLC), es de gran importancia para todos los aspectos de la investigación de saponinas. Las placas cromatográficas (generalmente de silicato) pueden analizar ya sea saponinas puros o extractos crudos, no son muy caros, son rápidos de usar y no requieren de un equipo especializado.⁽⁴²⁾

Existen disponibles varios reactivos de visualización para la pulverización sobre las placas, ejemplos: vainillina-ácido sulfúrico, Liebermann-Burchard, cloruro de antimonio, anisaldehído-ácido sulfúrico. ^(10, 40)

El solvente (fase móvil) más frecuentemente utilizado es la mezcla cloroformo-metanol-agua (65:35:10) ⁽⁴²⁾

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La prueba de HPLC, por su velocidad, sensibilidad y adaptabilidad para los compuestos polares no volátiles, es ideal para el análisis de las saponinas y sapogeninas. La única gran dificultad es la falta de grupos cromóforos detectables por UV en la mayoría de las saponinas. Sin embargo hay diferentes formas de soluciones a este problema, principalmente empleando las técnicas de detección de índice refracción, detección de masas o por derivación.^(42, 43)

La cromatografía HPLC es una técnica poderosa para obtener cantidades miligrámicas de saponinas a partir de mezclas de compuestos estrechamente relacionados. También es frecuentemente utilizada como un procedimiento de purificación final. A diferencia de la cromatografía líquida de mediana presión, las partículas de la fase estacionaria en HPLC son de 5-30 μm y consecuentemente permite una separación con mayor eficacia. La mayoría de las separaciones se han realizado en paquetes de sílica de octilsilano con detección de índice de refracción por otro lado, las mezclas más utilizadas como solventes de elución son metanol-agua o acetonitrilo-agua.^(10, 42, 43)

Se tiene reportes de que se han llevado a cabo varias separaciones exitosas con la fase móvil acetonitrilo-agua usando UV. Es preferible el acetonitrilo que el

metanol por su baja absorción de UV. Las separaciones se realizan principalmente en columnas de octilsilano (C8) y octadecilsilano (C18), los cuales son fases reversas ^(42, 43)

Los detectores empleados en HPLC se han diseñado, adaptado y perfeccionado con el fin de incorporar celdas de flujo que permitan medir las bajas concentraciones de analito que hay en el líquido.^(42, 43)

- Detector de absorción UV-Vis

El flujo de líquido que sale de la columna pasa a través de una pequeña celda, de pequeño volumen (entre 1 a 10 μL), para minimizar el ensanchamiento de banda. La medida de la absorbancia del líquido que la atraviesa en función del tiempo constituye el cromatograma. Su límite de detección oscila entre 0,1 y 1 ng y puede emplearse en cromatografía de elución en gradiente.^(30, 41)

- Detector de índice de refracción

En este caso miden una propiedad de la disolución, como es la variación en su índice de refracción como consecuencia de la presencia de un soluto.

Este tipo de detectores constan de una cubeta con dos compartimentos separados por una placa de vidrio, por uno de los cuales solamente pasa fase móvil, como referencia, y por el otro pasa el eluato que abandona la columna y que contiene la muestra. Sobre la cubeta se irradia un haz de luz que se desvía cuando la muestra aparece en el líquido eluido de la columna.^(30, 35)

Son detectores universales y no dependen del caudal de fase móvil. Sin embargo, no pueden emplearse en elución con gradiente, sus medidas se ven afectadas por los cambios de temperatura y no son tan sensibles. Su límite de detección se sitúa entre 100 y 1.000 ng.^(42, 43)

- Detector Infrarrojo:

Además de las bandas de absorción características de las sustancias esteroidales, las saponinas y sapogeninas esteroidales presentan varias bandas originadas por tensiones C-O de los anillos pirano y furano, localizadas alrededor de 850, 900, 920 y 987 cm^{-1} . Por otro lado, la intensidad relativa entre las bandas a 900 y 920 cm^{-1} permite determinar la estereoquímica del carbono 25. De acuerdo con esto si la banda a 900 es más intensa que la de 920 cm^{-1} , la configuración del carbono 25

es R, y en el caso inverso es S. Algunos procedimientos para la detección y valoración de sapogeninas esteroidales se basan en estas bandas de absorción.(30, 35)

- Detector de espectrometría de masas:

Las sapogeninas esteroidales presentan espectros de masas 70 eV, en los cuales pueden apreciarse el ión molecular y los fragmentos m/z: 115 y 139, donde uno de estos corresponde al pico base del espectro. Para las saponinas esteroidales se utilizan actualmente técnicas de Espectrometría de masas con ionización suave como Desorción de Campo (FD) y Bombardeo con Átomos Rápidos (FAB) las cuales permiten además de conocer el peso molecular, establecer los carbohidratos ligados.(30, 35)

- Detector evaporativo Light Scattering (ELSD):

Es ideal para la detección de analitos que no tienen grupos cromóforos, ya que no se basa en la absorción óptica. Está diseñado para muestras no volátiles o donde se requieren solventes de alto punto de ebullición.⁽⁴⁴⁾

- Detector de Resonancia Magnética Nuclear:

Las sapogeninas esteroidales pueden reconocerse en sus espectros de Resonancia Magnética Protónica por las señales de los protones localizados sobre los carbonos unidos a átomos de oxígeno como son: C-16, C-3, C-26, C-18 y C-19. La señal del protón 16 aparece alrededor de 4.5 ppm en forma de un cuartete. La señal del protón 3 aparece alrededor de 3.5 ppm cuando en el carbono 3 existe un grupo hidroxilo. Los protones del C-26 resuenan en 3.3-4.0 ppm (H-26 ecuatorial dd, J=10 y 2-3 Hz; H26 axial dd, J=10 y 10 Hz). Los protones del metilo-18 resuenan como un singlete en 0.7-0.8 ppm y los del metilo-19 en 0.9-1.2 ppm, también en forma de singlete.(41) El desplazamiento químico de los protones de los metilos 21 y 27 depende de la estereoquímica del C-25. Así, estos resuenan como dobletes (J=7 hz) alrededor de 1.08 y 0.98 ppm respectivamente en isómeros 25S, mientras que en los isómeros 25R resuenan en 0.96 y 0.78 ppm respectivamente.⁽³⁰⁾

En los espectros de Resonancia Magnética de Carbono-13, se aprecian las señales de los carbonos 16, 22, 25, 26 y 27, alrededor de 80, 110, 30, 65 y 17, respectivamente. En el caso del isómero 25S los carbonos C-25, C-26 y C-27 resuenan alrededor de 27, 65 y 16 ppm respectivamente, mientras que en el

isómero 25R resuenan alrededor de 30, 67 y 17 ppm, respectivamente. Los carbohidratos ligados presentan espectros característicos.⁽³⁰⁾

Debido a que esta última técnica de análisis permite asignaciones estructurales finas, es muy utilizada actualmente, especialmente en experimentos heteronucleares, como HMBC y HMQC.⁽³⁰⁾

Materiales y Métodos

3. Materiales y métodos.

3.1 Diseño metodológico

3.1.1. Tipo de estudio

Se desarrolló una revisión sistemática cualitativa, a través de un estudio de tipo prospectivo, descriptivo y analítico, con el propósito de valorar las metodologías de cuantificación de saponinas esteroidales, y sus correspondientes sapogeninas, con vistas a definir las técnicas analíticas adecuadas para su determinación en los extractos obtenidos de *Agave brittoniana* Trell.

3.1.2. Universo y muestra

La búsqueda de información se realizó en las bases de datos electrónicas, tanto a texto completo como de datos referenciales PubMed, Redalyc, Scielo y Google académico, según las siguientes categorías de búsqueda: revisión sistemática, métodos de identificación, métodos de cuantificación, cromatografía, espectrofotometría, combinados con las palabras saponinas esteroidales.

La investigación se enfocó en estudios originales publicados en revistas científicas, tesis de doctorados, maestrías y titulación, reportes de investigación, indexadas durante el periodo 2000 – 2021 sobre la determinación cualitativa y cuantitativa de las saponinas esteroidales y sus sapogeninas. Se revisaron exhaustivamente las metodologías descritas, con un enfoque cronológico, enfatizando en las técnicas descritas.

3.1.3 Variables

Las principales variables estudiadas (Tabla 3) se obtuvieron directamente de las publicaciones seleccionadas para el estudio.

Tabla 3. Principales variables empleadas en el estudio.

