

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO  
NARRO**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**Tesis**

**Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado  
del *Agave lechuguilla* Torrey (guishe) y su aplicación potencial**

**Por:**

**Daniel Francisco Siller Juárez**

**Presentada como requisito para obtener el título de:**

**Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Buenvista, Saltillo, Coahuila, México**

**Diciembre 2012**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del *Agave lechuguilla* Torrey (guishe) y su aplicación potencial

Presentado por:

Daniel Francisco Siller Juárez

TESIS

Que se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El presente trabajo ha sido dirigido por el siguiente comité:

Director

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Co-Director

MC. María Lijiana Flores López

Asesor Externo

Dra. María de Lourdes Virginia Díaz

Jiménez

Asesor Interno

Dra. Diana Jasso Cantú

Dr. Ramiro López Trujillo

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



Buenavista, Saltillo, Coahuila

Noviembre, 2012

# AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a mi familia que es quien me ha hecho fuerte en todo momento, a mi madre por ser mi luz en el camino, a mi hermano por ser mi compañero en el viaje, a mi padre que de lejos me ha sustentado.

A mis amigos de la UAAAN que me han enseñado a sacar lo mejor de mí.

Al equipo de trabajo con el que pude convivir y aprender mucho; esas personas que estuvieron presentes en este trabajo por algún motivo: Iván, Hench, Silvita, Arturo, Diego, Esme, Pepe, y especialmente a Paúl que me ayudó mucho con su apoyo en esta tesis y su amistad, al igual que Marvin quién me tuvo paciencia y siempre mostró su disponibilidad.

A mis asesoras con aprecio y respeto; a la Dra. Charles quién con su confianza me pudo vincular a este proyecto, a la Dra. Jasso quien con todo y prisa tuvo la amabilidad de recibirme en su laboratorio, a la Dra. Lourdes Díaz quién me apoyó siempre, me enseñó, corrigió y mostró siempre su interés, al Dr. Sandoval quién me recibió en su laboratorio y me brindó su ayuda en la identificación de la sapogenina y finalmente con mucho cariño a la M.C. Liliana Flores quién estuvo siempre al pendiente de este trabajo a expectativas de que todo saliera correctamente, guía e instructora del equipo que me ha enseñado lo que es desear y hacer investigación, por su paciencia inagotable, su comprensión, motivación y por su puesto; su amistad.

GRACIAS

La presente tesis fue financiada por el proyecto “Aprovechamiento del guishe de *Agave lechuguilla* Torrey en la obtención de productos de alto valor comercial”, CONACYT-ECONOMÍA (ECO-2010-01-148092).

# ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	1
1 INTRODUCCION	2
1.1 Antecedentes.....	2
1.2 Justificación.....	4
1.3 Hipótesis.....	6
2 REVISION DE LITERATURA.....	7
2.1 <i>Agave lechuguilla</i> Torrey.....	7
2.1.1 Morfología y Hábitat.....	7
2.1.2 Nutrición.....	8
2.1.3 Reproducción.....	8
2.1.4 Composición Química.....	9
2.1.5 Usos.....	9
2.2 Guishe.....	13
2.3 Saponinas.....	14
2.3.1 Características de las saponinas.....	16
2.3.2 Clasificación química de las saponinas.....	18
2.3.3 Saponinas triterpenoides.....	18
2.3.4 Saponinas esteroidales.....	19
2.3.5 Sapogeninas.....	20
2.3.6 Métodos de análisis de las saponinas.....	21
2.3.6.2 Índice de espuma.....	21
2.3.6.3 Índice de hemólisis.....	22
2.3.6.4 Índice de pescado.....	23
2.3.6.5 Reacciones colorimétricas.....	23
2.3.6.6 Reacción colorimétrica del ácido 3-5 dinitrosalicílico.....	23
2.3.6.7 Cromatografía en capa fina (TLC).....	24
2.3.6.8 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	25
2.3.6.9 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	26



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	<i>Agave lechuguilla</i> Torrey.....	7
<b>Figura 2.</b>	Ixtle del ejido Tortuga, Ramos Arizpe .....	9
<b>Figura 3.</b>	Algunos artículos fabricados con ixtle.....	10
<b>Figura 4.</b>	Proceso de comercialización que sigue el ixtle.....	11
<b>Figura 5.</b>	Guishe del Ejido Tortuga, Ramos Arizpe .....	14
<b>Figura 6.</b>	Diferentes posibles estructuras de saponinas de <i>Quillaja</i> .....	16
<b>Figura 7.</b>	Estructura de una saponina triterpénica .....	18
<b>Figura 8.</b>	Estructuras de saponinas esteroidales. A) Estructura espirostánica, B) Estructura furostánica.....	20
<b>Figura 9.</b>	Estructura de una saponina donde se identifica la sapogenina correspondiente.....	20
<b>Figura 10.</b>	Visualización de la prueba de espuma en soluciones acuosas de saponinas .....	22
<b>Figura 11.</b>	Índice de hemólisis .....	22
<b>Figura 12.</b>	Reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico hacia ácido 3-amino-5-nitrosalicílico .....	24
<b>Figura 13.</b>	Comportamiento de energía y el campo magnético en RMN.....	27
<b>Figura 14.</b>	Municipios de mayor producción ixtlera en Coahuila.....	29
<b>Figura 15.</b>	Prensa mecánica de 200 L utilizada para obtener el extracto líquido .....	30
<b>Figura 16.</b>	Sistema de reflujo utilizado para la obtención de extracto seco de saponinas .....	32
<b>Figura 17.</b>	Sistema de purificación de la sapogenina mayoritaria por cromatografía en columna .....	37
<b>Figura 18.</b>	Curva de calibración de saponinas de <i>Quillaja saponaria</i> contra azúcares .....	42
<b>Figura 19.</b>	Comparación de composición de saponina (g/L) en las muestras de extracto líquido y saponina cruda en los meses de marzo y junio.....	43

<b>Figura 20.</b>	Equipo de Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	45
<b>Figura 21.</b>	Curva del estándar de <i>Quillaja saponaria</i> (SIGMA) obtenida por HPLC .....	46
<b>Figura 22.</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de la saponina purificada.....	47
<b>Figura 23.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de la saponina purificada .....	48

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Curva de calibración de dextrosa.....	34
<b>Cuadro 2.</b>	Análisis fisicoquímico de guishe de <i>Agave lechuguilla</i> de tres localidades de Coahuila recolectados en Marzo y Junio.....	40
<b>Cuadro 3.</b>	Historial meteorológico de marzo y junio de 2011 .....	41
<b>Cuadro 4.</b>	Concentración de saponina base <i>Quillaja saponaria</i> (mg/mg de muestra) en extractos de saponina cruda de guishe.....	46
<b>Cuadro 5.</b>	Asignación de RMN de <sup>13</sup> C y <sup>1</sup> H para esmilagenina .....	49

## I. RESUMEN

El *Agave lechuguilla* Torrey es un arbusto que crece en áreas semi-desérticas, cuyo aprovechamiento ha sido la obtención de una fibra llamada ixtle. Por sus propiedades de suavidad y resistencia, con esta fibra se pueden fabricar diversas variedades de artículos, como cuerdas, tapetes y costales, entre otros. Para la obtención del ixtle las hojas del agave se tallan mecánicamente, obteniendo además del ixtle un residuo pulposo conocido como guishe. Esta pulpa representa el 85% del total de la planta y hasta ahora no tiene ningún uso ni valor comercial. Investigaciones anteriores del guishe revelaron el contenido de moléculas denominadas saponinas; las cuales destacan por sus propiedades tensoactivas, humectantes, emulsificantes y diversas aplicaciones biológicas.

En este trabajo de tesis se analizó fisicoquímicamente el guishe en dos épocas diferentes de un año para observar su comportamiento estacional. Se cuantificó el contenido de saponinas en el extracto líquido (directamente tomado del material prensado) y el extracto seco (obtenido con solventes orgánicos), usando dos técnicas. Una de ellas por un método indirecto, mediante la técnica del ácido 3-5 dinitrosalicílico y por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se determinó que la concentración de saponinas en las diferentes muestras está claramente influenciada por el lugar de origen de la muestra y por la fecha de recolección de la misma. Por último se aisló e identificó la saponina mayoritaria contenida en el guishe conocida como esmilagenina, cuya identificación se realizó por Resonancia Magnética Nuclear.

**Palabras clave:** *Agave lechuguilla* Torrey, guishe, saponinas

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

El *Agave lechuguilla* Torrey (lechuguilla), ha sido de gran importancia para las comunidades que se desarrollan en zonas áridas y semi-áridas del norte de México. Esta importancia se debe a que su explotación genera recursos financieros, de los cuales la población obtiene los ingresos para su sustento mediante la extracción de una fibra denominada ixtle. Los acopiadores del ixtle intercambian, a manera de trueque, esta fibra por bienes en tiendas rurales llamadas DICONSA (Distribuidora Conasupo, S.A. de C.V.). Sin embargo, mediante este mecanismo de comercialización de la fibra, los campesinos no obtienen dinero suficiente para cubrir otras necesidades ya que el esquema de acopio por parte de DICONSA es recibir el ixtle en greña y a cambio el recolector recibe productos de la canasta básica como pago a su producto y en ocasiones recibe un pequeño porcentaje en efectivo que no va más allá del 10% del valor de su producto (SAGARPA, 2009).

Se ha reportado que el *Agave lechuguilla* Torrey contiene sólo el 15 % de su peso en fibra, mientras que el 85% restante corresponde a una pulpa denominada "Guishe" (Reyes *et al.*, 2000). Actualmente, esta pulpa no tiene valor comercial debido a que es considerada un residuo, que hasta el momento, no se le ha reportado algún uso. Sin embargo, estudios recientes confirman la presencia de sustancias bioactivas que no han sido totalmente aprovechadas (Wang *et al.*, 2005). Entre estas sustancias se encuentra las saponinas (Oakenfull, 1981); las cuales al ser hidrolizadas forman compuestos con alto potencial industrial por sus múltiples aplicaciones, entre las cuales, una de las más importantes es como precursor de hormonas (Hardman, 1975).

En estudios previos (García-Contreras, 2010) se ha confirmado la presencia de saponinas en guishe mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados obtenidos evidencian la factibilidad de que el guishe pueda ser considerado como fuente alternativa de saponinas.

En este trabajo de tesis se plantea el estudio del guishe, residuo del tallado de *Agave lechuguilla* Torrey, como fuente de saponinas; y la variabilidad de la producción de saponinas en función de la estacionalidad, mediante el muestreo en dos épocas del año (Marzo y Junio) y la influencia del medio ambiente por medio de la comparación del contenido de saponinas en guishe recolectado de tres zonas talladoras de la Región Sureste del Estado de Coahuila.

Este trabajo se realizó en la empresa Biorganix Mexicana S.A de C.V., en colaboración con el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Saltillo, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El estudio forma parte del proyecto titulado “Aprovechamiento del guishe de *Agave lechuguilla* Torrey en la obtención de productos de alto valor comercial” financiado por el fondo sectorial CONACYT-ECONOMÍA (ECO-2010-01-148092).

## **1.2 Justificación**

Desde el punto de vista biológico, la lechuguilla es una de las dos especies de *Agave* con la distribución natural más amplia y de mayor densidad de América del Norte, donde llega a ser dominante fitosociológico del matorral desértico rosetófilo, y su productividad es superior a la media de las especies de su ambiente (Reyes *et al.*, 2000).

El *Agave lechuguilla* ha sido de gran importancia para las comunidades que se desarrollan en estas zonas, tal importancia radica en que su explotación genera recursos financieros, de los cuales la población obtiene sustento. Por muchos años, dentro del país, el aprovechamiento de lechuguilla se ha enfocado principalmente a la obtención de la fibra denominada ixtle, para la elaboración de objetos de rutina doméstica y la exportación al extranjero como materia prima de bajo costo.

En el análisis de la demanda de ixtle, se detectó que la única empresa que compra fibra directamente a los productores es DICONSA, a través de su red de tiendas comunitarias. El acopio se realiza siguiendo un esquema de intercambio de productos de canasta básica por fibra. La demanda de DICONSA se genera con los convenios de comercialización que ésta realiza con 5 empresas procesadoras de ixtle en el país.

En general, el sector ixtlero del país enfrenta graves problemas que afectan a la etapa de producción, que la representan los recolectores o talladores; ya que es una actividad poco rentable debido al bajo precio que reciben por la fibra en las tiendas DICONSA. Adicionalmente, solo pueden obtener muy poco dinero en efectivo por su producto de manera que los productores tienen que dedicarse

a otras actividades para complementar su ingreso y obtener solvencia para cubrir otras necesidades.

Estudios recientes demuestran que los compuestos presentes en la planta pueden ser aprovechados en diversas áreas, lo que debe ser considerado como una alternativa en la elaboración de productos con alto valor agregado.

Con respecto a las saponinas, se ha reportado su concentración en *Agave lechuguilla* desde 1 hasta 18% en peso determinándola en base seca y húmeda de las hojas y el guishe (Hernández-Soto, 2005; Flores, 1991; Wall *et al.*, 1962).

Las saponinas poseen una amplia variedad de propiedades, en las cuales se encuentran la dulzura y la amargura (Hostettmann y Marston, 1995), espumabilidad y emulsificante, farmacéuticas y propiedades medicinales, fuertes propiedades hemolíticas, así como antimicrobial e insecticida. Las saponinas se han utilizado en bebidas y confitería, así como cosméticos y productos farmacéuticos. Las saponinas tienen un potencial farmacéutico amplio ya que por medio de manipulaciones químicas han sido utilizadas en la síntesis de hormonas (Hardman, 1975).

