

CAPITULO II
ANTECEDENTES

CAPITULO II

2. ANTECEDENTES

El estudio de los *Agaves* es de gran importancia debido a su uso tradicional como medicamento en diferentes culturas como la de la India y México. Los *Agaves* se utilizan como diuréticos, antisifilítico, laxantes, antiescorbútico y anticancerígenos por lo que lo convierte en una excelente especie para el estudio fitoquímico (Ding, 1992). Sus hojas o pencas son fuente importante de metabolitos secundarios pudiendo encontrarse especialmente saponinas, saponinas esteroidales y flavononas. El aislamiento y caracterización de estos compuestos es de gran importancia ya que conociendo su estructura podemos entender su interacción con otras moléculas en el cuerpo humano y si en realidad la planta tiene las propiedades que popularmente se le adjudican. Es indispensable realizar este tipo de estudios ya que podrá validar científicamente las propiedades medicinales de las plantas y descubrir sustancias activas a partir de plantas no estudiadas previamente.

2.2 Métodos generales de extracción y purificación

La farmacognosia se ocupa del estudio de la composición y los efectos de los principios activos y sustancias naturales de origen vegetal y animal. Éste se concentra en realizar ensayos para la caracterización y valoración de estas sustancias, así como determinar la actividad farmacológica y las principales aplicaciones que podría tener. Los vegetales constituyen un amplio campo en la investigación farmacológica con grandes posibilidades para llegar al conocimiento de nuevas drogas. Las plantas medicinales estudiadas a través de la farmacognosia elaboran en su metabolismo una serie de

sustancias que van a tener diferente interés en función de su utilidad, a estos se les llama principio activo. Este es una sustancia pura, principalmente responsable de las acciones y efectos farmacológicos que posee la droga y por lo tanto de su uso terapéutico, pudiendo servir para la elaboración de medicamentos. Los principios activos son en general metabolitos secundarios relativamente estables que se pueden encontrar tanto en la planta fresca como en la planta desecada. (Villar del Fresno, 1999)

En la investigación fitoquímica principalmente se utilizan métodos de separación, fundamentalmente cromatográficos, y métodos de elucidación estructural, principalmente espectroscópicos. La experimentación con la planta comienza con la extracción de los metabolitos que se encuentran disueltos en el citoplasma de la célula vegetal o formando sales que se encuentran incrustadas en las células. Después de triturada la planta se lleva a un proceso de maceración en donde el material vegetal está en contacto con un disolvente. Otro método de extracción de compuestos es utilizando diferentes disolventes con polaridad creciente empezando con hexano y aumentando la polaridad hasta llegar al acetato de etilo para arrastrar sustancias de polaridad intermedia, terminando con el empleo de alcohol que extrae del vegetal compuestos más polares. Este procedimiento ayuda a que la extracción con diferentes polaridades arrastre diferentes metabolitos secundarios y de esta forma poder purificarlos más fácilmente. (Villar del Fresno, 1999)