VARIABLE/Tipo	DESCRIPCIÓN
Año de publicación	2021 2020-2016 2015-2011 2010-2006 2005-2000
Tipo de muestra	Hojas Flores Frutos Tallos Raíces Extractos
Tipo de extracto	etanol agua n-butanólico
Objetivo del análisis	Cualitativo Cuantitativo
Método analítico cualitativo	Espuma Hemolisis Otro
Método analítico de cuantificación	Métodos espectrofotométricos Métodos cromatográficos
Analito objeto de estudio	Azúcares Saponinas Sapogeninas
Técnica analítica	Espectroscopía UV-Vis indirecta Cromatografía de capa delgada CLAE o HPLC

3.1.4 Métodos, técnicas e instrumentos

Se realizó una revisión estructurada de artículos científicos de origen primario publicados en revistas indexadas en las bases de datos electrónicas PubMed, Redalyc, Scielo y Google académico.

La búsqueda, identificación y selección de los artículos científicos se realizó mediante el procedimiento descrito a continuación:

Se eligió la mayor cantidad de artículos primarios publicados en idioma inglés y español en las bases de datos PubMed, Redalyc, Scielo y Google académico. Estas bases de datos recopilan revistas científicas indexadas con publicaciones en el área de la determinación cualitativa y cuantitativa de las saponinas esteroidales y sus sapogeninas. La pesquisa se ejecutó mediante la búsqueda de métodos de identificación, métodos de cuantificación, cromatografía, espectrofotometría,

combinados con las palabras saponinas esteroidales y la creación de un dúo de expertos (autor y tutor) que leyeron de forma independiente y seleccionaron los estudios que estimaron más representativos en cada caso y actuaron como revisores independientes en la selección de los artículos.

Se excluyeron trabajos en cualquier otro idioma.

3.1.5 Selección de artículos potenciales

La selección de las publicaciones se desarrolló tomando en consideración los criterios de inclusión previamente establecidos. A continuación se ejecutó la lectura del título y del abstract o resumen de cada uno de las publicaciones seleccionadas. Finalmente los documentos fueron leídos de forma íntegra, y seleccionados aquellos referidos a métodos de identificación, métodos de cuantificación, cromatografía, espectrofotometría, combinados con las palabras saponinas esteroidales.

3.1.6 Extracción de datos de los artículos primarios

Asimismo, la extracción de los datos a partir de las publicaciones estuvo a cargo de dos revisores, con vistas a garantizar la confiabilidad de los resultados reportados⁽⁴⁵⁾

La información extraída de cada una de las publicaciones seleccionadas se registró en bases de datos elaboradas en el programa Microsoft Excel (versión 2007).

3.2 Análisis de los resultados

En este trabajo, los resultados se presentan mediante resúmenes de la información obtenida. Dichos resultados fueron obtenidos a través de una metodología sistemática y reproducible.

La interpretación de los resultados conllevó una discusión sobre las limitaciones del estudio y los posibles sesgos. Adicionalmente, se discutió sobre la solidez metodológica de los resultados y su aplicabilidad, junto con recomendaciones para la ejecución de estudios de cuantificación de saponinas y sapogeninas en el futuro.

Resultados y Discusión

4. Resultados y discusión.

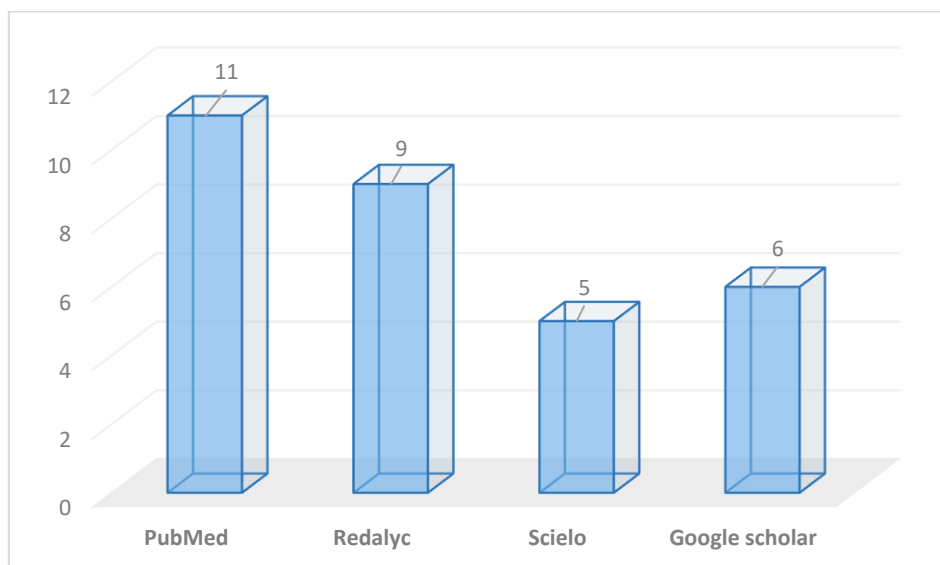
Sobre la base de la búsqueda realizada, referida a métodos de identificación, métodos de cuantificación, cromatografía, espectrofotometría, combinados con las palabras saponinas esteroidales, y teniendo en cuenta los criterios de inclusión, se identificaron las publicaciones potenciales.

4.1. Identificación y selección de publicaciones.

La estrategia de búsqueda se asentó en las siguientes bases de datos electrónicas, tanto a texto completo como de datos referenciales. PubMed, Redalyc, Scielo y Google académico, según las categorías de búsqueda: definidas.

La cobertura temporal de la búsqueda abarcó desde enero del 2000 hasta septiembre del 2021.

La búsqueda realizada en las bases de datos electrónicas, según los criterios de inclusión definidos, permitió elegir 31 publicaciones del total de la bibliografía consultada (tabla 4). Las mismas fueron seleccionadas como sigue: 11 de PubMed (35,48 %), 9 de Redalyc (29,03 %), 5 de Scielo (16,13 %) y 6 de Google scholar (19,35 %). Los resultados se muestran en la figura 5.



Fuente: Matriz de revisión bibliográfica
Elaborado por: Autora

Figura 5. Distribución de las publicaciones seleccionadas según la base de datos electrónica utilizada.

Tabla 4: Matriz resumen de artículos científicos seleccionados.

No.	Autor principal/ Año publicación	Idioma	Título	Revista / Tesis	País	
1.	Geng, P 2021	Inglés	Classification of structural characteristics facilitate identifying steroidal saponins in <i>Alliums</i> using ultra-high performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry	<i>Food chemistry</i>	EEUU	(46)
2.	Yasmeen, S 2020	Inglés	Quantification of Protodioscin in <i>Tribulus terrestris</i> . Spray Dried Extract by RP-HPLC Diode Array Detection	<i>Latin American Journal of Pharmacy</i>	Pakistan	(47)
3.	Yuan, B 2020	Inglés	Simultaneous quantification of polyphenols, glycoalkaloids and saponins in African nightshade leaves using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with acid assisted hydrolysis and multivariate analysis	<i>Food chemistry</i>	EEUU	(48)
4.	Król-Kogus B 2020	Inglés	Qualitative and quantitative HPLC-ELSD-ESI-MS analysis of steroidal saponins in <i>fenugreek seed</i>	<i>Journal Acta Pharmaceutica</i>	Polonia	(49)
5.	Prithvi P 2020	Inglés	Qualitative and quantitative determination of steroidal saponins in <i>Trillium govanianum</i> by UHPLC-QTOF-MS/MS and UHPLC-ELSD	<i>Journals Phytochemical Analysis</i>	Paris	(50)
6.	Tenon, M 2017	Inglés	Rapid, cost-effective and accurate quantification of <i>Yucca schidigera</i> Roetzl. steroidal saponins using HPLC-ELSD method	<i>Journal Food Chemistry</i>	China	(44)

Tabla 4: Matriz resumen de artículos científicos seleccionados. (Continuación)