Se han identificado saponinas en el residuo del tallado del *Agave lechuguilla Torrey* conocido como guishe, al cual aun no se le ha encontrado algún uso y no tiene ningún valor comercial. Por lo que esta investigación pretende cuantificar saponinas, así como aislar a la saponina mayoritaria del guishe; para poder dar un valor agregado a este agave; en este caso al guishe, y debido a la gran distribución de esta planta en áreas semi-desérticas utilizarla como fuente de materia prima para la obtención de saponinas.

### **1.3 Hipótesis**

El contenido de saponinas presentes en residuos de la explotación Ixtlera del *Agave lechuguilla* Torrey, “guishe”, está influenciado por la ubicación y estacionalidad de muestreo.

### **1.4 Objetivo General**

Comparar la cantidad de saponinas en el residuo de tallado del *Agave lechuguilla* Torrey (guishe) en dos épocas del año (Marzo y Junio) de tres localidades de la región talladora de Coahuila e identificar la sapogenina mayoritaria presente.

### **1.5 Objetivos Específicos**

- Caracterizar fisicoquímicamente el extracto de guishe recolectado de tres localidades de la región, en dos épocas del año (Marzo y Junio).
- Extraer y cuantificar saponinas del extracto de guishe recolectado de tres localidades de la región, en dos épocas del año (Marzo y Junio).
- Identificar la sapogenina mayoritaria presente en las muestras de estudio.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 *Agave lechuguilla* Torrey

#### 2.1.1 Morfología y Hábitat

El *Agave lechuguilla* Torrey es un arbusto rosetófilo, acaule pequeño que cuenta en promedio con 11 a 30 hojas (Figura 1). Puede alcanzar una altura entre 20 y 70 cm y entre 30 y 40 cm de ancho. Sus raíces son largas, fibrosas y delgadas, las cuales se distribuyen a una profundidad de 8 a 12 cm del suelo. Las hojas de lechuguilla se forman a partir de una yema apical desarrollada. Éstas pueden llegar a medir entre 25 y 50 cm de largo y 2.5 a 6 cm de ancho; tienen forma lanceolada, con color que va desde el verde claro al amarillo verdoso. El ápice es una espina fuerte, cónica, tubulada grisácea de 1.5 a 4 cm de longitud (Reyes *et al.*, 2000) (Figura 1).



**Figura 1.** *Agave lechuguilla* Torrey.

El *Agave lechuguilla* crece en forma silvestre en las zonas áridas y semiáridas del sur de Texas y Nuevo México en los Estados Unidos de América; mientras que en México se encuentra en el semidesierto chihuahuense, que comprende los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango. Su presencia también se extiende a algunos estados del centro de México como Jalisco, Hidalgo, Querétaro y Guanajuato. Esta planta muestra cambios latitudinales en la morfología floral, color y producción de néctar a lo largo de su distribución en el norte y centro de México (Silva-Montellano y Eguiarte, 2003).

### **2.1.2 Nutrición**

En general, los agaves viven en suelos rocosos arcillosos bien drenados, ricos en nutrientes, especialmente nitrógeno, que parece ser el elemento más limitante de la actividad metabólica de algunos agaves. Los niveles de elementos en el suelo afectan la distribución de su hábitat nativo. Estas plantas son relativamente sensibles a la salinidad, sobre todo en estado juvenil; pero no son sensibles a altas concentraciones de calcio ni a metales pesados como el cobre y el zinc. El pH óptimo de los suelos para el crecimiento de agave es entre 5 y 8, fuera de esos rangos la plantas son muy sensibles (Granados, 1999).

### **2.1.3 Reproducción**

Los agaves son monocárpico semélparos, es decir, que sólo tienen una floración al cabo de la cual la planta muere. La inflorescencia recibe el nombre de quote; es un escapo espigado de superficie glauca que alcanza hasta 6 m de alto. Sin embargo, la mayoría de las especies de agave, se propagan por hijuelos. Los agaves adultos pueden producir tallos subterráneos, denominados rizomas, que surgen de la base de sus tallos. Al final de cada rizoma emerge una nueva planta o hijuelo. Esta reproducción asexual se da como sistema de defensa contra la depredación de las semillas y a que las condiciones

ambientales para llevar a cabo su germinación no siempre son adecuadas (Granados, 1999).

#### **2.1.4 Composición química**

La lechuguilla contiene en su composición principalmente sales minerales, saponinas y oxalato de calcio. Se ha determinado que el peso fresco promedio de un cogollo es de 356.5 g, del cual el 14.6% corresponde a fibra y 85.43% a guishe (tejido succulento y agua de las hojas) (Orozco *et al.*, 1977). Por otro lado, se ha reportado que el clorénquima está compuesto por 1.14% de nitrógeno, 1220 ppm de fósforo, 1.27% de potasio, 45 ppm de sodio, 6.11% de calcio, 0.40% de magnesio, 14 ppm de manganeso, 7 ppm de cobre, 36 ppm de zinc y 77 ppm de hierro (Nobel y Quero, 1986).

#### **2.1.5 Usos**

El *Agave lechuguilla* se emplea principalmente para la obtención de la fibra llamada "ixtle" (Figura 2), que se distingue por su suavidad y resistencia. Existen evidencias de que este uso de la lechuguilla data de tiempos prehistóricos, pues en Cuatrociénegas Coahuila se han encontrado sandalias de ixtle con 8000 años de antigüedad (Hernández-Soto, 2005).



**Figura 2.** Ixtle del ejido Tortuga, Ramos Arizpe.

*Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave  
lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*

Esta fibra se obtiene de manera manual o mecánica, raspando (tallando) la hoja de agave a fin de eliminar la pulpa y dejar sólo las fibras de mayor longitud y mejor apariencia, con la que se pueden fabricar una amplia variedad de artículos (Figura 3). Entre ellos se puede mencionar la producción de cuerdas, lomerías, gamarras, costales, cubierta para pacas de algodón, tapetes (domésticos y para automóviles) y bajo- alfombras. También se usa para fabricar cepillos de aparatos para limpieza, algunos tipos de brochas y los sobrantes se usan para hacer estropajos y relleno de colchones (Berlanga y González, 1992).



**Figura 3.** Algunos artículos fabricados con ixtle.

La fibra de lechuguilla obtenida por el “tallador” está tasada en un valor promedio de \$13.00 por kilogramo. En un análisis de la demanda de ixtle a nivel nacional, se detectó que la única empresa que compra fibra directamente a los productores es DICONSA. Esto lo hace a través de su red de tiendas comunitarias, y el acopio se realiza mediante un esquema de intercambio de productos de canasta básica por fibra recién tallada denominada greña (Figura 4). La demanda de DICONSA se genera con los convenios de comercialización que ésta realiza con 5 empresas procesadoras de ixtle del país. En promedio, estas empresas generan una demanda anual de 25 mil toneladas. Dicha

*Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*

actividad representa una derrama económica importante de recursos en las regiones semidesérticas, al intercambiar la fibra de ixtle por productos de la canasta básica; ya que se alcanzarían 350 millones de pesos netos (SAGARPA, 2009).

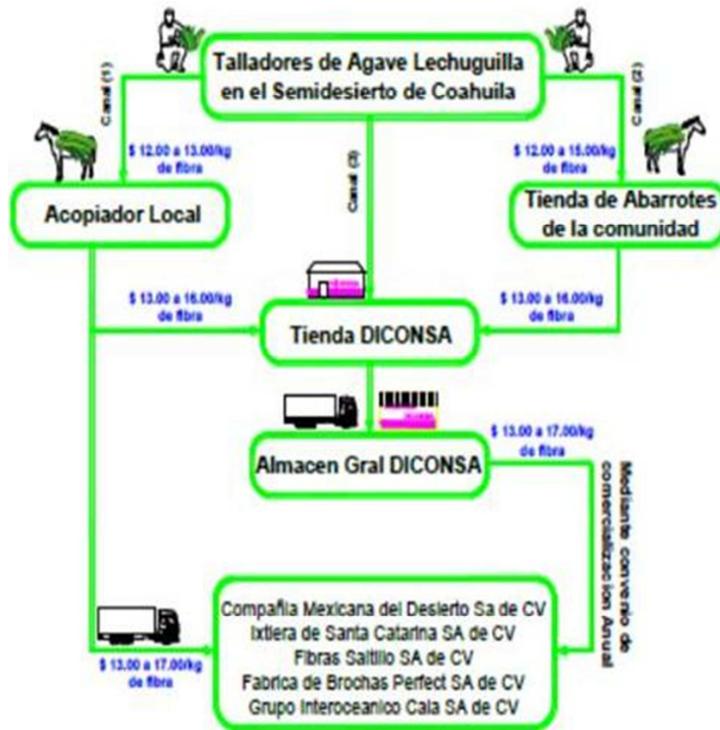


Figura 4. Proceso de comercialización que sigue el ixtle (SAGARPA, 2009).

DICONSA está sujeta a que las procesadoras o beneficiadoras ixtleras le demanden cierto volumen de fibra en greña. Por lo cual, el agente que rige el flujo comercial son las empresas ixtleras que demandan este volumen de fibra a DICONSA. De esa manera, DICONSA sólo acopia el volumen solicitado por las empresas y cuando alcanza ese límite, el proceso de compra se detiene. Lo anterior provoca que en muchas ocasiones, los talladores no obtengan ingresos por esta actividad. Así, se ven obligados a cambiar de actividad, como la

ganadería o agricultura o en el peor de los casos emigrar a los Estados Unidos de América (SAGARPA, 2009), generándose un grave problema social.

En el estado de Coahuila, el aprovechamiento del *Agave lechuguilla* para obtención de ixtle está regulado por SEMARNAT, la cual expide permisos de aprovechamiento forestal no maderable. Actualmente existen varios ejidos que cuentan con permisos para el aprovechamiento de la planta, los cuales se encuentran en los siguientes municipios: General Cepeda, Ramos Arizpe, Parras, Saltillo, Escobedo, Ocampo, Arteaga, San Buena Aventura, Cuatro Ciénegas, San Pedro de las Colonias y Castaños (SAGARPA, 2009).

Los permisos vigentes en el estado de Coahuila representan un volumen de aprovechamiento total de 44,875 toneladas de cogollos de lechuguilla; siendo el municipio de Ramos Arizpe el mayor recolector con 28,915 toneladas. Además del *Agave lechuguilla*, los talladores también aprovechan otras especies forestales no maderables del desierto para su venta. Tal es el caso de la Candelilla y el Orégano (SAGARPA, 2009).

La mayor parte de la fibra producida se exporta a países productores de cepillos industriales, como Estados Unidos, Suiza, Japón, Holanda, Alemania y Gran Bretaña. También se exporta fibra a Argentina, Brasil, Canadá, España, Francia, Italia y Venezuela (Berlanga y González, 1992).

El ixtle reforzado que se obtiene por el tratamiento con ciertas resinas, se utiliza para fabricar láminas semejantes a las de fibra de vidrio, empleadas en la manufactura de tinacos, muebles, accesorios para el hogar y lanchas deportivas (Belmares *et al.*, 1979).

Otro de los usos de que se han dado al *Agave lechuguilla* es como agentes antimicrobianos. Esto debido a su actividad biocida, asociada a la presencia de

varios compuestos fenólicos, entre ellos timol y carvacrol. Los extractos fueron aplicados para el combate de la borroa, parásito de las abejas (Reyes *et al.*, 2000). Otra aplicación es en la higiene del cabello, ya que la planta aporta grandes cantidades de compuestos bio y tensioactivos (compuestos con actividad detergente), como algunas saponinas (Ptamalai *et al.*, 1990; Kellerman *et al.*, 1991; Martínez-Hernández *et al.*, 2007).

## **2.2 Guishe**

Como subproducto de la obtención de ixtle se genera un residuo formado por tejido succulento, fibra de baja calidad y agua (Figura 5). Este material es conocido como guishe y actualmente no se le ha dado ningún tipo de aprovechamiento. Generalmente, suele dejarse a campo abierto donde, en época de sequía es consumido por el ganado provocándole enfermedades, llegando en algunas ocasiones a ocasionar la muerte del animal (Hernández-Soto, 2005).

Se estima que de 32 pencas de lechuguilla se obtiene alrededor de 1.18 kg de fibra seca, lográndose una cantidad promedio de 63 toneladas por hectárea (Jonguitud, 2005). En este sentido, si en promedio 1 penca puede contener 36.87 gramos de fibra (ixtle) y 208.96 gramos de pulpa fresca (guishe); se puede calcular que aproximadamente existe un potencial de acumulación de guishe de 357 toneladas por hectárea.

El guishe llega a representar cerca del 85% del peso fresco de un cogollo. De acuerdo con algunos reportes, este residuo puede ser una fuente importante de saponinas que ha sido poco aprovechada. Hasta ahora, hay datos que indican que el guishe ha sido utilizado para elaborar jabones y champús; además para obtener esteroides (Flores y Perales, 1989; Zapién, 1981; Wall *et al.*, 1962).



**Figura 5.** Guishe del Ejido Tortuga, Ramos Arizpe.

El guishe de lechuguilla por tanto, podría usarse como materia prima para la obtención de hormonas esteroidales, las cuales se sintetizan a partir de sapogeninas esteroidales, las que a su vez son un producto de la hidrólisis de las saponinas. Tal es el caso de la esmilagenina (sapogenina esteroideal) (Hernández *et al.*, 2005).

En la lechuguilla, también se ha reportado la presencia de 8 saponinas más, las cuales han sido utilizadas como materia prima para la elaboración de cortisona (antiinflamatorio), e incluso estrógeno y progesterona, ya que sus hojas contienen entre 1 y 2% del peso seco de saponinas esteroidales (Wall *et al.*, 1962).