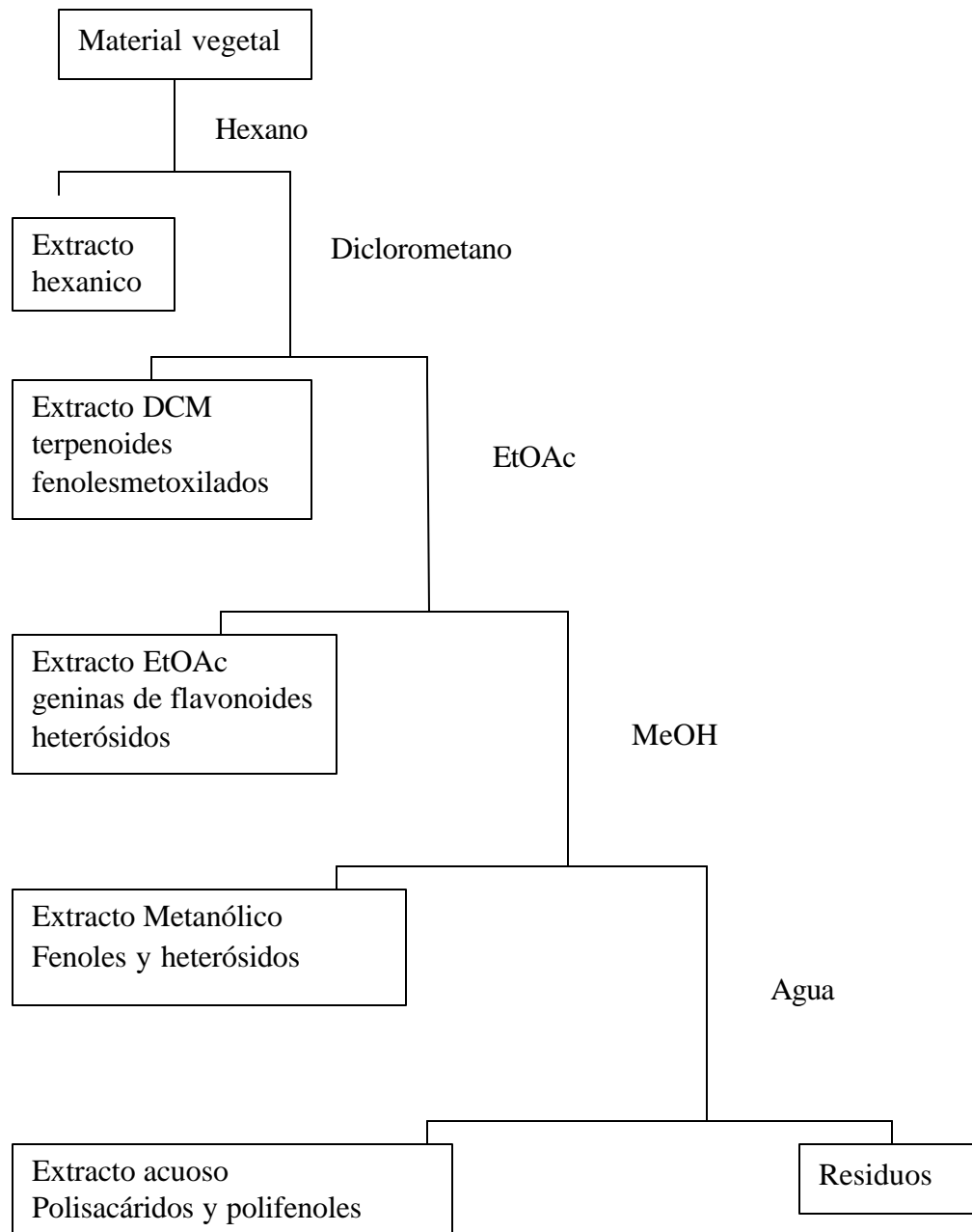


Fig 2.1 Extracción por disolventes de polaridad creciente (Villar del Fresno, 1999)

2.2.1 Cromatografía:

Existen varios métodos de separación, entre los más usados se encuentran la sublimación, destilación, cromatografía y la cristalización fraccionada. El método más utilizado es la cromatografía, esta técnica se usa para obtener los componentes individuales puros de una mezcla y también para determinar la proporción de estos

componentes. En la cromatografía, las moléculas se distribuyen entre dos fases distintas, y la separación tiene relación directa con la diferencia de solubilidad que algunas moléculas muestran en cada fase. Las separaciones se obtienen al introducir compuestos orgánicos en una fase estacionaria y dejando luego que una fase móvil fluya a través de la mezcla. Cada componente interactúa con la fase estacionaria y se disuelve en la fase móvil en diferente medida. Los compuestos unidos con menos fuerza a la fase estacionaria y más solubles en la fase móvil recorren una distancia mayor que los demás componentes. Los diversos métodos cromatográficos difieren con respecto a la fase móvil (líquido o gas), la fase estacionaria (papel, gel o empaque sólido) y la fuerza que impulsa a la fase móvil (presión, gravedad o un campo eléctrico). (Fox, 2000)

Existen diferentes métodos cromatográficos en los que podemos encontrar a la cromatografía en papel. Este se aplica a productos polares como carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y fenoles, la separación se realiza sobre tiras de papel poroso, participando tanto fenómenos de partición como de adsorción. La cromatografía en capa fina se emplea para la separación de mezclas de toda clase de productos naturales y las condiciones de separación se eligen en función de las características de la mezcla a separar. También se utiliza la cromatografía en columna que involucra la adsorción de un compuesto a una fase estacionaria y la elución de éste con disolventes de diferente polaridad. Se emplea al igual la cromatografía flash que tiene el mismo principio que la cromatografía en columna aplicando una presión en la parte superior. Entre otras podemos nombrar la cromatografía líquida de baja y mediana presión, cromatografía gas-líquido, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía en contra corriente por goteo (Villar del Fresno, 1999)