No.	Autor principal/ Año publicación	Idioma	Título	Revista / Tesis	País	
7.	Rodríguez Baquerizo, JE 2017	Español	Determinación y cuantificación de saponinas en las hojas de la <i>cabuya (furcraea andina)</i> para su posible uso como tensoactivo en detergentes biodegradables	<i>Tesis de Grado/Universidad de Guayaquil</i>	Ecuador	(51)
8.	Quillay Dávila, MA 2017	Español	Contenido de saponinas y actividad cicatrizante de <i>Cecropia peltata</i> y <i>Parthenium hysterophorus</i>	<i>Revista Cubana de Farmacia</i>	Cuba	(52)
9.	Mena Valdés, L 2015	Inglés	Determination of saponins and others secondary metabolites in aqueous extracts of <i>Sapindus saponaria</i> L. (jaboncillo)	<i>Revista Cubana de Plantas Medicinales</i>	Cuba	(53)
10.	Hernandez Guzman, AC 2014	Español	Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala	<i>Tesis de Grado/Universidad de San Carlos</i>	Guatemala	(54)
11.	Upadhyay, S 2014	Inglés	De novo leaf and root transcriptome analysis identified novel genes involved in Steroidal sapogenin biosynthesis in <i>Asparagus racemosus</i>	<i>Journal BMC Genomics</i>	Pakistan	(55)
12.	Portilla Segura, A 2014	Español	Extracción y cuantificación de saponinas de <i>amole (sicyos deppei g.)</i> para la elaboración de jabón ecológico	<i>Tesis profesional/Benemérita Universidad Autónoma de Puebla</i>	México	(56)

Tabla 4: Matriz resumen de artículos científicos seleccionados. (Continuación)

No.	Autor principal/ Año publicación	Idioma	Título	Revista / Tesis	País	
13.	Guzmán, BC 2013	Español	Cuantificación de saponinas en muestras de <i>cañihua chenopodium pallidicaule aellen</i>	<i>Revista Boliviana de Química</i>	Bolivia	(57)
14.	Siller Juárez, DF 2012	Español	Extracción y purificación de saponinas del residuo del <i>Agave lechuguilla Torrey (guishe)</i> y su aplicación potencial	<i>Tesis de Grado/Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro</i>	México	(58)
15.	Benavides, OL 2012	Inglés	Sapogenins Quantification of Fresh and Fermented Juice of <i>Fique (Furcraea gigantea)</i> by HighPerformance Liquid Chromatography (HPLC-PDA)	<i>Journal Información Tecnológica</i>	Colombia	(59)
16.	Lozano, M 2012	Español	Cuantificación de saponinas en residuos de <i>quinua real</i>	<i>Revista boliviana de química</i>	Bolivia	(60)
17.	Rojas Avalos, AS 2011	Español	Cuantificación por espectrofotometría UV/Vis de las saponinas contenidas en el episperma de la especie <i>Chenopodium quinoa willd</i> (Quinoa) procedente de la provincia de Santogo-La libertad	<i>Trabajo de Investigación Tipo 1</i>	Perú	(61)
18.	Kowalczyk, M 2011	Inglés	Qualitative and Quantitative Analysis of Steroidal Saponins in Crude Extract and Bark Powder of <i>Yucca schidigera Roetzl.</i>	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>	Polonia	(62)

Tabla 4: Matriz resumen de artículos científicos seleccionados. (Continuación)

No.	Autor principal/ Año publicación	Idioma	Título	Revista / Tesis	País	
19.	Zhang, T 2010	Inglés	Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from <i>Paris polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i> and <i>P. polyphylla</i> var. <i>chinensis</i> by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry	<i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</i>	China	(63)
20.	Shuli Man 2010	Inglés	Qualitative and quantitative determination of major saponins in <i>Paris</i> and <i>Trillium</i> by HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS	<i>Journal of Chromatography B</i>	China	(64)
21.	Alexandre S 2010	Ingles	Steroidal saponins from <i>Yucca gloriosa</i> L. rhizomes: LC-MS profiling, isolation and quantitative determination	<i>Journal Phytochemistry</i>	Italia	(65)
	X. X. Liu 2009	Ingles	Simultaneous Analysis of Eight Bioactive Steroidal Saponins in Gongxuening Capsules by HPLC-ELSD and HPLC-MS	<i>Akjournal Acta Chromatographica</i>	China	(66)
22.	Xiao-Xiao Liu 2008	Inglés	Simultaneous quantification of both triterpenoid and steroidal saponins in various <i>Yunnan Baiyao</i> preparations using HPLC-UV and HPLC-MS	<i>Journal Separation Science</i>	China	(67)
23.	Paredes Muriño, HF 2007	Español	Identificación y cuantificación de las saponinas contenidas en el fruto de la especie <i>Cucumis dipsaceus</i> por Cromatografía de Líquida de alta Resolución (HPLC)	<i>Tesis de Grado/Universida Nacional de Trujillo</i>	Perú	(68)

Tabla 4: Matriz resumen de artículos científicos seleccionados. (Continuación)

No.	Autor principal/ Año publicación	Idioma	Título	Revista / Tesis	País	
24.	Ahn, MJ 2005	Inglés	Identification and quantification of steroidal saponins in polygonatum species by HPLC/ESI/MS	<i>Journal of Pharmaceutical Sciences</i>	Korea	(69)
25.	Guerra León, JO 2005	Español	Uso de nuevas técnicas espectroscópicas en la elucidación estructural de moléculas complejas. <i>saponinas esteroidales del agave brittoniana t</i>	<i>Revista Cubana de Química</i>	Cuba	(70)
26.	Hernández SR 2004	Español	Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de <i>Agave lechuguilla torrey</i>	<i>Red de Revistas Científicas de América Latina</i>	México	(71)
27.	Teresa R 2003	Inglés	Evaluation of sapogenin contents in native yam varieties (<i>dioscorea spp.</i>) from Colombian Cordoba University collection.	<i>Journal Cienc. Quim. Farm</i>	Colombia	(72)
28.	Lurssen Cardova, LM 2001	Español	Cuantificación de saponinas esteroidales en <i>Yucca Elephantipes</i> (flor de izote)	<i>Tesis de Grado/Universidad de San Carlos</i>	Guatemala	(73)
29.	López Fuentes, GL 2000	Español	Cuantificación de sapogeninas esteroidales en <i>Phytolacca icosandra L</i> (saquichá)	<i>Tesis de Grado/Universidad de San Carlos</i>	Guatemala	(74)
30.	Quevedo Campos, MN 2000	Español	Cuantificación de sapogeninas esteroidales en muestras de <i>Sapindus saponaria</i>	<i>Tesis de Grado/Universidad de San Carlos</i>	Guatemala	(75)

La pesquisa ejecutada para la elección de bibliografía en las bases de datos electrónicas mencionadas, se basó en la búsqueda de una temática bien definida, a través de las palabras: métodos de identificación, métodos de cuantificación, cromatografía, espectrofotometría; combinadas con los vocablos saponinas esteroidales y/o sapogeninas esteroidales. Este hecho limitó el número de publicaciones disponibles pero las elegidas (tabla 4) ofrecen información suficiente para obtener la información requerida para el desarrollo de la investigación.

La información extraída de cada uno de los artículos seleccionados se registró en una base de datos elaborada con el programa Microsoft Excel versión 365.

4.2 Descripción de las publicaciones seleccionadas según las variables en estudio

Basado en las publicaciones seleccionadas, que se listan en la tabla 4 ⁽⁴⁴⁻⁷⁴⁾, se realizó el análisis de las variables definidas (tabla 3).

En relación con la variable *año de publicación*, la revisión de la literatura publicada, con respecto a la determinación cualitativa y cuantitativa de las saponinas esteroidales y sus sapogeninas, demuestra que son metabolitos secundarios de gran interés por las diversas propiedades farmacológicas que se le atribuyen. ^(53, 72, 74, 75)

Las publicaciones seleccionadas para el estudio abarcan un intervalo de tiempo entre 2000 y 2021. En la tabla 5 se muestra la distribución de las publicaciones según el año, referidas según intervalos de cinco años.