### **2.3 Saponinas**

Las saponinas son metabolitos secundarios que producen algunas plantas como defensa contra la depredación. Químicamente, son glicósidos de alto peso molecular que contienen una o más cadenas de azúcares unidas a una estructura aglicón (sapogenina) de naturaleza triterpénica o esteroideal (Figura 6).

Se clasifican de acuerdo con el número de cadenas de azúcares que presentan en su estructura. Así pueden ser mono, di y tridesmósido (Price *et al.*, 1987).

Las saponinas monodesmósidas tienen solamente una cadena de azúcar la cual normalmente esta unida al C-3 de la estructura. Las saponinas bidesmósidas tienen dos cadenas de azúcar; en ellas una cadena esta unida por medio de un enlace éter al C-3 y otra cadena esta unida con un enlace éster al C-28 (saponinas triterpénicas) o con un enlace éter al C-26 (saponinas furostánicas). 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 (Hosttetman y Marston, 1995).

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) (Hosttetman y Marston, 1995).

La naturaleza del aglicón, el número de cadenas presentes y los grupos funcionales que se encuentran en la estructura pueden variar ampliamente dando como resultado la formación de diversos compuestos (Figura 6) (Price *et al.*, 1987; Hosttetman y Marston, 1995).

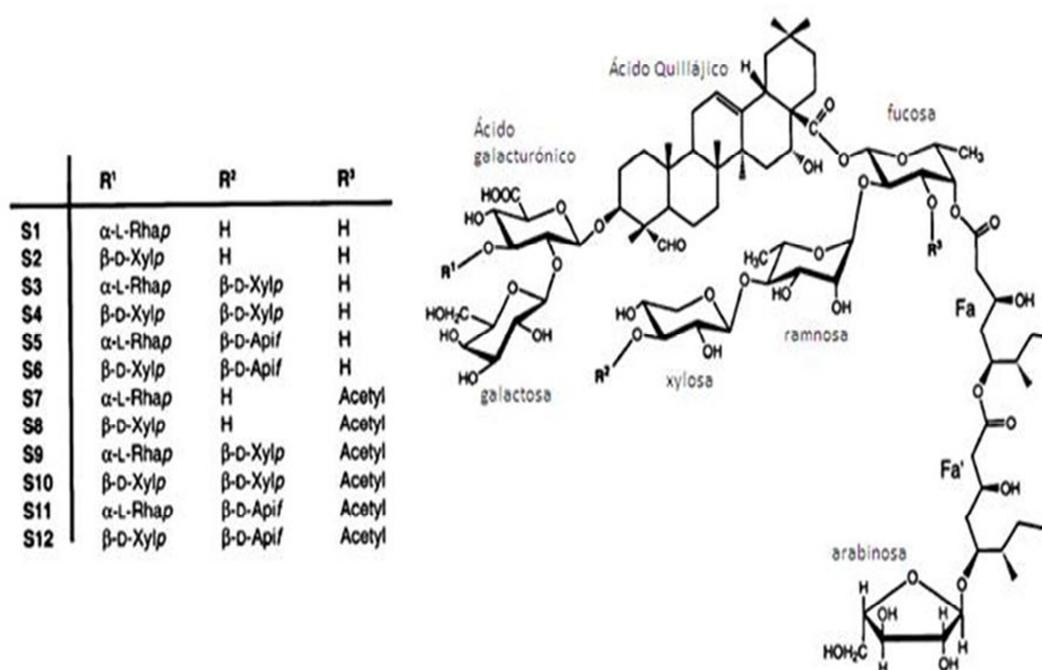


Figura 6. Diferentes posibles estructuras de saponinas de *Quillaja*.

La complejidad estructural de las saponina dan como resultado una amplia variedad de propiedades físicas, químicas y biológicas, sólo algunas son comunes en este grupo tan diverso (Wang *et al.*, 2005).

### 2.3.1 Características de las Saponinas

Debido a la presencia de aglicones lipofílicos y cadenas de azúcares solubles en agua en la estructura de la saponina (naturaleza anfipática), estos compuestos tienen la propiedad de ser tensoactivos, humectantes y emulsificantes (Wang *et al.*, 2005; Sarnthein-Graf y La Mesa, 2004; Mitra y Dungan, 2000; Ibanoglu y Ibanoglu, 2000).

Se ha reportado que las saponinas poseen una amplia variedad de actividades biológicas, entre las más importantes destacan las antifúngicas,

antioxidantes, hemolítica y diurética (Hostettmann y Marston, 1995; Lacaille-Dubois y Wagner, 1996).

La habilidad de las saponinas de hinchar y romper eritrocitos ocasionando que la hemoglobina se libere (actividad *in vitro*), ha sido una de las propiedades más estudiadas de las saponinas (Oda *et al.*, 2000). Sin embargo a pesar de que esta actividad ha sido relacionada con la estructura de la saponina (tipo de aglicón y cadenas de azúcares), no existe una aparente semejanza de características entre miembros pertenecientes a este mismo grupo (Oda *et al.*, 2000).

La toxicidad de las saponinas contra los insectos, gusanos parásitos, moluscos y peces así como sus propiedades antifúngicas, antivirales y antibacteriales han sido muy bien documentadas (Lacaille-Dubois y Wagner, 1996; Milgate y Roberts, 1995; Francis *et al.*, 2002).

Las saponinas están ampliamente distribuidas en las plantas. Kofler (1927) enlistó 472 saponinas contenidas en plantas y actualmente se conocen alrededor de 90 familias diferentes de plantas que contienen saponinas (Gubanov *et al.*, 1970).

Algunas de las plantas para alimentación humana que contienen saponinas son: soya, chícharos, cacahuates, frijoles, lentejas, espinacas, avena, espárragos, ajo, pimientos, papas, tomates y cebollas, entre otros (Birk y Peri, 1980; Oankenfull, 1981; Price *et al.*, 1987).

El contenido de saponinas en la planta depende de factores tales como variedad, edad, el estado fisiológico y el área geográfica donde crece. Al igual que otros metabolitos secundarios, es común encontrar una variación en composición y cantidad de saponinas en el material vegetal procedente de

diferentes lugares (Kawai *et al.*, 1988). Así mismo, la distribución de saponinas entre las partes de una planta, varía considerablemente. En las células de las hojas de la remolacha azucarera y las células de la raíz de la planta del guisante, por ejemplo, los glicósidos triterpénicos se presentan principalmente en forma ligada con la más alta concentración que ocurren en los cloroplastos y mitocondrias (Anisimov y Chirva 1980). El hecho es que las saponinas están localizadas en organelos que tienen un metabolismo dinámico, lo que implica que no son sólo un material de desecho o sin uso, pueden ser importantes sustancias reguladoras del metabolismo y desarrollo de un organismo (Anisimov y Chirva, 1980).

### 2.3.2 Clasificación química de las saponinas

Las saponinas se subdividen en Saponinas esteroidales y Saponinas triterpénicas; a su vez las saponinas esteroidales se subdividen principalmente en derivados del estirostano y derivados del furostano.

### 2.3.3 Saponinas triterpenoides

Las saponinas triterpenoides (Figura 7) se encuentran rara vez en las plantas monocotiledóneas, pero son abundantes en muchas de las dicotiledóneas, especialmente en Caryophyllaceae, Sapindaceae, Polygalaceae y Sapotaceae (Dewick, 2002).

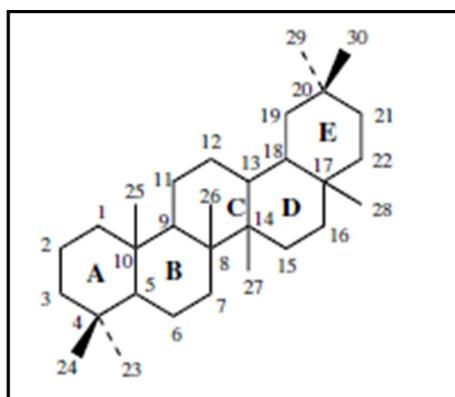


Figura 7. Estructura de una saponina triterpénica.

Las saponinas triterpenoides pertenecen a un largo grupo de compuestos que contienen una configuración de cuatro o cinco anillos; o 30 carbonos con varios oxígenos unidos. Los triterpenos son ensamblados a partir del isopreno (C5) a través de la vía del mevalonato citosólico para formar un compuesto de treinta carbonos. Todas las moléculas triterpénicas se derivan del dammarano y se subdividen en Pentacíclicas y Tetracíclicas. Las saponinas triterpénicas pentacíclicas son más frecuentes y pueden ser derivadas del oleano o del ursano. Las saponinas triterpénicas tetracíclicas conservan la estructura básica del dammarano, con 3 anillos de 6 carbonos y uno de 5 (Dewick, 2002; Hostettmann y Marston, 1995).

#### **2.3.4 Saponinas esteroidales**

Las saponinas esteroidales (Figura 8) están menos distribuidas en la naturaleza, en comparación de las saponinas triterpenoides. Se encuentran en muchas familias monocotiledóneas; especialmente en la Dioscoreaceae. Se sintetizan también por la ruta del ácido mevalónico. Este tipo de saponinas se subdividen en dos grupos principales; los derivados del espirostano y los derivados del furostanol (Dewick, 2002; Hostettmann y Marston, 1995).

Los derivados del espirostano son estructuras hexacíclicas de 27 carbonos. Su estructura deriva del ciclohexanoperhidrofenantreno con dos heterociclos de 5 y 6 miembros y una cadena lateral en la posición 17 (Dewick, 2002).

Los derivados del furostanol poseen un ciclo menos que es espirostano, 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 espirostano (Yang *et al.*, 2006).

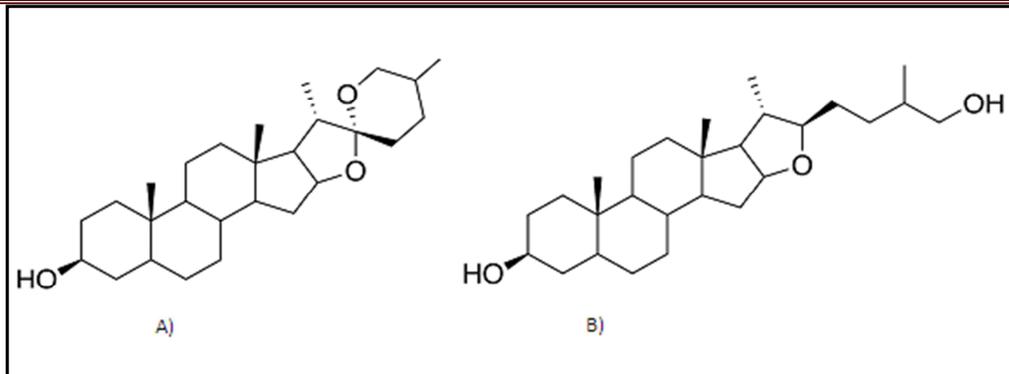


Figura 8. Estructuras de saponinas esteroidales. A) Estructura Espirostánica, B) Estructura Furostánica.

### 2.3.5 Sapogeninas

Las sapogeninas (aglicón) constituyen la porción lipofílica o no azucarada de la saponina obtenida por hidrólisis (Figura 9). Puede ser de naturaleza triterpenoide o esteroidal; y en este último caso constituye un posible precursor en la síntesis de hormonas (Hostettmann y Marston, 1995).

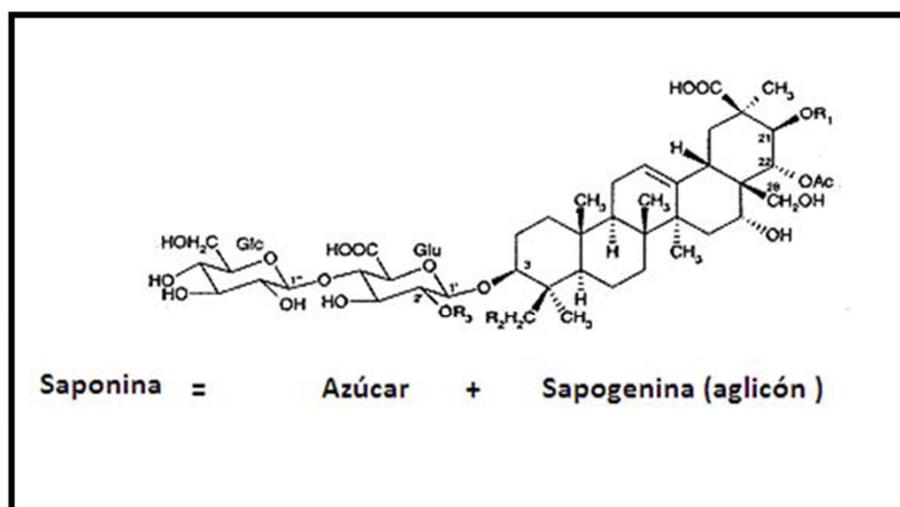


Figura 9. Estructura de una saponina donde se identifica la sapogenina correspondiente.

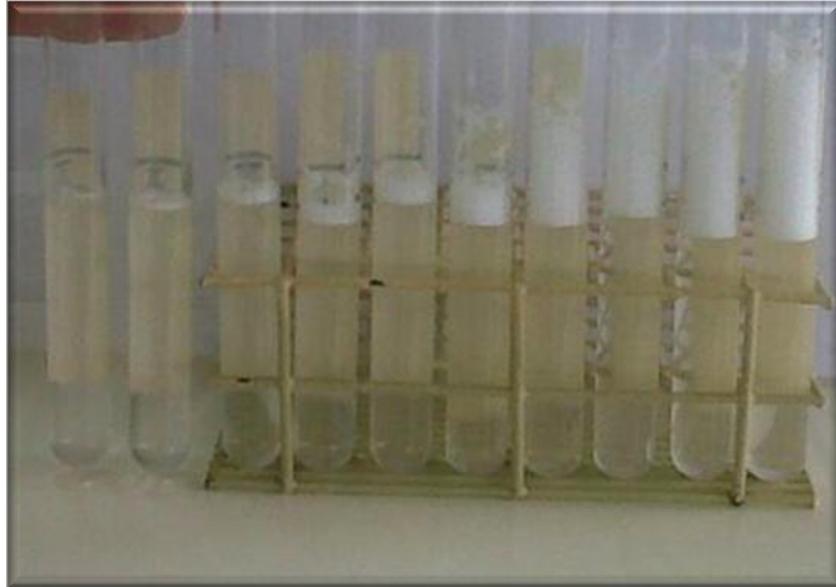
### **2.3.6 Métodos de análisis de las saponinas**

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 (Kensil *et al.*, 2004). También existen métodos colorimétricos y más recientemente, cromatográficos. La ventaja de esta última técnica es que no mide las propiedades generales de las saponinas, si no que es capaz de distinguir componentes individuales en una mezcla (Wang *et al.*, 2005).

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) (Hostettmann y Marston, 1995).

#### **2.3.6.1 Índice de espuma**

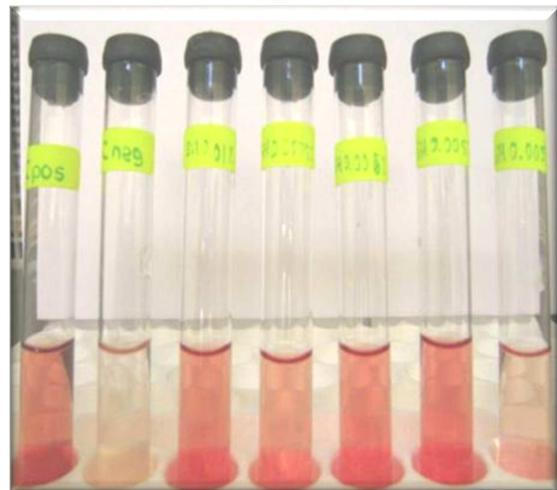
Al agitar vigorosamente, durante 30 segundos, una solución acuosa con una muestra que contenga saponinas, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar una solución de jabón. Después de la agitación, la mezcla se deja reposar por 15 minutos; al término de este periodo, la presencia de saponinas se evidencia por la espuma sobrenadante. La porción de saponinas se mide de acuerdo a la altura de la espuma sobrenadante. Así, si la altura de la espuma es menor a 5 mm, se dice que la muestra no contiene saponinas (prueba negativa); si la altura de la espuma cae en el rango de 5 a 9 mm, entonces la muestra tiene un contenido bajo de saponinas. Cuando la espuma alcanza una altura de 10-14 mm, el contenido es moderado; y finalmente, si la altura es mayor a 15 mm, se dice que la muestra tiene una alta concentración de saponinas (Galindo *et al.*, 1989). Así, en las soluciones de la Figura 10, se puede apreciar con claridad que la concentración de saponinas en las soluciones aumenta de izquierda a derecha.



**Figura 10.** Visualización de la prueba de espuma en soluciones acuosas de saponinas

### **2.3.6.2 Índice de hemólisis**

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 (Hostettmann y Marston, 1995).



**Figura 11.** Índice de hemólisis (Fuente: García Contreras, 2010).

### **2.3.6.3 Índice de pescado**

En la detección cualitativa de saponinas, también se ha empleado el método denominado índice de pescado. Éste se basa en la observación del grado de toxicidad de las saponinas en pescados (Kulinski, 2000).

### **2.3.6.4 Reacciones colorimétricas**

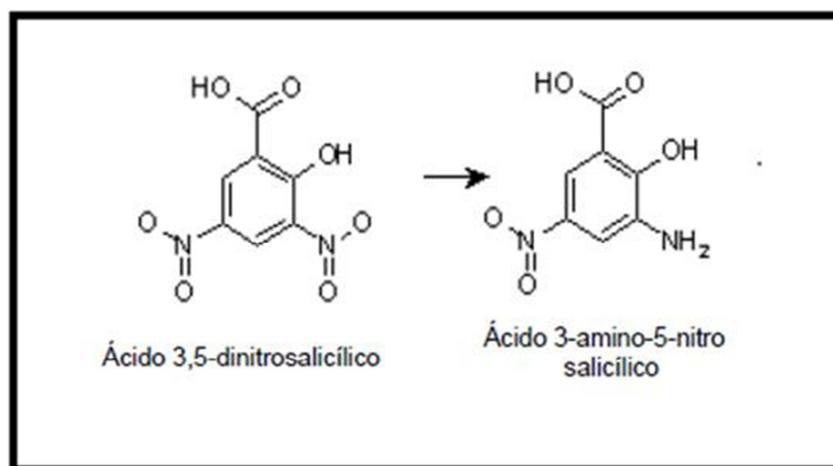
Las saponinas también pueden detectarse por métodos colorimétricos, haciendo reaccionar a la saponina con sustancias específicas para dar como resultado compuestos coloreados. El anisaldehído, la vainillina y otros aldehídos aromáticos con un fuerte ácido mineral (sulfúrico, fosforito, ácidos perclóricos), dan como resultado productos coloreados al reaccionar con los productos de deshidratación de los aglicones. 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 (Hiai *et al.*, 1976).

### **2.3.6.5 Reacción colorimétrica del ácido 3,5 dinitrosalicílico**

Este método colorimétrico hace uso de la ley de Beer-Lambert “la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del material que absorbe la luz, conocido como analito” (Rubison y Rubison, 2000). En el azúcar reductor se presenta la oxidación de la glucosa del grupo funcional aldehído presente y el grupo cetona en fructosa. Simultáneamente, el ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) es reducido a un compuesto nitroaminado colorido que varía del pardo oscuro a marrón según la concentración de los azúcares (Figura 12). La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de los azúcares y se mide en espectrofotómetro a 540 nm. Esta técnica tiene la

ventaja de ser un método preciso y rápido en comparación con los que utilizan derivados fenólicos.

Esta técnica se usa en la cuantificación de saponinas al liberar a los azúcares reductores por una hidrólisis ácida, los cuales están directamente relacionados con la concentración de la saponina correspondiente.



**Figura 12.** Reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico hacia ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.

### **2.3.6.6 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 de cromatográficas (generalmente de silicato) pueden analizar ya sea saponinas puras o extractos crudos, no son muy caros, son rápidos de usar y no requieren de un equipo especializado. Adicionalmente, existen disponibles varios reactivos de visualización para la pulverización sobre las placas. Algunos de los reactivos más comunes son: vainillina-ácido sulfúrico, Liebermann-Burchard, cloruro de antimonio, anisaldehído-ácido sulfúrico (Hostettmann y Marston, 1995).

El solvente (fase móvil) más frecuentemente utilizado es la mezcla cloroformo-metanol-agua (65:35:10) (Kawasaki y Miyahara, 1963). El sistema n-butanol-etanol-amoniaco (7:2:5) es igualmente popular, especialmente para

glicósidos que contienen residuos de ácido urónico; mientras que para mezclas muy polares se usa n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5) o cloroformo-metanol-ácido acético-agua (60:32:12:8). Los reactivos reveladores al calentar dejan ver diferentes manchas las cuales al ser medidas con un densitómetro se obtiene la cuantificación de saponinas (Domínguez, 1973; Uribe, 1987; Bruneton, 1991).

### **2.3.6.7 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 de refracción, detección de masas, o por derivación (Kensil y Marciani, 1991).

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 (Domon y Hostettmann, 1983).

La cromatografía por 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 (MPLC) que utiliza partículas más grandes (25-100  $\mu\text{m}$ .), las partículas de la fase estacionaria en HPLC son de 5-30  $\mu\text{m}$ . y consecuentemente permite una separación con mayor eficiencia. 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 (Hostettmann y Marston, 1995).

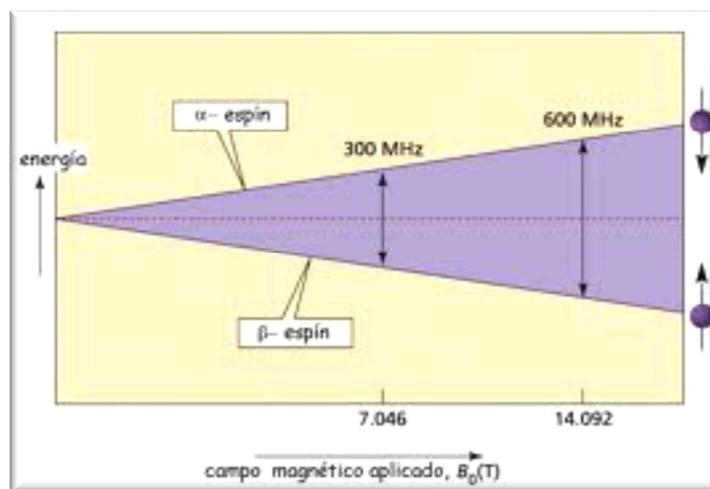
#### **2.3.6.8 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Uno de los métodos modernos para la elucidación de la estructura de los oligosacáridos y glicósidos es la resonancia magnética nuclear (RMN), la cual provee la información más completa, con o sin tener el conocimiento previo de la estructura (Agrawal, 1992). Es la única técnica que puede ofrecer un conocimiento completo de la estructura a estudiar sin recurrir a otro método (Hostettmann y Marston, 1995).

Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos (poseen spin) al igual que los electrones, ya que los núcleos tienen carga positiva y el movimiento de rotación sobre su eje hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. En ausencia de campo magnético los spines se orientan al azar. Si existe la influencia de un campo magnético, los spines positivos se orientan en el mismo sentido que el campo magnético (estado de spin  $\alpha$ ) y los negativos al contrario (estado de spin  $\beta$ ) (Elguero *et al.*, 2004).

La diferencia de energía entre los dos estados ( $\alpha$  y  $\beta$ ), depende de la fuerza del campo magnético aplicada (Figura 13). Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos del estado  $\alpha$  son promovidos al estado  $\beta$ . Esta radiación está en una radiofrecuencia del espectro electromagnético; cuando los núcleos vuelven a su estado normal es decir de  $\beta$  a  $\alpha$ , emiten señales que el espectro de RMN detecta

y registra en una gráfica de frecuencias contra intensidad llamada espectro (Elguero *et al.*, 2004).



**Figura 13.** Comportamiento de energía y el campo magnético en RMN. (Fuente: Tutorial de espectroscopia, Universidad de Granada, España).

La prueba espectroscópica de  $^{13}\text{C}$  de RMN, la cual es muy útil en la determinación de la estructura de las saponinas, es una prueba rápida y no destructiva, que no requiere gran cantidad de muestra (mg). Los análisis de los espectros de este tipo permiten concluir ciertos aspectos tales como la posición de la unión de las cadenas glucosídicas al aglicón, secuencia, número y posición de los monosacáridos, configuración y conformación de los enlaces interglucosídicos y la presencia de acilglucósidos en las cadenas (Ishii *et al.*, 1978; 1984). También ayudan a conocer la naturaleza del aglicón (Doddrell *et al.*, 1974; Tori *et al.*, 1974; Blunt y Munro, 1980) y el tipo de las estructuras unidas a los ácidos éster.

Aunque el análisis espectral de  $^{13}\text{C}$  y la asignación de señales se ha convertido en un procedimiento rutinario en la determinación de la estructura de

las saponinas, rara vez se informa la asignación completa de los espectros de  $^1\text{H}$ . El espectro de  $^1\text{H}$  es característicamente complejo y tedioso de analizar. La gran mayoría de las resonancias de protón de la fracción glúcida aparece en un ancho espectral muy pequeño (3.0 a 4.2 ppm) con el problema subsecuente de superposición. Esto se deriva de la mayor parte de los metilos del azúcar no anomérico y de los metilenos del protón los cuales tienen cambios químicos similares en los residuos de monosacáridos diferentes.

### **2.3.7 Aplicaciones comerciales de las saponinas**

Las diversas propiedades fisicoquímicas y biológicas de las saponinas han sido explotadas exitosamente en gran número de aplicaciones comerciales, tales como: la industria alimentaria, cosmética, agrícola y farmacéutica. La tendencia de los mercados hacia el uso de ingredientes naturales, y al reporte de cada vez más pruebas de su actividad biológica, han aumentado la demanda de saponinas en los últimos años (Brown, 1998; Malcolm, 1995).

Con base en sus propiedades de surfactantes no iónicos, su uso se ha extendido como emulsificantes, formadores de espuma y detergentes (San Martín y Briones, 1999; Balandarin, 1996). Otras aplicaciones propuestas de saponinas y las plantas que contienen saponinas son como aditivos alimentarios (Cheeke, 1999; Zhang, 1999; Aoun *et al.*, 2003; Jensen y Elgaard, 2001), como reguladores de crecimiento en plantas (Yamauchi *et al.*, 2000) y bacterias (Henderson, 2001) y como recuperador de suelos (Roy *et al.*, 1997).