Tabla 5: Distribución de las publicaciones seleccionadas según el año de publicación

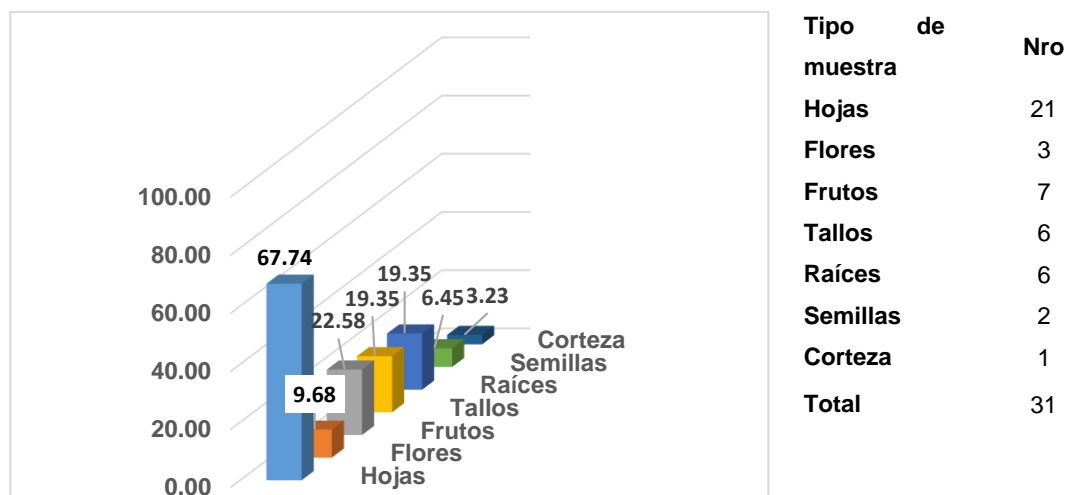
Año publicación	Nro	Porcentaje
2021-2016	8	25.81
2011-2015	10	32.26
2006-2010	6	19.35
2005-2000	7	22.58
Total	31	100,00

Fuente: Matriz de revisión bibliográfica
Elaborado por: Autoras

Como se puede observar, el 58,07 % se corresponde con bibliografía publicada en la última década, de ellas el 44,44 % se publicaron en el último quinquenio.

El análisis de las publicaciones seleccionadas, con esta distribución según el intervalo de años, permitió obtener criterios acerca de la evolución de las metodologías analíticas para la identificación y la cuantificación de las saponinas esteroidales y sus sapogeninas.

En relación con la variable *tipo de muestra*, se tuvo en cuenta el órgano o parte de la planta que contenía a las saponinas esteroidales, según se reportó en las publicaciones consultadas (Figura 6)



Fuente: Matriz de revisión bibliográfica
Elaborado por: Autora

Figura 6: Distribución de las saponinas esteroidales según los órganos o partes de las plantas que la contiene, en las publicaciones seleccionadas.

La revisión llevada a cabo, en las 31 publicaciones elegidas, arrojó que la presencia de saponinas esteroidales en las hojas es mayoritaria, apareciendo descritas en el 67,74 % de las mismas.(8, 13, 31)

Adicionalmente, se detectaron en frutos (22,58 %), tallos y hojas, con un 19,35 % de aparición respectivamente.

Son menos frecuente de encontrar en semillas y cortezas de las plantas.

Las saponinas esteroidales no son exclusivas de un determinado órgano de la planta, con frecuencia se encuentran de forma simultánea en varias partes de la especie. Ejemplo de ellos es la planta Flor de izote donde se encuentran en flores, tallos y hojas ⁽⁷³⁾; en la *Sapindus saponaria* se encuentran presentes en frutos y tallos ⁽⁷⁵⁾; hojas tallos y fruto ⁽⁷⁴⁾.

Estos resultados permiten confirmar que las saponinas esteroidales pueden estar presentes en diferentes partes u órganos de las plantas.

En la relación con la variable objetivo del análisis, se puede observar que tanto la identificación cualitativa como la determinación cuantitativa, tienen igual prevalencia en las investigaciones (Tabla 6).

Tabla 6: Técnicas de identificación cualitativa y de determinación cuantitativa de saponinas esteroidales o sus porciones, en las publicaciones seleccionadas.

Análisis cualitativo			Análisis cuantitativo		
Método	nro.	%	Método	nro.	%
Espuma	21	67,74	Hemólisis	5	16,13
Hemólisis	5	16,13	Gravimetría	2	6,45
CCP	4	12,90	Espectrofotometría UV-Vis	10	32,26
RMN	1	3,23	HPCL	15	48,39
IR	1	3,23			
MS	10	32,26			
CG-MS	1	3,23			
Total publicaciones	31	100,00	Total publicaciones	31	100,00

Leyenda: CCD: cromatografía de capa delgada; IR: espectroscopía infrarroja; RMN resonancia magnética nuclear MS: espectroscopía de masa; CG-MS: cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masa; UV-Vis: espectrofotometría ultravioleta- visible; HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.

Fuente: Matriz de revisión bibliográfica

Elaborado por: Autora

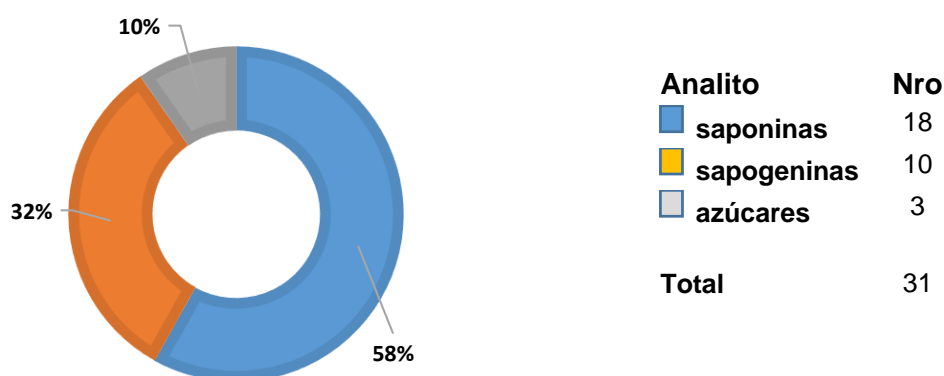
Hasta hace dos décadas, la metodología de identificación se basaba principalmente en la formación de espuma (67,74 % de las publicaciones en estudio), y en la actualidad continúa teniendo aplicación.

Dada la importancia de determinar la presencia de saponinas esteroidales, se han desarrollado técnicas analíticas más específicas, como: cromatografía de capa delgada (CCD) 4 artículos (12,90 %); espectroscopía infrarroja (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN) con un reporte cada uno (3,23 %). La espectroscopía de masa (MS) es de las más empleadas en la actualidad, reportándose en 10 de las publicaciones analizadas, que representan el 32,26 %. También se encontró la identificación cualitativa de saponinas con el empleo de cromatografía de gases acoplada a masa (CG-MS). Las técnicas IR, RMN y MS son capaces de dilucidar las estructuras químicas de las moléculas de saponinas que se investigan.

Por su parte, la determinación cuantitativa, en sus inicios, se basaba en la determinación del índice de hemólisis. Con la evolución del instrumental de laboratorio, las técnicas de cuantificación también se han ido desarrollando.

En la actualidad, se cuenta con metodologías analíticas más sensibles, específicas y exactas, que permiten la detección y cuantificación de saponinas esteroidales y sus sapogeninas, en matrices complejas. Entre ellas podemos mencionar: espectrofotometría UV visible (UV-Vis) ⁽⁷⁶⁾; y cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE o HPLC, según sus siglas en inglés), quien acoplada a detectores UV-Vis (HPLC-UV-Vis), índice de refracción (HPLC-RI), espectrometría de masas (HPLC-MS), evaporativo de dispersión de luz (HPLC-ELSD), ionización por electropulverización (HPLC-ESI). Se pueden alcanzar límite de cuantificación bajos cuando utilizamos HPLC con el detector adecuado.

En el análisis del *analito objeto de estudio* comprobamos que las técnicas de cuantificación pueden estar focalizadas hacia las saponinas como tal, o cuantificar sus sapogeninas y azúcares.



Fuente: Matriz de revisión bibliográfica
Elaborado por: Autora

Figura 7: Distribución de los tipos de analitos que se determinan, en las publicaciones seleccionadas.

Como se puede observar en la figura 7, el 58 % de las publicaciones analizadas cuantifican las saponinas en base su estructura como tal; mientras que el 42 % las cuantifica en bases a sus porciones: sapogeninas (32 %) o azúcares (10 %).

Las *técnicas analíticas* empleadas para la cuantificación se resumen en la tabla 7. Se puede observar que las técnicas más empleadas son Espectrofotometría UV-Vis indirecta y HPLC

Tabla 7: Técnicas de determinación cuantitativa de saponinas esteroidales o sus porciones, en las publicaciones seleccionadas.