Las dos principales fuentes comerciales de saponinas son los extractos de *Quillaja saponaria* y *Yucca schidigera* (San Martín y Briones, 1999; Balandarin, 1996). También se ha evaluado como fuente comercial de saponinas una serie de materiales de otras plantas como castaño de indias semillas de té y soya (Zhang, 1999). Dentro de las aplicaciones farmacéuticas, las saponinas son precursoras de la producción de hormonas (Blunden *et al.*, 1975), adyuvantes

*Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave  
lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*

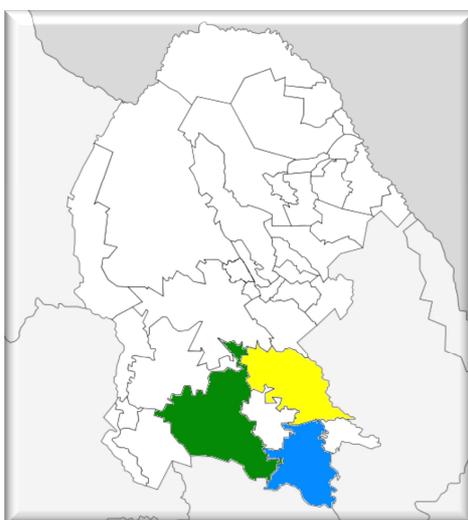
---

inmunológicos y como drogas (Kensil et al., 2004), También han sido documentadas como ingredientes activos en varios productos naturales como extractos herbolarios (Balandarin, 1996).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Recolección de materia prima

Se realizó la recolección del residuo de la producción de ixtle (guishe fresco), en un día normal de tallado de tres localidades del sureste del Estado de Coahuila (Figura 14). Se realizaron 2 muestreos, el primero en Marzo y el segundo en Junio de 2012. Los lugares de recolección fueron: el Ejido Tortuga en el municipio de Ramos Arizpe (Latitud: 25.833, Longitud: -101.267), el Ejido Buñuelos en el municipio de Saltillo (Latitud: 25.05, Longitud: -101.183) y el Ejido El Porvenir en el municipio de Parras de la Fuente (Latitud 25.550, Longitud 101.720). El material fue trasladado a las instalaciones de la empresa Biorganix Mexicana S.A de C.V en bolsas de plástico selladas.



**Figura 14.** Municipios de mayor producción ixtlera en Coahuila.

### **3.1.1 Pretratamiento de la materia prima**

Para la obtención del extracto líquido (jugo de guishe) se realizó un prensado mecánico empleando una prensa de acero inoxidable de 200 L de capacidad (Figura 15). El extracto líquido resultante fue calentado a 94 °C por 15 min para la inactivación enzimática. Se midió el volumen (L) y el peso (kg) del extracto líquido para la determinación de rendimientos. Posteriormente, el extracto obtenido se envasó en recipientes de 1 L y se almacenó a -20 °C hasta su utilización. Durante las pruebas experimentales las muestras se descongelaron y se almacenaron a 4°C durante el período de uso.



**Figura 15.** Prensa mecánica de 200 L utilizada para obtener el extracto líquido.

### **3.2 Caracterización fisicoquímica del extracto de guishe**

Se realizó una caracterización fisicoquímica a los extractos de guishe obtenidos en 2 épocas del año (Marzo y Junio), con la finalidad de hacer un estudio comparativo entre ambos muestreos y la variabilidad relacionada al sitio de recolección. Para este fin se determinó el contenido de proteínas, cenizas y humedad utilizando los métodos recomendados por la AOAC (1996) (2.057, 31.013 y 966.02, respectivamente).

El extracto etéreo se determinó siguiendo el método Soxhlet 920.39 de la AOAC (1996). Para la cuantificación de azúcares totales se utilizó el método de Fenol-Sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado.

### **3.3 Extracción y cuantificación de saponinas del extracto de guishe**

Para realizar esta actividad se obtuvo un extracto crudo de saponinas por medio de solventes y el extracto líquido fue tomado directamente del jugo que fue prensado y almacenado anteriormente. Para la determinación indirecta de saponinas se cuantificó el contenido de azúcares reductores por el método de Miller (1959) (Hernández *et al.*, 2005; Ibarra, 2005), y de forma directa por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para la prueba indirecta se realizó una curva de dextrosa la cual se interpoló con una curva de *Quillaja saponaria* (SIGMA) para obtener una nueva curva (saponinas g/L, azúcares g/L) y así obtener la ecuación para determinar los azúcares reductores. A continuación se describen detalladamente los procedimientos que se siguieron.

#### **3.3.1 Obtención del extracto crudo de saponinas**

La obtención del extracto crudo de saponina se realizó por extracción con solventes a partir de los extractos líquidos de guishe hervido obtenido previamente, siguiendo la metodología descrita por García-Contreras (2010) con algunas modificaciones.

Se concentraron en rotavapor (Yamato BM500) 100 mL de cada extracto hervido de guishe, a 100 °C hasta obtener aproximadamente 30 mL del concentrado. El extracto concentrado se colocó en un matraz de 500 mL y se realizó una primera extracción utilizando acetato de etilo (EtOAc) (Fermont) en una proporción sólido-líquido de 1:10 (p/v). La mezcla se mantuvo en reflujo

directo bajo agitación magnética durante 7 h a 65 °C (Figura 16). Al final de este tiempo, se dejó reposar 24 horas a 4 °C y se filtró al vacío con filtro Whatman No. 41 para obtener el extracto sólido. El material presente en el fondo del vaso se transfirió a un vidrio de reloj y se secó en estufa (Felisa) a 60 °C para eliminación del solvente. Finalmente, el sólido se pasó a un mortero para disminución de tamaño de partícula hasta obtener un polvo.



**Figura 16.** Sistema de reflujo utilizado para la obtención de extracto seco de saponinas.

Al material sólido resultante de la extracción con EtOAc, se le realizó una segunda extracción con butanol (Fermont) al 9.1% con una proporción de 1:40 (p/v), durante 7 h en un sistema de reflujo, para obtener saponinas. Posteriormente, el extracto se dejó reposar 24 h a 4 °C y después de transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. El sobrenadante se concentró en rotavapor (Yamato BM500) y se colocó en un vidrio de reloj para evaporar el solvente a 60 °C en estufa (Felisa). El extracto resultante se denominó “extracto crudo de saponinas”, el cual fue molido en un mortero para reducción de tamaño de partícula.

### **3.3.2 Cuantificación indirecta de saponinas**

La cuantificación de saponinas en los extractos se realizó de manera indirecta, mediante la liberación de azúcares por un proceso de hidrólisis con ácido clorhídrico (HCl) concentrado (Hernández, 2005; Ibarra, 2005). Se realizó una curva de calibración con dextrosa (Difco), la cual se interpoló con una curva de saponina estándar de *Quillaja saponaria* (SIGMA) para obtener una nueva curva de calibración, donde la concentración de azúcares liberados está en función de la concentración de saponina estándar utilizada. A continuación se describen detalladamente los procedimientos que se siguieron:

#### **3.3.2.1 Curva de calibración de *Quillaja saponaria***

Para la curva de calibración se prepararon una serie de concentraciones acuosas de saponinas de *Q. saponaria* (SIGMA) para su posterior hidrólisis y determinación de azúcares reductores por DNS (Miller, 1959) a fin de obtener una curva de calibración. Para esto, se prepararon cinco soluciones de saponina estándar en concentraciones de 3, 6, 9, 12 y 16 g/L (p/v). De cada solución se tomaron 5 mL y se colocaron en vasos de precipitados de 100 mL, se añadieron 30 mL de agua destilada y 2 mL de HCl. Las mezclas se colocaron en una parrilla a 60-70°C y se taparon con papel aluminio, manteniéndose en agitación vigorosa durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, los vasos se transfirieron a un baño de hielo y posteriormente se ajustó el pH entre 6.5 y 7.2 con NaOH o HCl 1 M. Las soluciones se aforaron a 50 mL con agua destilada y posteriormente se realizó la determinación de azúcares reductores mediante la técnica de DNS (Miller, 1959). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

A fin de cuantificar sólo la cantidad de azúcares liberados por la hidrólisis de las saponinas, se preparó otra serie de soluciones de saponinas de *Q. saponaria* sin agregar HCl.

### **3.3.2.2 Curva de calibración de dextrosa**

Para la determinación se realizó una curva estándar de Dextrosa (Difco) a 2 g/L (p/v).

Para la determinación de la curva de dextrosa (Difco) se emplearon las siguientes concentraciones:

**Cuadro 1.** Curva de calibración de dextrosa.

<b>g/L</b>	<b>Estándar (µL)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (µL)</b>
0	0	500
0.4	100	400
0.8	200	300
1.2	300	200
1.6	400	100
2.0	500	0

Cada una de las concentraciones fue depositada en un tubo de ensayo de 13x100 mm, al cual se le agregó 500 µL de 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) y se agitaron con vórtex. Se incubó a baño maría por 5 min. Se dejó enfriar en un baño de hielo por 5 min. Se agregaron 5 mL de agua destilada y se mezcló en vórtex dejando reposar la reacción por 15 min. Se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Thermo Genesys 20). Se utilizó agua destilada como blanco de la reacción. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **3.3.2.3 Determinación indirecta de saponinas por colorimetría**

Tanto al extracto crudo (obtenido por solventes) como al extracto líquido (obtenido de la prensa directamente) se les realizó la hidrólisis de la misma forma que para las soluciones patrón de saponina estándar (*Q. saponaria*), con

la diferencia que se tomaron 5 mL del extracto líquido para realizar la prueba, y se determinó la concentración de azúcares reductores por DNS (Miller, 1959).

Para conocer la cantidad de saponinas presentes en los extractos de guishe se utilizó la siguiente ecuación:

$$AR_{\text{generados}} = AR_{\text{hidrólisis}} - AR_{\text{sin hidrólisis}}$$

donde:  $AR_{\text{generados}}$  es la concentración de azúcares reductores generados en g/L.

$AR_{\text{hidrólisis}}$  es la concentración de azúcares obtenidos a partir de la hidrólisis de las saponinas, y

$AR_{\text{sin hidrólisis}}$  es la concentración de azúcares libres.

Después de obtener los resultados de azúcares reductores generados mediante la interpolación con la curva de dextrosa, el resultado de la ecuación se interpoló con una curva de *Q. saponaria* contra azúcares. Mediante interpolación fue posible cuantificar de manera indirecta la concentración de saponinas presentes en los extractos de guishe. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **3.3.3 Determinación de saponinas en extracto de guishe por HPLC**

Los análisis cromatográficos se realizaron en las instalaciones del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) Unidad Saltillo. Para ello se empleó un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución Agilent Technologies de la serie 1200.

Para la separación de los compuestos presentes en los extractos de guishe, se usó una columna Zorbax SB- C<sub>18</sub> de 4.6 x 250 mm y partícula de 5 µm. Para la fase móvil se utilizó una mezcla en proporción de 50/50 % p/v de acetonitrilo

grado HPLC (Tedia) y ácido fosfórico 0.00025 N. La cantidad de extracto inyectada en cada corrida fue de 3  $\mu$ L con un tiempo de corrida de 25 minutos. La detección se realizó a una longitud de onda de 192.4 nm.

Antes de analizar los extractos sólidos y líquidos, se hicieron diluciones 1:10 con agua desionizada y fueron sometidos a ultrasonido durante 5 minutos. Posteriormente se pasaron por filtros de membrana para jeringa (Whatman) con un poro de 0.45  $\mu$ m.

### **3.4 Identificación de la sapogenina mayoritaria de guishe**

Para el aislamiento e identificación de la sapogenina mayoritaria presente en los extractos de guishe se realizó primero una hidrólisis ácida de las saponinas, seguido de la purificación de la sapogenina presente en mayor proporción por cromatografía en columna. Finalmente la identificación de este compuesto se realizó por Resonancia Magnética Nuclear.

#### **3.4.1 Hidrólisis del extracto de saponinas**

Se pesaron 0.5 g de extracto crudo de saponinas y se colocaron a reflujo con 2 mL de HCl durante 2 h. El extracto ya hidrolizado se filtró al vacío. El filtrado se depositó en un matraz y se le adicionó cloruro de etileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para identificar la fase orgánica más fácilmente. Inmediatamente después, el contenido del matraz se vertió a un embudo de separación para separar las fases orgánica e inorgánica. Para facilitar la separación se le agregó  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y posteriormente se agitó. Este proceso se repitió 3 veces. La fase inorgánica fue desechada. La fase orgánica se colocó en un matraz y se le agregó bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ). La mezcla se depositó en un embudo de separación para separar la fase orgánica de la inorgánica y nuevamente se desechó la fase inorgánica. La fase orgánica se pasó a un matraz, al que se le agregó sulfato de sodio ( $\text{NaSO}_4$ ) para la eliminación del agua. Después se filtró el  $\text{NaSO}_4$  en un embudo con un algodón para que éste fuera retenido. El líquido resultante se concentró en un

rotavapor (Buchi Rotavapor R-114) para eliminar el  $\text{NaSO}_4$  residual, posteriormente se sometió al vacío. El material resultante fue denominado extracto crudo de sapogenina.

### **3.4.2 Purificación de sapogenina mayoritaria**

Para la cromatografía en columna se utilizaron columnas de vidrio (ESEVE de diámetro de 14.5 mm y longitud de 23 mm) empacadas con gel de sílice grado 60 (230-400 mallas) de acuerdo a la técnica de cromatografía flash utilizando éter de petróleo de grado industrial previamente destilado.

Una vez preparada la columna, se colocó la muestra de extracto seco de sapogenina y posteriormente se agregó éter de petróleo hasta ser recuperado, utilizándose un sistema de bombeo. Se colocó algodón en la parte superior de la columna y se le agregó éter de petróleo hasta ser recuperado. Se adaptó un bulbo de 500 mL a la columna y se le agregó la mezcla eluyente que consistió en 7% de acetato de etilo y 3% de éter de petróleo (Figura 17).



**Figura 17.** Sistema de purificación de la sapogenina mayoritaria por cromatografía en columna.

Se obtuvieron varias fracciones, las cuales fueron muestreadas y leídas en placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor. Para su revelado las placas se sometieron a calcinación, previo tratamiento con ácido sulfúrico al 10% en metanol (v/v). Finalmente, las fracciones que presentaron la sapogenina mayoritaria se sometieron a concentración en rotavapor (Buchi Rotavapor R-114) con posterior tratamiento a vacío y se obtuvo la sapogenina mayoritaria pura.

### **3.4.3 RMN de la sapogenina mayoritaria**

Para la identificación de la sapogenina mayoritaria por resonancia magnética nuclear se utilizó un equipo VARIAN de 300 Mhz perteneciente al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Previo al análisis, se pesó la sapogenina pura y se disolvió en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Caracterización fisicoquímica de los extractos de guishe**

Después de la recolección y el prensado se obtuvo un líquido correspondiente al extracto de guishe recolectado en los meses de Marzo y Junio.

En el Cuadro 2 se presentan los resultados del análisis fisicoquímico realizado a las muestras de guishe recolectados en tres localidades del Estado de Coahuila (Parras de la Fuente, Ramos Arizpe y Saltillo), en dos épocas del año (marzo y junio).

En términos generales, en cuanto a la humedad (H), se observa una disminución de ésta en el mes de junio respecto a marzo. Lo anterior, independientemente de la localidad de origen. La razón de esta disminución se relaciona principalmente a que en el mes de junio el clima es mucho más seco y la planta ha perdido parte de sus reservas de agua. Los resultados en este parámetro están dentro del rango reportado previamente en otro trabajo de investigación, donde se encontraron valores entre 74 y 69 % de H (Hernández-Soto, 2005). De igual manera, el valor obtenido en este trabajo de tesis, concuerda con el determinado para bagazo de *Agave tequilana* Weber que fue del 71% (González-García *et al.*, 2005).

*Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave  
lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*

**Cuadro 2.** Análisis fisicoquímico de guishe de *Agave lechuguilla* de tres localidades de Coahuila recolectados en Marzo y Junio.

Parámetro	EP-PF	EP-PF	ET-RA	ET-RA	EB-S	EB-S
	Marzo	Junio	Marzo	Junio	Marzo	Junio
MST (%)	21.58	29.78	24.18	34.12	26.23	37.43
Humedad (%)	78.42	70.22	75.82	65.88	73.77	62.57
Cenizas (%)	3.93	4.68	3.05	4.24	6.25	7.22
Fibra cruda (%)	1.64	1.47	2.01	1.92	1.94	1.64
Extracto etéreo (%)	0.5	0.51	0.15	0.48	0.29	0.37
Proteína (%)	0.57	0.49	0.32	0.54	0.44	0.52
Azúcares totales (%)	24.88	15.83	15.83	7.34	9.52	7.52

EP-PF: Ejido El Porvenir, Parras de la Fuente  
 ET-RA: Ejido Tortuga, Ramos Arizpe  
 EB-S: Ejido Buñuelos, Saltillo.

Por otro lado, se observó un mayor contenido de azúcares en la muestra proveniente del Ejido El Porvenir, en Parras de la Fuente, para ambas fechas de muestreo. Esto se relaciona con el porcentaje de humedad (H), ya que esta misma muestra presentó el mayor contenido de agua, siendo los azúcares altamente solubles. Esta afirmación concuerda con los resultados generados para las muestras de Ramos Arizpe y Saltillo, las cuales presentaron contenido de azúcares de 15.83 y 9.52 %, y contenido de H de 75.82 y 73.77 %, respectivamente.

En general, el alto contenido de azúcares presentes en los jugos de guishe es indicativo del potencial de este material para la obtención de polisacáridos u oligosacáridos con posible aplicación en la industria agroalimentaria; así como en su factible aplicación en la producción de bioetanol, tal como se ha realizado con otros residuos agroindustriales tales como el bagazo de la caña de azúcar (Jackson de Moraes Rocha *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2012), desechos de zanahoria (Aimaretti *et al.*, 2012), cáscara de mandarina (Choi *et al.*, 2012), entre otros.

*Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave  
lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*

El porcentaje de extracto etéreo presente en las muestras, en general, fue bajo tanto en el primer muestreo (0.15-0.5 %) como en el segundo muestreo (0.37-0.51 %).

En cuanto al porcentaje de cenizas, se puede observar que en el mes de junio para las tres localidades hubo un aumento relativamente importante con respecto al mes de marzo. Además, se presentó variación en el contenido de cenizas según la zona de muestreo, siendo mayor para ambos muestreos en el municipio de Saltillo (6.25 y 7.22, marzo y junio, respectivamente). Esto se relaciona a las elevadas temperaturas que se presentaron en junio alcanzando hasta los 35°C y a la ausencia de precipitación (Cuadro 3), con la consecuencia de menos agua dentro de la planta, aumentando en proporción las cenizas así como los sólidos totales. Hernández (2005) reportó el contenido de cenizas para hojas de *Agave lechuguilla* entre 2.34 y 3.25%, lo cual es congruente con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

**Cuadro 3.** Historial meteorológico de marzo y junio de 2011.

	EP-PF Marzo	EP-PF Junio	ET-RA Marzo	ET-RA Junio	EB-S Marzo	EB-S Junio
Temperatura mínima	0	11	13	21	0	11
Temperatura Máxima	31	35	27	33	31	35
Precipitación	-	escaza	-	escaza	-	escaza

Fuente: [www.accuweather.com/es/mx](http://www.accuweather.com/es/mx)  
 EP-PF: Ejido El Porvenir, Parras de la Fuente  
 ET-RA: Ejido Tortuga, Ramos Arizpe  
 EB-S: Ejido Buñuelos, Saltillo

Cabe señalar que este es el primer estudio de caracterización de guishe, comparando tres de las localidades con mayor actividad talladora de *Agave*

lechuguilla de la región, en dos temporadas del año (marzo y junio). Los resultados de la caracterización demostraron diferencias importantes en las muestras obtenidas en Marzo con relación a las de Junio (Cuadro 2).

#### 4.2 Determinación indirecta de saponinas por colorimetría

Se realizó la determinación de la concentración de saponinas en la saponina cruda (en polvo) y de los extractos de guishe (líquido). Una vez establecido el método de cuantificación de saponinas se elaboró una curva de calibración, para relacionar la cantidad de azúcares generados por la hidrólisis del glicósido con la concentración inicial de saponinas, para lograr esto se interpoló con una curva de calibración de *Quillaja saponaria* (saponina triterpénica) (Figura 18).

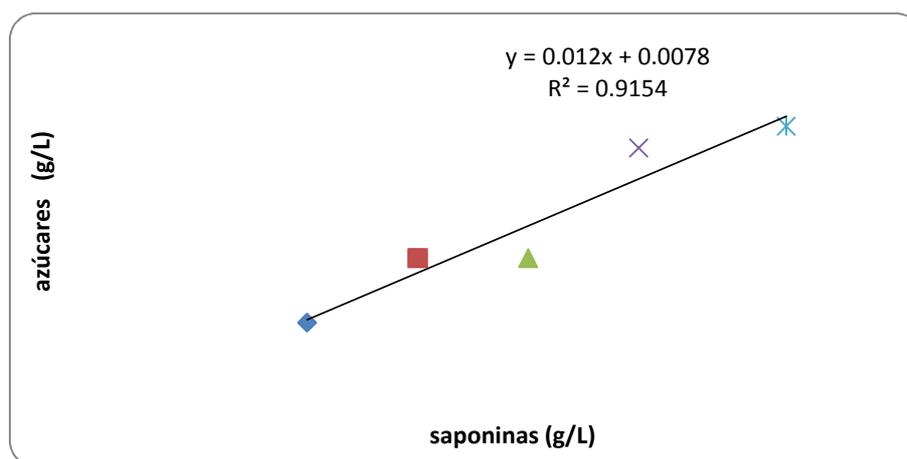
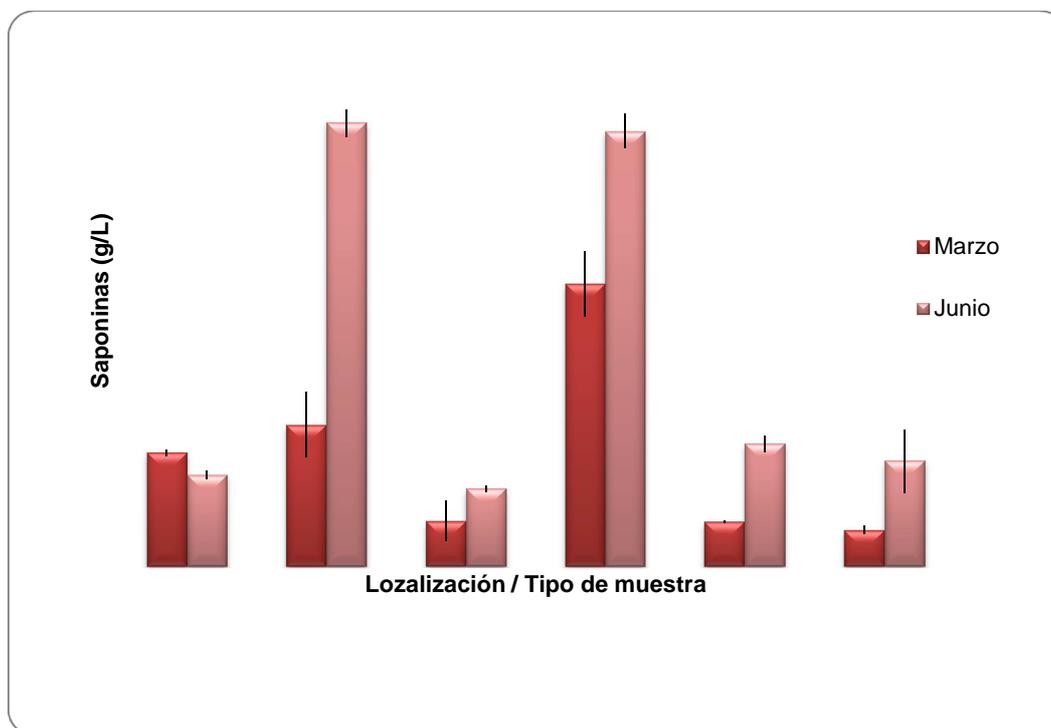


Figura 18. Curva de calibración de saponinas de *Quillaja saponaria* contra azúcares.

En la Figura 19 se presenta la comparación del contenido de saponina cruda determinada en los extractos obtenidos por extracción con disolventes. En todas las muestras de extracto crudo de saponina el contenido de saponinas (g/L) fue superior en el segundo muestreo (Junio), con valores de 98.43, 100.33 y 23.76 (g/L) para los ejidos Tortuga (Ramos Arizpe), El Porvenir (Parras de la Fuente) y Buñuelos (Saltillo), respectivamente. Destaca el contenido de saponinas en el extracto del Ejido El Porvenir de Parras de la Fuente, con un valor de 100.33 g/L. Es evidente que el tratamiento para la extracción de saponinas con solventes fue

eficiente, permitiendo la purificación en las muestras obtenidas de Parras de la Fuente y Ramos Arizpe, al determinarse un mayor contenido de saponinas en los extractos de saponina cruda que la detectada en las muestras de extracto líquido de guishe. Sin embargo, este comportamiento no se presentó en las muestras correspondientes al Ejido Buñuelos (Saltillo), presentándose inclusive menores rendimientos en el extracto crudo (8.19 y 23.76 g/L, marzo y junio, respectivamente) que en los extractos líquidos (10.09 y 27.71 g/L, marzo y junio, respectivamente). En general, se corroboró que la concentración de saponinas en las diferentes muestras está claramente influenciada por el lugar de origen de la muestra y por la fecha de recolección de la misma.



**Figura 19.** Comparación de composición de saponina (g/L) en las muestras de extracto líquido y saponina cruda en los meses de marzo y junio.

Los valores altos encontrados en las muestras recolectadas en Junio se debe a que esta es la época con menores precipitaciones del año en la zona, siendo que en la temporada de los muestreos estas zonas estaban pasando por una

sequía que ya llevaba varios meses (Martínez, 2011). De manera que la concentración de agua en la planta es menor y por tanto la concentración relativa de los fitoquímicos es mayor. Por otra parte, la escasez de agua en la zona de crecimiento de la planta, inhibe la presencia de otro tipo de vegetación, aumentando el riesgo de sufrir depredación. Así, la planta de lechuguilla tiende a aumentar su producción de algunos metabolitos secundarios, entre ellos las saponinas, para protegerse (Abdel *et al* 2002).

En cuanto a la ubicación, se encontró que la muestra que presentó mayor concentración de saponinas fue la recolectada en los Ejidos Tortuga de Ramos Arizpe y El Porvenir de Parras de la Fuente. Esto se explica en que dependiendo de la ubicación geográfica de la planta, ésta está sometida a diferentes condiciones de estrés ambiental (Dinan *et. al.* 2001).