Técnicas analíticas de cuantificación	Nro.	%
Espectrofotometría UV-Vis indirecta	10	32,26
Cromatografía de capa delgada	5	16,13
HPLC	15	48,39
Total publicaciones	31	100,00

Fuente: Matriz de revisión bibliográfica

Elaborado por: Autora

- **Descripción de las técnicas analíticas:**

- Espectrofotometría UV-Vis:

a) Método de Baccou: Este método se basa en el uso de un reactivo consistente en ácido sulfúrico concentrado (1 mL); anisaldehído (0,5 mL) y ácido acético (5 mL) para relevar esteroides y particularmente sapogeninas, después de su separación por cromatografía en capa fina. Sin embargo, como la mezcla es inestable y rápidamente desarrolla un color rojo oscuro no es aplicable a espectrofotometría, Baccou, sugirió: a) 0,4 ml de anisaldehído además de 99,5 ml de acetato de etilo y B) ácido sulfúrico. El reactivo A estable; el ácido sulfúrico concentrado es posible diluirlo en el mismo volumen de acetato de etilo dando lugar al reactivo c) 50 ml de ácido sulfúrico concentrado y 50 ml de acetato de etilo. Para la determinación de sapogeninas por este método, se colocan 0-40 µg de saponina esteroideal y se disuelve en 2 ml de acetato de etilo y se adicionan 1ml del reactivo A y un ml del reactivo c, después de mezclar, se coloca el tubo en baño María a 60°C por 20 min, enseguida se enfría por 10 minutos en baño de agua a temperatura ambiente y se mide absorbancia a 430 nm. ⁽⁷³⁻⁷⁵⁾

Gloria. L. I, et al (2000)⁽⁷⁴⁾, aplican el método para la determinación de las saponinas esteroidales de *Phytolacca icosandra* L, que fueron aisladas mediante cromatografía en capa fina y cuantificadas espectrofotométricamente, haciendo reacciones de coloración con anisaldehído, ácido sulfúrico y acetato de etilo; lo cual origina un cromóforo que presenta un pico único de absorción a 430 nm para todas las

sapogeninas de naturaleza esteroideal. Se demostró que la cantidad de saponinas esteroidales presentes en la planta *Phytolacca icosandra L* (saquichán) es mayor al 0,1 % en las hojas. En conclusión, la cantidad de saponinas esteroidales presentes en la planta fue mayor en las hojas (0,123%) que en el tallo (0,013%) y los frutos (0,06%); lo que se demostró, mediante análisis de varianza, que existen diferencias significativas entre el contenido de saponinas presentes en cada una de las partes de la planta analizada.

Lilian M.L et al (2001)⁽⁷³⁾, con el fin de determinar si la planta *Yucca elephantipes (flor de izote)* posee saponinas esteroidales en un porcentaje mayor al 0,1% y así evaluar si dicha especie pudiese constituir fuente potencial de materia prima para la síntesis de hormonas sexuales, cortisona, esteroides, diuréticos, vitamina D y heterósidos cardiacos; realizó diferentes ensayos y métodos para la determinación de dichos metabolitos. Realizó el método espectrofotométrico descrito por Baccou, como resultado encontró que tanto las flores, el tallo y las hojas de la planta presentan saponinas esteroidales mayores al 0,1 % (flor 10,58 %, tallo 10,28 % y hojas 9,828%), por lo que poseen potencial utilidad como fuente de materia prima.

También fue empleado por Maritza N.Q (2000)⁽⁷⁵⁾, quien determinó el contenido de saponinas esteroidales en las muestras de frutos de la planta *Sapindus saponaria*; demostrando que las muestras analizadas contienen un porcentaje mayor al 0,1 % de saponinas esteroidales. La muestra del departamento de Huehuetenango obtuvo mayor concentración de saponinas (3,66%) con respecto a la muestra proveniente de Santa Rosa (1,62%).

La cuantificación de las saponinas esteroidales (ergosterol, estigmasterol y diosgenina) fue realizada por Astrid C, Virginia J. et al (2014)⁽⁵⁴⁾ por el método propuesto por Baccou y colaboradores en 1977 para *Byrsonima crassifolia* 1,78%±0,222%, *Bixa orellana* 0,80%±0,04%, *Lippia graveolens* 0,21%±0,06%, *Litsea guatemalensis* 3,19%±0,10%, *Petiveria alliacea* 0,92%±0,04%, *Phlebodium pseudoaureum* 1,06%±0,05%, *Smilax domingensis* 0,21%±0,006% y *Solanum nigrescens* 1,42%±0,007%.

b) Método de Lieberman-Burchard: se basa en hacer reaccionar las saponinas esteroideas con el reactivo de Lieberman-Burchard, que consiste en una mezcla de 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, se enfrían a 0°C y se añade una gota de ácido sulfúrico concentrado. La prueba es positiva para esteroides cuando hay formación de productos coloreados.^(57, 75)

Blanca G, Dora L. Cruz (2013)⁽⁵⁷⁾, realizaron la cuantificación de saponinas en extractos acuosos de 15 muestras de *cañihua* (*Chenopodium pallidicaule* A), dos muestras adicionales, una muestra de *quinua* (*Chenopodium quinoa*) y otra de una especie reportada por su alto contenido de saponina denominada quentu (*Rumex acetosella*). Para la determinación y cuantificación de saponinas en las muestras emplearon el método de Lieberman-Burchard. La cuantificación espectrofotométrica permitió establecer que las muestras contienen una apreciable cantidad de saponinas.

Maribel L. Col. (2012)⁽⁶⁰⁾, en su trabajo realizó la cuantificación del rendimiento de extractos y de saponinas en residuos de escarificado generados en empresas exportadoras de quinua en Bolivia. El porcentaje de saponinas determinado utilizando espectrofotometría UV-Vis siguiendo el protocolo establecido por Monje y Raffailac en el cual se hace uso de la adición del reactivo de Lieberman-Burchard y lo compararon con el método desarrollado por cromatografía HPLC con detector DAD y utilizando una columna RP C18; observándose que no hay grandes diferencias entre los resultados cuantitativos de ambos métodos.

- HPLC:

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es un método analítico que identifica los componentes de mezclas compuestas o compuestos. Esta tecnología fue desarrollada en la década de 1980 con el desarrollo de programas y distintos tipos de columnas utilizadas para el análisis complejo. Es muy empleada para el estudio y desarrollo de productos en industrias como la farmacéutica, ambiental, alimenticia, de bebidas y energía.

Los instrumentos de HPLC pueden funcionar con distintos detectores y programas.

a) HPLC con detector UV-Vis:

Los detectores ultravioletas (UV) son económicos y populares. Es principalmente utilizado en las ciencias biomédica y farmacéutica para separar e identificar los principales componentes activos de una mezcla.

Este tipo de detector responde a sustancias que absorben luz, no pueden utilizarse para probar sustancias bajas en cromóforos (incolores o prácticamente incolores). Los detectores de UV son los más versátiles, ya que cuentan con la mayor sensibilidad y linealidad.^(47, 67, 76)

Sidra Y. et al (2020)⁽⁴⁷⁾, cuantificaron la saponina esteroideal denominada protodioscina del extracto seco por pulverización de *T. terrestris* mediante el método de HPLC de fase inversa junto con el detector UV. El sistema disolvente estaba compuesto de agua y acetonitrilo. Usó una elución en gradiente para la separación del biomarcador a 200 nm y a un caudal de 1,0 mL/min. La separación la realizaron usando una columna C18 y una temperatura de 40 °C. El método fue validado según las pautas de ICH para precisión, exactitud, recuperación y reproducibilidad, seguridad y robustez por las pautas CPMP/ICH/381/95. Encontraron que el contenido de protodioscina era del 1,06% en comparación con el estándar.

Xiao-Xiao Liu, et al (2008)⁽⁶⁷⁾, desarrollaron por primera vez un método de HPLC para el análisis cuantitativo simultáneo de trece saponinas, incluidas cinco saponinas triterpenoides y ocho saponinas esteroides, en una serie de preparaciones tales como: polvo, cápsulas, aerosol, pasta de dientes, yeso y venda adhesiva. La separación por HPLC se realizó en una columna de fase inversa Shim-pack C18 en modo de gradiente con detección UV a 203 nm. Todas las curvas de calibración mostraron una buena regresión lineal ($r^2 \geq 0,9981$) dentro de los rangos de prueba. La precisión y repetibilidad de los métodos fue mejor que 4,22 y 4,78%, respectivamente.

b) HPLC con detector UV-MS:

Este instrumento forma uno de los mejores conjuntos analíticos. El HPLC-MS es el detector más potente. Tiene particularmente relevancia dentro del ámbito de la ciencia médica y es ampliamente utilizado en laboratorios farmacéuticos y en la investigación y el desarrollo. El principal beneficio del HPLC-MS es su capacidad de analizar y proporcionar la identidad molecular de un amplio rango de componentes. ^(63, 64)

Usualmente, se emplean métodos analíticos de cuantificación por HPLC, donde se combinan varios tipos de detectores.