#### **4.3 Determinación de la presencia de saponinas en extracto de guishe por HPLC**

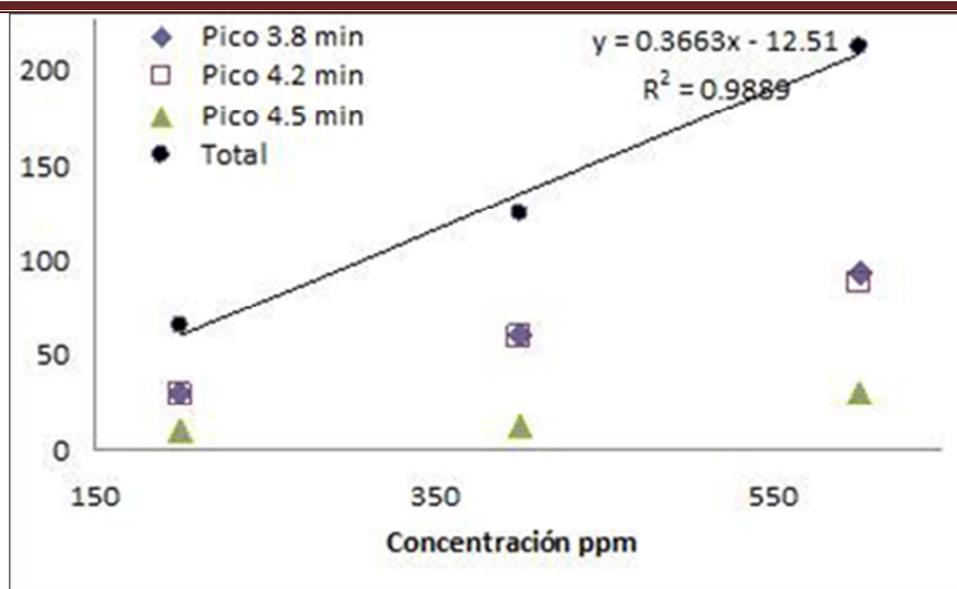
Adicional a la cuantificación indirecta de saponinas por el método colorimétrico, se llevó a cabo la cuantificación de saponinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Figura 20).



**Figura 20.** Equipo de Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

En la Figura 21, se presenta la curva de calibración de saponinas de *Q. saponaria* obtenida por HPLC. Con los datos arrojados se determinó la ecuación de la recta, para utilizarla en la interpolación de las muestras de extracto de saponina cruda analizadas. Sin embargo, al interpolar las áreas obtenidas para cada muestra (Cuadro 4), la concentración de saponina base *Q. saponaria* fue superior a la cantidad de muestra analizada. Lo anterior implica que no es posible utilizar la curva de *Q. saponaria* para determinar el contenido de saponinas en muestras de guishe. Este resultado se justifica con el hecho de que *Q. saponaria*, es un saponina de naturaleza triterpenoide (Kim *et al.*, 2006), mientras que, según reportes de literatura, las saponinas presentes en *A. lechuguilla*, y por consiguiente, en el guishe, son de tipo esteroideal (Dinan *et al.*, 2001; García-Contreras, 2010).

*Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*



**Figura 21.** Curva del estándar de *Quillaja saponaria* (SIGMA) obtenida por HPLC.

**Cuadro 4.** Concentración de saponina base *Quillaja saponaria* (mg/mg de muestra) en extractos de saponina cruda de guishe.

Localidad	Muestreo	Área de experimento (mAu)	Concentración saponina base <i>Quillaja</i> (mg/mg muestra)
Ejido Tortuga / Ramos Arizpe	Primero	46.68055	161.6
Ejido Porvenir / Parras de la Fuente	Primero	31.08437	119
Ejido Buñuelos / Saltillo	Primero	21.03187	91.6
Ej. Tortuga / Ramos Arizpe	Segundo	119.9126	361.5
Ejido Porvenir / Parras de la Fuente	Segundo	97.18041	299.5
Ejido Buñuelos / Saltillo	Segundo	100.25828	307.9

#### 4.4 Identificación de sapogenina mayoritaria de guishe por RMN

Posterior al aislamiento de sapogenina pura se determinó el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN). En las Figuras 22 y 23 se muestran los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ , respectivamente, obtenidos para la sapogenina mayoritaria. La interpretación de los espectros se realizó tomando como

*Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave  
techuquilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*

referencia datos bibliográficos reportados previamente para compuestos orgánicos (Agrawal *et al*, 1997). También se recurrió a otros experimentos como COSY, HMBC y HSQC.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  se pudieron observar un total de 25 señales que pudieron ser asignadas a 27 carbonos en la estructura del compuesto. De esa manera, pudo concluirse que la sapogenina mayoritaria, presente en el extracto seco de guishe es la esmilagenina. En el Cuadro 5 se presentan las asignaciones de las señales observadas en los espectros de la muestra analizada. De igual manera, y con fines de comparación, se presentan las señales reportadas en la bibliografía (Pawan *et al.*, 1997).

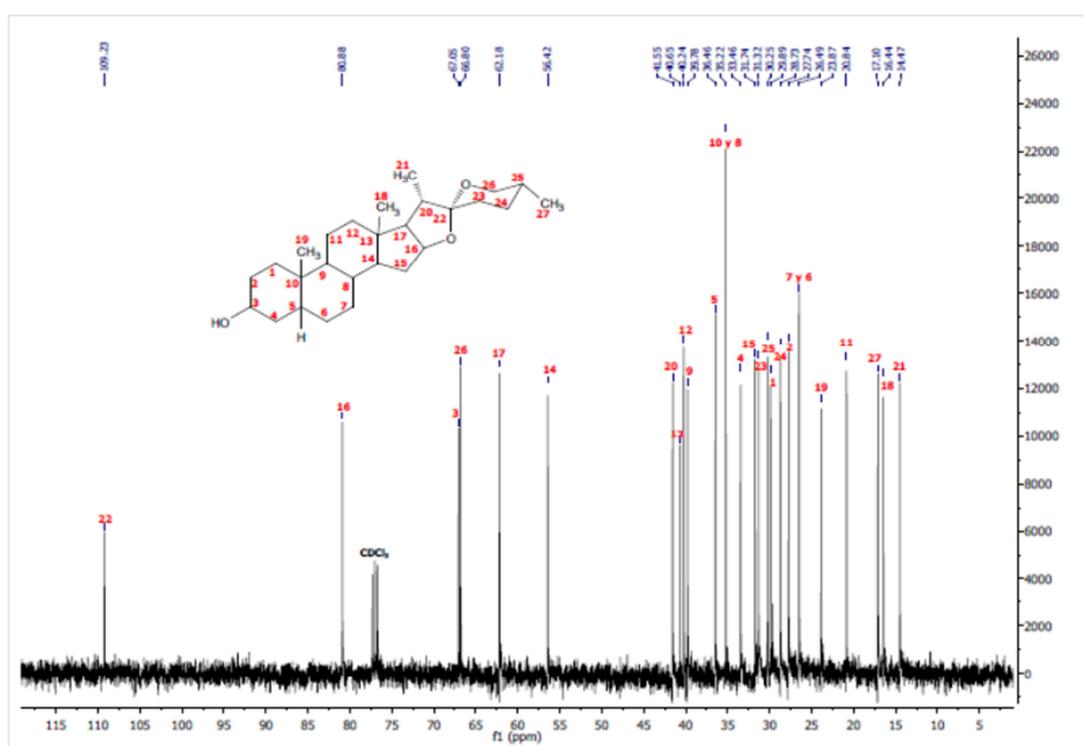
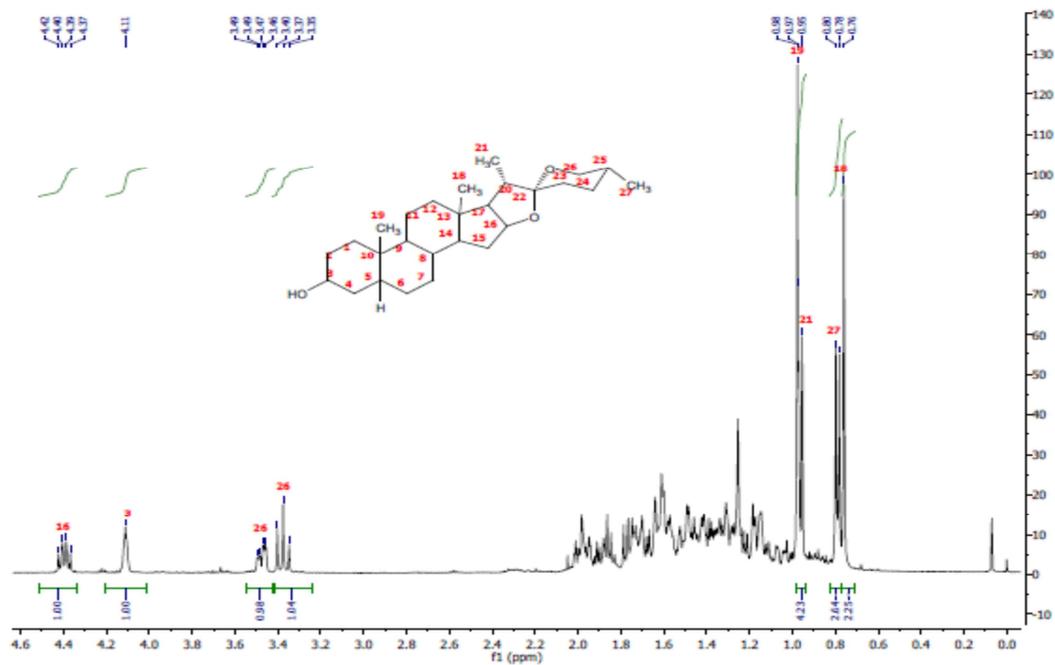


Figura 22. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de la sapogenina purificada.

*Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave  
lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*



**Figura 23.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de la saponina purificada

*Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave  
lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*

**Cuadro 5.** Asignación de RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  para esmilagenina.

Posición	$^{13}\text{C}$ *	$^{13}\text{C}$ **	$^1\text{H}$ *	$^1\text{H}$ **
1	29.95	29.89	1.40, 1.53	
2	27.82	27.74	1.46, 1.58	
3	67.12	67.05	4.11	4.11
4	33.54	33.46	1.33, 1.98	
5	36.58	36.46	1.72	
6	26.56	26.49	1.16, 1.91	
7	26.54	26.49	1.07, 1.46	
8	35.28	35.22	1.58	
9	39.85	39.78	1.33	
10	35.28	35.22	-	
11	20.90	20.84	1.25, 1.40	
12	40.30	40.24	1.16, 1.72	
13	40.70	40.65	-	
14	56.48	56.42	1.16	
15	31.80	37.74	1.25, 1.98	
16	80.93	80.88	4.40	4.40
17	62.27	62.18	1.77	
18	16.49	16.44	0.76	0.76
19	23.92	23.87	0.98	0.95
20	41.61	41.55	1.86	
21	14.51	14.47	0.97	0.97
22	109.26	109.21	-	
23	31.39	31.32	1.58, 1.67	
24	28.80	29.89	1.46, 1.64	
25	30.31	30.25	1.64	
26	66.86	66.80	3.38, 3.48	3.37, 3.49
27	17.14	17.10	0.79	0.78

\*Asignación reportada en la bibliografía (Pawan *et al.*, 1997) \*\*Asignación obtenida.

Para el análisis de  $^1\text{H}$  se omitió la asignación de 1-2 ppm ya que en esta zona aparecen 20 protones pertenecientes a varios metilenos, lo cual dificulta su asignación. Sin embargo, destacan señales características para la esmilagenina, como es el cuadruplete de  $\delta$  4.39 correspondiente a H-16, cuyo desplazamiento hacia campo bajo se explica por estar vecino a un oxígeno. También se observa el quintuplete de  $\delta$  4.11 que pertenece H-2, cuyo desplazamiento a campo bajo se debe a la presencia del grupo hidroxilo. Por otro lado, es evidente el ddd (doble doble doblete) en  $\delta$  3.47 y el triplete a  $\delta$  3.37, ambos característicos de H-21 ya que hay acoplamientos con H-23 observados en el experimento COSY, el doblete de  $\delta$  0.98 asignado a H-28, el singulete de  $\delta$  0.95 perteneciente a H-30, el doblete en  $\delta$  0.80 correspondiente a H-26 y finalmente el singulete en  $\delta$  0.78 asignado a H-29, además de que todos estos coincidieron con lo reportado en la bibliografía (Agrawal *et al*, 1997).

## **5. CONCLUSIONES**

- Se corroboró que la concentración de saponinas en las diferentes muestras está claramente influenciada por el lugar de origen de la muestra y por la fecha de recolección de la misma.
- Se confirma que el guishe puede ser usado como fuente potencial de obtención de saponinas de tipo esteroidal. Y que para fines prácticos, el guishe obtenido del tallado en época de sequía es mejor por su alto contenido en estos metabolitos.
- La sapogenina mayoritaria presente en los extractos de guishe es la esmilagenina, cuya identificación se realizó por RMN.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

- Abdel-Khalik, S.M, Miyase, T., Melek, F., Shabraway, O.A., Mahmoud II, Mina S.A. 2002. New steroidal saponins from *Agave lophantha* Schiede and their pharmacological evaluation. *Pharmazie*. 562-6.
- Agrawal, P.K Jain, D.C. 1992. <sup>13</sup>C RMN spectroscopy of olean triterpenoids. *NMR Spectroscopy* 1-90.
- Agrawal, P.K. 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 3307-3330.
- Agrawal, P.K., Bunsawansong P., Morris G.A. 1997. Magnetic Resonance in chemistry, 441-446.
- Aimaretti, N., Ybalo, C.V., Rojas, M.L., Plou, F.J., Yori, J.C. 2012. Production of bioethanol from carrot discards. *Bioresource technology* 123, 727-732.
- Anisimov, M. y Chirva, V.C. 1980. Die biologische Bewertung von triterpenglycoside. *Pharmazie*, 35, 731-738.
- AOAC Official Methodos of Analisis. 1996. Association of Official Analitical Chemist. 16 edición.
- Aoun, M., Amiand, G., Garres, P., Biode, P. 2003. Food supplement used in feed formulations in rummians. WO patent 03/056935 A1.
- Balandarin, M.F.1996. Commercial utilization of plant-derived saponins: An overview of medicinal, pharmaceutical, and industrial applications. Plenum Press, New York, 1-14.
- Belmares, H., Castillo, J.E., Barrera, A. 1979. Natural hair fibers of the North American continent. Statistical correlations of physical and mechanical properties of lechuguilla (*Agave lechuguilla*) fibers. *Textile Research Journal* Vol 49, 619-622.
- Berlanga, R.C. y González, L.A. 1992. Metodología para la evaluación y manejo de lechuguilla en condiciones naturales. Folleto técnico num. 1. Instituto

- Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, SARH. Saltillo, Coahuila 21.
- Birk, Y. y Peri, I. 1980. Saponins. In: Liener, I.E(Ed.), Toxic Constitutents of plant food stuffs. 2nd edition. Academic Press, New York, 161-182.
- Blunden, G., Culling, M.C., Jeweis, K. 1975. Steroidal sapogenins: a review of actual and potential plant sources. Vol 17 139-154.
- Blunt, J.W. y Munro, M.H.G. 1980. <sup>13</sup>C RMN spectra of some tetra-and pentacyclic triterpene methyl ethers. Organic Magnetic Resonance 13, 26-27.
- Brown, R. 1998. The natural way in cosmetics and skin care. Chemical market reporter 2, 254.
- Bruneton, J. 1991. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Segunda edición, Editorial Acribia, España, 305-324.
- Cheeke, P.R. 1999. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. Proceedings of the American society of animal science. <http://asas.org/JAS/symposia/proceedings/0909.pdf>
- Choi, I.S, Kim, J.H., Wi, S.G., Kim, K.H., Bae, H.J. 2012. Bioethanol production from mandarin (*Citrus unshiu*) peel waste using popping pretreatment. *In press*. Applied energy.
- Dewick, P.M. 2002. Medical natural products a biosynthetic approach. Second edition, Ed. John Wiley and sons. LTD. UK, 167-241.
- Dias, M.O.S., Junqueira, T.L., Rossell, C.E.V., Filho, R.M., Bonomi, A. 2012. Evaluation of process configurations for second generation integrated with first generation bioethanol production from sugarcane. *In press*. Fuel processing technology.
- Dinan L., Harmatha J. and Lafont R. 2001. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. Journal of chromatography A. 935, 105-123.

- Doddler, D.M., Khong, P.H, Lewis, K.G. 1974. The stereochemical dependence of  $^{13}\text{C}$  chemical shifts and structural assignment. *Tetrahedron Letters* 27, 2381-2384.
- Domínguez, X.A. 1973. Métodos de investigación fisicoquímica. Primera edición. Limusa, México, 149-158.
- Domon, B. y Hostettmann, K. 1983. Saponins with molluscidal properties from *Lonicera nigra* L. *Helv. Chim acta* 66. 422-428.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, P., Rebers, P., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical chemistry* 28 (3), 350-356.
- Elguero J., Alkorta, I., Pardo, C., Claramunt, R., Santa María, M.D. 2004. Resonancia Magnética Nuclear de protón: aplicaciones en química orgánica. Madrid España, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia. [www.uned.es/dpto-quim-org-bio/pdf/RMN%20Parte1.pdf](http://www.uned.es/dpto-quim-org-bio/pdf/RMN%20Parte1.pdf)
- Flores, F.J. y Perales, G.J. 1989. Primer reporte nacional de las plagas asociadas a la lechuguilla *Agave lechuguilla* Torrey. *Revista Agraria* 5, 57-73.
- Flores, M.N., 1991. Aislamiento e identificación de saponinas presentes en el *Agave lechuguilla*. Tesis Maestría, Universidad de Guadalajara, México. pp. 7-20
- Francis, G., Kerem, Z., Harinder, P., Makkar, Klaus, B. 2002. The biological action of saponins in animal systems: A review. *British Journal of Nutrition* 88, pp. 88, 587–605.
- Galindo, F.W., Rosales, M., Murgueito, E., Larrahondo, J. 1989. Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarraton. *Livestock research for rural development* 1, 1-15.
- García-Contreras, A. R. 2010. Extracción, cuantificación y aislamiento de saponinas a partir de *Agave lechuguilla* y *Yucca filifera*. Tesis de

- licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila.
- González-García, Y., González-Reynoso, O., Nungaray-Arellano, J. 2005. Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. e-Gnosis Vol 3. Art.14.
- Granados, S.D. 1999. Los Agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo, México, 1-41.
- Gubanov, I.A., Libizov, N.L., Gladkikh, A.S. 1970. Search for saponin containing plants among the flora of central Asia and Southern Kazakhstan. Farmatsiya, 19, 23-31.
- Hardman, R. 1975. in Board of Pharmaceutical Sciences (Editor), Conception and Contraception, Excerpta Medica, Amsterdam. 60.
- Henderson, G.M. 2001. Bio-enhancer. US Patent 6,228,265 B1.
- Hernández, R., Lugo, E.C., Díaz, L., Villanueva, S. 2005. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. e-Gnosis [online], 3 (11), 1116-5745.
- Hernandez-Soto, R. 2005. Extracción y cuantificación de compuestos bioactivos de *Agave lechuguilla* Torrey para su aplicación en la industria cosmetología. Tesis de Maestría, Ciatej, A.C. 67-99.
- Hiai, S., Oura, H., Nakajima, T. 1976. Colour reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. Planta Med, 29 166-122.
- Hostettmann, K. y Marston, A. 1995. Chemistry and pharmacology of natural products. Journal of natural products, 26. New York.
- Ibanoglu, E. y Ibanoglu, S. 2000. Foaming behavior of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract. Food Chem. 70, 333-336.
- Ibarra A.E. 2005. Extracción, cuantificación e identificación de saponinas en ajo genéticamente seleccionado. Tesis Licenciatura. Universidad de Guadalajara.

- Ishii, H., Tori, K., Tozyo, T., Yoshimura, Y. 1984. Saponinas de raíces de *Platycodon grandiflorum*. Parte 2. Aislamiento y estructura de glicósidos triterpenicos. Chem. Soc. Perkin Trans 661-668.
- Ishii, H., Tori, K., Tozyo, T., Yoshimura, Y. 1978. Estructura de poligalacin D y D2, platycodin-D y D2 y sus monoacetales. Saponinas aisladas de *Platycodin grandifloru*, determinadas por <sup>13</sup>C RMN. Chem. Lett. 26, 674-677.
- Jackson de Moraes Rocha, G.J., Martin, C., Barbosa Soares, I., Souto Maior, A.M., Macedo Baudel, H., Moraes de Abreu, C.A. 2011. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. Biomass and bioenergy 35, 663-670.
- Jensen, J.M. y Elgaard, T. 2001. Natural feed additive, a method of preparing said feed additive, a feed mixture containing the feed additive as well as a method of breeding farm animals. EP Patent 1. 129,627.
- Jongitud E. 2005. Vivir de la lechuguilla, una opción para los habitantes del semidesierto. México forestal, revista electrónica de la Comisión Nacional. <http://www.mexicoforestal.gob.mx>.
- Kawai, H., Kuroyanagi, M., Umehara, K., Ueno, A., Satake, M. 1988. Studies on the saponins of *Lonicera japonica* THUNB. Chem. Pharm. Bull., 36, 4769-4775.
- Kawasaki, T. y Miyahara, K. 1963. Thin layer chromatography of steroid saponins and their derivatives. Chem. Pharm. Bull., 11 1546-1550.
- Kellerman, T.S., Erasmus, G.L., Coetzer, J.A., Brown, J.M., Maartens, B.P. 1991. Photosensitivity in South Africa. VI. The experimental induction of geeldikkop in sheep with crude steroidal saponins form *Tribulus terrestris*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 47, 231-261.
- Kensil, C.R., Mo, A.X., Trunch, A. 2004. Current vaccine adjuvants: an overview of a diverse class. Frontiers in Bioscience 9, 2972-2988.
- Kensil, C. A. y Marciani, D. J. 1991. Saponin adjuvant. US Patent 5,057,540.

- Kim Y., Wang P., Navarro-Villalobos M., Rohde B.D., Derryberry J., Gin D.Y. 2006. Synthetic studies of complex immunostimulants from *Quillaja saponaria*: synthesis of the potent clinical immunoadjuvant QS-21Aapi. J Am Chem Soc. 128 (36), 11906-11915.
- Kofler, L. 1927. Die Saponine. Jultus Springer Verlag, Vienna. Mol Eco 14, 1811-1820.
- Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia. Primera edición. Editorial Omega, Barcelona España, 146-153.
- Lacaille-Dubois, M.A. y Wagner, H. 1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine 2 (4), 363-368.
- Malcolm, C. 1995. Teetertottering between synthetic and natural. DCI Vol 156 50.
- Martínez, Z. 2011. Tallador del Ejido Tortuga, Ramos Arizpe, Coahuila, México.
- Martínez-Hernández A, Pastrana-Chávez J, Sánchez-Villarreal A, Lara-Reyna Herrera Estrella L, Herrera-Estrella A, Martínez de la Vega O, Simpson-Williamson, J. 2007. Genómica de *Agave tequilana* identificación de genes útiles para la industria tequilera y el desarrollo de usos alternativos del agave. Colegio de Postgraduados campus Campeche –CINVESTAV-IPN campus Guanajuato. 1-16.
- Milgate, J. y Robert, D.C.K. 1995. The nutritional and biological significance of saponins. Nutr. Res., 15: 1223-1249.
- Miller, G.L 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31, 426-428.
- Mitra, S. y Dungan, S.R. 2000. Micellar properties of quillaja saponin. 2. Effect of solubilized cholesterol on solution properties. Colloids and surface B: biointerfaces 17, 2, 117-133.
- Nobel P. y Quero, E. 1986. Enviromental productivity indices for a Chihuahuan Desert CAM plant, *Agave lechuguilla*. Ecology 67, 1-11
- Oakenfull, D. 1981. Saponins in food a review. Food Chem. 6, 19-40.

- Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitani, T. and Yoshikawa, M. 2000. Adjuvant and hemolytic activities of 47 saponines derived from medicinal and food plants 1, 67-74.
- Orozco, L.M., Nava, C.R., Medina, T.J.G., De la Cruz, J.A. 1977. Investigación silvoagropecuaria de las zonas áridas de México, campo experimental Noria de Guadalupe. Monografía Técnico-Científica, UAAAN 3:182-265.
- Patamalai, B., Hejtmancik, E., Bridges, C.H., Hill Camp, D.W.B.J. 1990. The isolation and identification of steroidal sapogenins in kleingrass. *Veterinary and Human Toxicology* 32(4), 314-318.
- Pawan, K., Agrawal., Bunsawansong, P., Morris, G. 1997. Complete Assignment of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of steroidal sapogenins: Smilagenin and Sarsapogenin. *Magn. Reson. Chem* 35. 441-446.
- Price, K.R., Johnson, I.T., Fenwick, G.R. 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feeding stuffs 1, 27-135.
- Reyes, A., Aguirre, R., Peña, V. 2000. Biología y aprovechamiento de *Agave lechuguilla* Torrey. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 67, 75-78.
- Roy, D., Kommalapati, R.R., Mandava, S.S., Valsaraj, K.T., Constant, W.D. 1997. Soil washing potential of a natural surfactant. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 670–695.
- Rubison, J. y Rubison, K. 2000. *Química analítica contemporánea*. Editorial Prentice Hall. Hispanoamericana. Primera edición, México D.F., 6. 331-333.
- SAGARPA. 2009. Estudio orientado a identificar los mercados y canales de comercialización internacionales para la oferta de productos de ixtle con valor agregado. [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios\\_promercardo/IXTLE.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercardo/IXTLE.pdf)
- San Martín, R. y Briones, R. 1999. Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria*. *Economic Botany*, 3 .302-311.

- Sarnthein-Graf, C. y La Mesa, C. 2004. Association of saponins in water and water gelatin mixtures. *Thermochim. Acta* 418, 79-84.
- Silva-Montellano A. y Eguiarte, L.E. 2003. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral characteristics, visitors, and fecundity. *American Journal of Botany* 90, 377-387.
- Tori K., Seo, S., Shimaoka, A., Tomita, Y. 1974.  $^{13}\text{C}$  RMN spectro of olean-12 enes. Full signal assignments including quaternary carbon signals assigned by use of direct  $^{13}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  spin couplings. *Tetrahedron Lett* 48, 4227-4230.
- Uribe, L. 1987. Métodos usados para la determinación de saponinas (trabajo monográfico). Tesis Licenciatura. Facultad de Química UNAM, México.
- Wall, M.E., Warnock, B.H., William, J. 1962. Steroidal saponins. Their occurrence in *Agave lechuguilla*. *Economic Botany* 16. 226-229 pp.
- Wang, Z., W., Gu, M.-Y, Li, G.-Z. 2005. Surface properties of gleditsia saponin and synergisms of its binary system. *Journal of Dispersion Science and Technology* 3, 341-347.
- [www.accuweather.com/es/mx](http://www.accuweather.com/es/mx)
- Yamauchi, Y., Katsunori, K., Hideki, H. 2000. Vegetable growth regulator. JP. Patent 2,000,119,118.
- Yang, Ch., Zhang y., Jacob M., Khan s., Zhang Y., Li X. 2006. Antifungal activity of C27 steroidal saponins, *Antimicrobial and chemotherapy*, 50, 1710-1714.
- Zapién, B.M. 1981. Evaluación de la producción de ixtle de lechuguilla en cuatro sitios diferentes. Primera reunión nacional sobre ecología manejo y domesticación de las plantas útiles del desierto. Publicación especial num.31 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, SARH. México DF, 385-388.
- Zhang, Y. 1999. Animal feed compositions and uses of triterpenoid saponin obtained from *Camellia L.* plants US. Patent 6,007,822.