Ting Zhang, et al (2010)⁽⁶³⁾, para la identificación y cuantificación simultáneas de saponinas esteroidales en los rizomas de *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* y *P. polyphylla* var. *chinensis*, utilizaron HPLC junto con la MS en tándem de múltiples etapas de ionización por electrospray (HPLC-ESI-MSn) y la detección MS de triple cuadrupolo (HPLC-ESI-MS/MS), respectivamente. Los experimentos de HPLC se realizaron mediante una columna C-18 de fase inversa y un sistema de fase móvil binaria que consta de ácido fórmico acuoso al 0,1% y acetonitrilo en condiciones de elución en gradiente. Los patrones de fragmentación característicos de las saponinas esteroides de tipo diosgenina y pennogenina se investigaron utilizando ESI-MSn en modo de iones negativos. Como resultado, se determinaron 17 saponinas en *P. polyphylla* var. *yunnanensis* y *P. polyphylla* var. *chinensis*, respectivamente, incluidos cuatro compuestos desconocidos. El método HPLC-ESI-MS/MS desarrollado fue validado y se encontró satisfactoriamente lineal, selectivo y robusto.

Shuli Man, et al (2020)⁽⁶⁴⁾, HPLC-ELSD y HPLC -ESI, para identificar y cuantificar las saponinas esteroides en las plantas de París y Trillium. El contenido de las saponinas conocidas tales como Paris I, II, III, V, VI, VII, H, gracilina y protodioscina fueron determinadas por HPLC-ELSD y otras 12 saponinas esteroides fueron identificadas por HPLC -ESI, Al final, el procedimiento analítico desarrollado demostró ser un método confiable y rápido para el control de calidad de las plantas de Paris y Trillium

También se emplea cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UHPLC), su alta resolución, en comparación con un HPLC, permite una separación mejor en menor tiempo y mayor precisión. El equipo dispone de dos detectores: uno de ultravioleta-visible, tipo DAD, que permite confirmar las identificaciones, y otro del tipo evaporativo de luz dispersada (ELSD).

Mariusz K, et al (2011)⁽⁶²⁾, cuantificaron mediante UHPLC con detección espectrometría de masas saponinas esteroidales en jarabe de tallo comercial y en extracto de una corteza de *Yucca schidigera*. Se generaron

patrones de fragmentación de saponinas de yuca usando disociación inducida por colisión y se compararon con la fragmentación de patrones auténticos, así como con información específica publicada. Además de la detección de doce saponinas que se sabe que se encuentran en *Y. schidigera*, los datos de fragmentación recopilados llevaron a identificaciones provisionales de siete nuevas saponinas. Se desarrolló y validó un método de cuantificación para los 19 compuestos detectados.

Por su parte, Prithvi P. et al (2020)⁽⁵⁰⁾, para los métodos cualitativos y determinación cuantitativa de saponinas esteroides en *T. govanianum*; desarrollaron un tiempo de vuelo de un método por UHPLC-QTOF-MS/MS y un detector de dispersión de luz evaporativa de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC-ELSD). Los rizomas secos de *T. govanianum* (100 mg) se extrajeron con etanol-agua (80:20; 10 mL) mediante tratamiento ultrasónico durante 30 min a 40 ° C, para la determinación cualitativa y cuantitativa de saponinas esteroides. Se identificaron un total de 24 saponinas; siete de ellos se caracterizaron por comparar con estándares. El método mostró buena linealidad ($R^2 \geq 0,993$), límite de detección (0,92–4,09 $\mu\text{g/mL}$), límite de cuantificación (3,1–13,5 $\mu\text{g/mL}$), precisión [desviaciones estándar relativas (RSD) intradiarias <4,3% y RSD entre días <5,5%] y precisión (84,0-110,3%).

Algunos autores refieren el uso el método gravimétrico para la cuantificación de saponinas esteroidales para estudios farmacológico y toxicológicos^(44, 51), así como para elaboración de productos comerciales.

Mathieu T, et al (2017)⁽⁴⁴⁾, utilizaron la técnica HPLC-ELSD y el método gravimétrico para la cuantificación de las saponinas esteroidales de *Yucca GRAS*.

Para la realización del estudio, se acopló un sistema HPLC (Agilent 1200) y un detector ELSD (G4260). Se utilizó una columna Atlantis® T3 (3,0x 150 mm, 3 μm) (Waters, Irlanda). La fase móvil se compuso de dos soluciones (A y B), donde A corresponde a ácido fórmico al 0,1% (v/v) en agua y B ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (v/v), con el siguiente perfil de gradiente: 0-25 min linealmente desde 98% A hasta 40% A; 25–35 min

linealmente desde 40% A hasta 20% A. La velocidad de flujo se estableció en 0,6 mL/min y la temperatura de la columna se estableció en 25°C. La evaporación y la temperatura del nebulizador del ELSD se establecieron, respectivamente, a 50°C y 40°C.

Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 8.

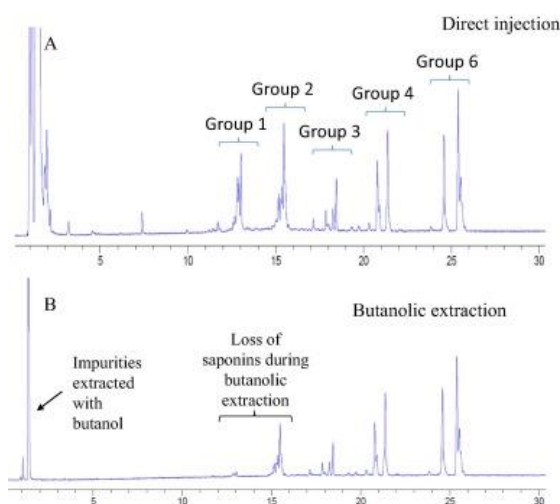


Fig. 8. Cromatograma HPLC/ELSD comparativo entre (A) inyección directa de muestra de *Yucca schidigera* (grupo 1-5 correspondiente a saponinas cuantificadas) y (B) fase butanólica resultante de la extracción por cuantificación gravimétrica.

Llegaron a la conclusión que el método gravimétrico claramente subestima o sobreestima las saponinas, dependiendo de su polaridad, y por lo tanto, no parece ser del todo adecuado para obtener saponinas precisas; mientras que el método de cromatografía líquida junto con el detector ELSD es un método rápido y confiable para la cuantificación de moléculas no cromofóricas, incluidas las saponinas esteroides ⁽⁴⁴⁾

4.3 Propuesta de metodologías para la cuantificación de saponinas esteroidales de *Agave brittoniana* T

El empleo de las plantas con fines terapéuticos mantiene aún una amplia validez. Investigadores de la Facultad de Química y Farmacia, de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y de la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX), de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara (UCM-VC), han estudiado las actividades farmacológicas del *Agave brittoniana* T. Se encontró que

presenta propiedades antiinflamatorias, efecto hipolipémico, antifúngico, entre otras aún en estudio.

El posterior desarrollo de formulaciones con uso farmacéutico, cosmeceútico y nutracéutico, impone contar con técnicas analíticas precisas, confiables y seguras.

Teniendo en cuenta las condiciones de laboratorio de la Facultad de Química y Farmacia, se proponen las siguientes metodologías:

1- HPLC con detección por UV-Vis:

Es un método analítico que permite identificar los componentes de compuestos o mezclas compuestas. La dificultad es la falta de grupos cromóforos detectables por UV en la mayoría de las saponinas.

Se reporta en la bibliografía especializada que se han llevado a cabo varias separaciones exitosas en mezclas que contienen saponinas esteroidales, con la fase móvil acetonitrilo-agua usando detección UV-Vis. Es preferible el acetonitrilo que el metanol por su baja absorción a esas longitudes de onda.

El empleo de ácido fórmico da como resultados compuestos coloreados al reaccionar con los productos de deshidratación de los aglicones.⁽³⁹⁾

Las separaciones se realizan principalmente en columnas de octilsilano (C8) y octadecilsilano (C18).^(42, 43)

La detección se realiza a la longitud de onda a la que se garantice una absorbancia adecuada.

Se propone el empleo de la técnica de HPLC con detector UV-Vis para muestras que requieran una separación mejor en menor tiempo y mayor precisión, por ejemplo, estudios de estabilidad, cuantificación en fluidos biológicos, entre otros.

Propuesta de las condiciones para la corrida cromatográfica son:

- columna C-18 de fase inversa
- fase móvil: un sistema binario que consta de ácido fórmico acuoso al 0,1% y acetonitrilo, que pudiera manejarse en condiciones de elución en gradiente
- flujo de la corrida cromatográfica: 1,0 mL/min.

- Detector UV-Vis

2- Espectofotometría UV-Vis con el empleo del reactivo de Liebermann Burchard:

Debido a que la mayoría de las saponinas esteroidales presenta la falta de grupos cromóforos detectables por UV, se precisa hacerlas reaccionar con el reactivo de Liebermann-Burchard, que consiste en una mezcla de 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, se debe ser enfriada a 0°C, a la que se le añade una gota de ácido sulfúrico concentrado. La reacción de las saponinas con este reactivo provoca la formación de productos coloreados. ⁽⁴⁴⁾

La detección se realiza a la longitud de onda 528 nm, dada la coloración que se obtiene por la reacción entre el reactivo Liebermann Burchard con las saponinas y derivados

Conclusiones

Conclusiones

1. Las metodologías analíticas para la identificación cualitativa y la determinación cuantitativa de saponinas esteroidales están apropiadamente documentadas. La identificación analítica se describe, mayoritariamente, por los índices de espuma y hemólisis. La técnica de cuantificación más actual es HPLC acoplado a diferentes tipos de detectores.
2. Se recomienda para la cuantificación de saponinas esteroidales de *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus*, en muestras que requieran mayor precisión, la técnica de HPLC-UV-VIS empleando columna C-18 y fase móvil: ácido fórmico acuoso y acetonitrilo.
3. Se recomienda para la cuantificación de saponinas esteroidales de *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus*, para análisis que requieran menor precisión la técnica Espectrofotometría UV-Vis con el empleo del reactivo de Liebermann Burchard.

Recomendaciones

Recomendaciones

1. Desarrollar y validar las metodologías propuestas para la cuantificación de saponinas esteroidales de *Agave brittoniana* Trel. spp. Brachypus

Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

1. Mark, W. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. October 2009;161(2):105–21.
2. Martín, D. Evaluación en modelos experimentales del efecto antiinflamatorio de extractos de *Agave brittoniana* Trel. subespecie *Brachypus* [Diploma]. Santa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2016.
3. Pino, G. Estado actual de las Suculentas en el Perú. *Zonas Áridas*. 2006:155.
4. González Elizondo, M. Plantas Medicinales del estado de Durango y zonas aledañas. 2004.
5. Guerra de León, J.O. Compuestos con actividad antiparasitaria del *Agave brittoniana* T. España, Universidad de Cádiz; 2005.
6. Agrawal PK, Jain DC, Gupta RK, Thakur RS. "Carbon-13 spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins". *Phytochemistry*. 1985; 24:2479-96.
7. Contreras García, A. EXTRACCIÓN CUANTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE SAPONINA, 2010.
8. Dueñas Deyá AC. Presencia de saponinas en *Agave* spp 26 May 2016:[2-3 pp.]. Available from: <http://editorialuaie.uaz.edu.mx/index.php/bioz/article/view/108/80>.
9. Kensil CR, Trunch A. Current vaccine adjuvants: an Overview of a diverse class. *Frontiers in Bioscience*. 2004;9.
10. Hostettmann K, Marston A. *Chemistry & Pharmacology of Natural Products: Saponins*. Cambridge University Press, New York, NY. 1995. ISBN 0-521-32970-1.
11. Mad T, Sterk H, Mittelbach M, Rechberger GN. Tadem Mass Spectrometric Analysis of a Complex Triterpene Saonin Mixture of *Chenopodium quinoa* Elsevier Inc Austria: American Society for Mass Spectrometry 2009 [Available from: [http://www.sciencedirect.com-science\(application/pdf Objeto\)](http://www.sciencedirect.com-science(application/pdf Objeto))].
12. Díaz Jiménez L, Ibarra Arellano E, Jiménez López K. Cuantificación de saponinas en ajo genéticamente seleccionado. 15 de abril del 2009 [Available from: www.cio.mx/3-enc-mujer/files/extensos/Sesion%204/S4-BCA05.doc].
13. Pérez de Armas AJ. Estudio fitoquímico de especies nativas de Cuba pertenecientes a la familia Agavaceae y evaluación de sus actividades biológicas. Universidad de Cádiz; 11 marzo del 2018.
14. Skoog DA, Holler FJ, Nieman T. *Principios de Análisis Instrumental*. McGraw Hill, España. 2001.

15. Brignardello Petersen LA, Glick M, Guyatt GH, Azarpazhooh A. A practical approach to evidence-based dentistry: understanding and applying the principles of EBD. *J Am Dent Assoc.* 2014;145(11):1105-7.
16. Letelier MJ, Rada G. Revisión sistemática y metaanálisis: ¿son la mejor evidencia? *Rev Méd* 2005.
17. Rada G, Letelier LM. ¿Podemos mantenernos actualizados en medicina en el siglo XXI? *Rev. méd. Chile* 2009; 137 (5).
18. Carrasco Labra A, Brignardello Petersen R, Glick M, Guyatt GH, Azarpazhooh A. A practical approach to evidence-based dentistry: VI. How to use a systematic review. *Am Dent Assoc.* 2015;146(4).
19. Guyatt G, Richardson S, Jaeschke R. *Guides to the Medical Literature: A Manual for Evidence-Based Clinical Practice.* New York 2008.
20. Higgins J, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* 2011. Available from: www.cochrane-handbook.org.
21. AG M. Los Agaves de México. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe,*. 2007.
22. Zayas AA. Los agaves de las Antillas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 1995; 37-40.
23. Verduzco Martínez J, Predo Rojas CI, Mercado Hernández R. Caracterización e Identificación Taxonómica del Maguey. *Producción y Aprovechamiento del Nopal en el Noreste de México.* 2008.
24. Peña Álvarez A, Díaz L, Medina A, Labastida C, Capella S, Vera LE. Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2004 Feb;1027(1-2).
25. Zayas AA. Los agaves de Cuba Occidental *Revista del Jardín Botánico Nacional.* 1984;5(3):3-16.
26. Cuidados de la planta Agave, Maguey o Pita. *Plantas.* 2017 cited 2019 marzo, 5.
27. Sánchez González C. *Revista Cubana de Farmacia*, 50 años publicando investigaciones sobre plantas y productos medicinales. *Revista cubana de Farmacia.* 2019;52(1):8.
28. Parmar VS, Jha HN, Gupta AK, Prasad AK, Gupta S, Boll PM, Tyagi OD "New Antibacterial Tetratriacontanol Derivatives From Agave americana L. *Philippine Medicinal Plants.* 1992;48(7).
29. Pérez de Armas AJ. Estudio fitoquímico de especies nativas de Cuba pertenecientes a la familia agavaceae y evaluación de sus actividades biológicas. *Universidad de Cádiz* 2011.
30. Osorio MS. *Química de los triterpenos.* Estados Unidos: Washington; 1992.
31. VALENCIA AMMGA. *MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA Y FITOQUÍMICA.* Medellín. 2008.

32. Sharma S, Chhimwal, J., Kumar, S., Padwad, Y., & Kumar, D. Cytotoxic steroidal saponins from *Polygonatum verticillatum* Linn. *Phytochemistry Letters*. 2021;45:30-6.
33. Dewick PM. *Medical natural products a biosynthetic approach*. Second ed: LTD.UK; 2002. 167-241 p.
34. Yang C, Zang Y, Jacob M, Khan S, Zhang Y, Li X. Antifungal activity of C27 steroidal saponins, Antimicrobial and chemotherapy *ASM Journals*. 2006;50(5):1710-4.
35. Martínez Martínez A. *Saponinas esteroidales*. Medellín, Colombia; 05 de Junio de 2001 Recuperado el 14 de Agosto de 2016.
36. Santiesteban Muñoz D. *Evaluación genotóxica de un extracto butanólico de Agave brittoniana T. subsp. Brachypus en ratones Santa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2015.*
37. García Díaz AJ. *Extracción y cuantificación de saponinas esteroidales en una colección de ñames del gran caldas de dioscorea polygonoides por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Universidad Tecnológica de Pereira. 2004.*
38. Hernández R, Lugo E, Díaz L Villanueva S. *Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de Agave Lechuguilla Torrey. Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 2005;3(11)(2).*
39. Hiai S, Oura H, Nkajima T. Reaction of some sapogening and saponin with vainillin and sulfuric acid. *Plantas medicinales* 1997;29:152-3157.
40. Cheok SH, Sulaiman R. Extraction and quantification of saponins. *Food Res Int*. 2014;59:16-40.
41. Kuklinski C. *Farmacognosia*. Primera ed. Barcelona: España; 2000. 146-53 p.
42. Kawasaki T, Miyahara K. Thin layer chromatography of steroid saponins and their derivatives. *Chem Pharm Bull*. 1963;11:1546-50.
43. Combarieu E, Falzoni M, Fuzzati N, Gattesco F, Giori A, Lovati M, Pace R. Identification of *Ruscus* steroidal saponins by HPLC-MS analysis. *Fitoterapia*. 2002;73(7):583-96.
44. Tenon MN, Roller M, Birtić S. Rapid, cost-effective and accurate quantification of *Yucca schidigera* Roezl. steroidal saponins using HPLC-ELSD method. *Journal Food Chemistry*. 2017;221:1245-52.
45. Cascaes da Silva
- F. Escalas y listas de evaluación de la calidad de estudios científicos. *Revista Cubana de Información en Ciencias de la Salud*. 2013;24(3).
46. Geng P. Classification of structural characteristics facilitate identifying steroidal saponins in *Alliums* using ultra-high performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *Food chemistry*. 2021;102.
47. Yasmeen S, Yasmeen S, Khattak S, Sarwar G, Naveed S, Saqib N, Yarajab A, Rehman H. Quantification of Protodioscin in *Tribulus terrestris*. *Spray*

Dried Extract by RP-HPLC Diode Array Detection. Latin American Journal of Pharmacy. 2020;39 (6):1110-5.

48. Yuan B, Dinssa FF, Simon JE, Wu Q. Simultaneous quantification of polyphenols, glycoalkaloids and saponins in African nightshade leaves using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with acid assisted hydrolysis and multivariate analysis. Food chemistry. 2020;312.
49. Król Kogus B, Glód D, Krauze Baranowska M. Qualitative and quantitative HPLC-ELSD-ESI-MS analysis of steroidal saponins in fenugreek seed. Journal Acta Pharmaceutica. 2020;70(1):89-99.
50. Pal Singh P, Singh Bora P, Shivprasad Suresh P, Bhatt V, Sharma U. Qualitative and quantitative determination of steroidal saponins in Trillium govanianum by UHPLC-QTOF-MS/MS and UHPLC-ELSD. Journals Phytochemical Analysis. 2020;31(6):Pages 861-73.
51. Rodríguez Baquerizo JE. Determinación y cuantificación de saponinas en las hojas de la cabuya (*Furcraea andina*) para su posible uso como tensoactivo en detergentes biodegradables. GUAYAQUIL - ECUADOR: GUAYAQUIL; 2017.
52. Quillay Davila MA, Arana Arias YA, Jaramillo Jaramillo CG, Cuenca Buele S, Rojas de Astudillo LL, Jaramillo Alcívar V. Contenido de saponinas y actividad cicatrizante de *Cecropia peltata* y *Parthenium hysterophorus*. Revista Cubana de Farmacia. 2017;51(3).
53. Mena VL, Tamargo SB, Salas OE, Plaza PLE, Blanco HY, Otero GA, Sierra GG. Determination of saponins and others secondary metabolites in aqueous extracts of *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2015;20(1):106-16.
54. Hernández Guzmán AC, Hermosilla Carazo VJ. Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala. GUATEMALA: SAN CARLOS; 2014.
55. Upadhyay S, Phukan UJ, Mishra S, Shukla RK. De novo leaf and root transcriptome analysis identified novel genes involved in Steroidal saponin biosynthesis in *Asparagus racemosus*. Journal BMC Genomics. 2014;15.
56. Portilla Segura A. Extracción y cuantificación de saponinas de amole (*Sicyos deppei* g.) para la elaboración de jabón ecológico. México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2014.
57. Guzmán B; Cruz DL; Alvarado JA, Mollinedo P. Cuantificación de Saponinas en muestras de Cañihua *Chenopodium pallidicaule* Aellen. Revista Boliviana de Química. 2013;30(2).
58. Siller Juárez DF. Extracción y purificación de saponinas del residuo del Agave lechuguilla *Torrey* (guishe) y su aplicación potencial. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2012.
59. Benavides OL; Arango O, Hurtado AM, Rojas MC. Saponins Quantification of Fresh and Fermented Juice of Figue (*Furcraea gigantea*)

by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC-PDA). Información Tecnológica. 2012;23(3):67-76.

60. Lozano M, Ticona ER, Carrasco Villanueva C, Flores Y. Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real *Chenopodium quinoa* Willd. Revista Boliviana de Química. 2012;29(2).
61. Rojas Avalos AS, Tapia Ramírez WE. Cuantificación por espectrofotometría uv/vis de las saponinas contenidas en el episperma de la especie *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” procedente de la provincia de Santiago de Chuco - La Libertad”. Perú: Universidad Nacional de Trujillo 2011.
62. Kowalczyk M, Pecio L, Stochmal A, Oleszek W. Qualitative and Quantitative Analysis of Steroidal Saponins in Crude Extract and Bark Powder of *Yucca schidigera* Roetzl. J Agric Food Chem. 2011;59(15):8058–64.
63. Zhang T, Liu h, Liu XT, Xu DR, Chen X, Wang Q. Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. polyphylla* var. *chinensis* by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2010;51(1):114-24.
64. Man S, Gao W, Zhang Y, Wang J, Zhao W, Huang L, Liu C. Qualitative and quantitative determination of major saponins in *Paris* and *Trillium* by HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS. Journal of Chromatography B. 2020;878(29):2943-8.
65. Skhirtladze A, Perrone A, Montoro P, Benidze M, Kemertelidze E, Pizza C, Piacente S. Steroidal saponins from *Yucca gloriosa* L. rhizomes: LC-MS profiling, isolation and quantitative determination. Phytochemistry. 2011;72(1):126-35.
66. Liu XX, Wang L, Yang J, Zhang TT. Simultaneous analysis of eight bioactive steroidal saponins in Gongxuening capsules by HPLC-ELSD and HPLC-MS. *Acta Chromatographica*. 2009 21(2):327-39.
67. Liu XX, Wang L, Chen XQ, Deng XT, Cao Y, Wang Q. Simultaneous quantification of both triterpenoid and steroidal saponins in various Yunnan Baiyao preparations using HPLC-UV and HPLC-MS. *Journal Separation Science*. 2008;31(22):3834-46.
68. Paredes Mariños HF, Solar Armas, MA. Identificación y cuantificación de las saponinas contenidas en el fruto de la especie *Cucumis dipsaceus* por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). México: Universidad Nacional de Trujillo; 2007.
69. Ahn MJ, Kim J. Identification and quantification of steroidal saponins in *Polygonatum* species by HPLC/ESI/MS. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;28(5):592-7.
70. Guerra JO, Simonet A, Nogueiras C, Macías FA. Uso de nuevas técnicas espectroscópicas en la elucidación estructural de moléculas complejas. Saponinas esteroidales del *Agave brittoniana* T. *Revista Cubana de Química*. 2005;XVII(3):223.

71. Hernández R, Lugo EC, Díaz L, Villanueva S., Socorro. Extracción y cuantificación de las saponinas de agave lechuguilla Torreye-Gnosis. Red de Revistas Científicas de América Latina. 2005; 3.
72. Hata Y, Reguero M, Arteaga L, Buitrago G, Álvarez A. Evaluation of sapogenin contents in native yam varieties (*dioscorea* spp.) from Colombian Cordoba University collection. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas. 2003;32(2):149-57.
73. Lurssen Cardova LM. Cuantificación de saponinas esteroidales en *Yucca Elephantipes* (flor de izote). Guatemala: San Carlos; 2001.
74. López Fuentes GL. Cuantificación de sapogeninas esteroidales en *Phytolacca icosandra* L(saquichá). Guatemala: San Carlos; 2000.
75. Quevedo Campos MN. Cuantificación de sapogeninas esteroidales en muestras de *Sapindus saponaria*. Guatemala: San Carlos; 2000.
76. Uribe Lamas A. Métodos usados para la Determinación de Saponinas México: Nacional Autónoma de México; 1987.