2.2.2 Espectroscopia:

La espectroscopia comprende un conjunto de técnicas que miden la respuesta de una molécula a la aportación de energía. El espectro resultante es una serie de bandas que muestran la magnitud de la respuesta en función de la longitud de onda de la energía incidente. La fuente de energía puede ser de fotones ópticos (espectroscopia ultravioleta, visible e infrarroja) o de energía de radiofrecuencia (espectroscopia de resonancia magnética nuclear). Esta técnica se utiliza una vez que la mezcla se haya separado en sus componentes y de esta forma interacciona con la radiación electromagnética. (Fox, 2000)

2.2.3 Resonancia Magnética Nuclear:

Un núcleo que contiene un número impar de protones o de neutrones tiene espín nuclear y es magnéticamente activo. Estos núcleos se comportan como si giraran en torno a un eje y se comporta como si fuera un imán diminuto. Cuando un núcleo con un espín neto se coloca en un campo magnético grande, su orientación con respecto al campo magnético externo define estados de energía cuantizados para el núcleo, en el caso de ^1H la alineación puede ser a favor o en contra del campo externo. Los núcleos se pueden inducir a saltar de un estado de espín de baja energía a uno de mayor energía por medio de energía electromagnética de una frecuencia tal que coincida con la diferencia de energía entre los dos estados. A la inversa, cuando un núcleo en el estado de mayor energía cae al estado de más baja energía, se emite energía electromagnética de esa frecuencia. El espín que da origen a ambos estados es una propiedad del núcleo del átomo, y la técnica se conoce como RMN. (Fox, 2000)

2.2.3.a Espectroscopia de RMN de ^1H :

Las señales de los protones en los espectros de RMN de ^1H , como las de los carbonos en RMN ^{13}C , se registran como máximos de absorción individuales correspondientes a los núcleos no equivalentes. Este tipo de espectro proporciona cuatro elementos de información importantes: el número de señales distintas, el desplazamiento químico, el patrón de desdoblamiento y la integración de la intensidad de las señales. (Fox, 2000)

2.2.3.b Espectroscopia de RMN de ^{13}C desacoplado:

Este espectro proporciona dos elementos básicos de información: el número de señales distintas, que corresponde al número de tipos diferentes de átomos de carbono, y el desplazamiento químico de cada señal, que está determinado por el entorno molecular de cada carbono. (Fox, 2000)

2.3 Estudios fitoquímicos realizados.

Se han realizado diversos estudios fitoquímicos de diferentes especies de *Agaves* y se han aislado diferentes metabolitos secundarios como saponinas, esteroides, flavonoides y glicósidos principalmente. Palacios encontró en el jugo de las pencas del *Agave americana*: potasa, cal, ácido sulfúrico, clorhídrico, malato ácido de cal y una sustancia que cristaliza en forma de agujas entrelazadas. (Martínez, 1990)

Los *Agaves* contienen una gran cantidad de saponinas en sus pencas, por esta misma razón la investigación de esta planta se ha enfocada en la purificación y elucidación de estos compuestos. Las saponinas son glicosilados, se forman por resultado de la hidrólisis ácida o enzimática y según su esqueleto de carbono se pueden clasificar como spirostane, furostane y furospirostane; se caracterizan por su unión con el

colesterol. Se dividen principalmente en 3 grupos: triterpenos, esteroides básicos y saponinas esteroidales. Existen varias investigaciones enfocadas en la distribución, aislamiento y caracterización de saponinas y estas involucran la hidrólisis ácida seguida de la caracterización de la aglicona. Al igual se puede utilizar RMN ^{13}C como una técnica no destructiva de caracterización de una saponina. (Agrawal, 1985)

Los estudios realizados a través de los años se enfocan principalmente a ciertos *Agaves* por su importancia cultural. El *Agave sisalana* ha sido estudiado desde los 80's hasta nuestros días por su importancia como fuente de fibra y hormonas esteroidales en el sur de China. Este *Agave* ha sido estudiado principalmente por el Dr Ding y sus colaboradores donde a partir de extractos metanólicos fermentados de las pencas del *A. sisalana* se ha aislado y elucidado, desde 1989, cinco tiogeninas. En 1989 se aislaron dongsides E, D y C y fueron caracterizados como tiogenina-3-O- β -D-xilopiranosida(1 \rightarrow 2)[β -D-glucopiranosida(1 \rightarrow 3)] β -D-glucopiranosida(1 \rightarrow 4) β -D-galactopiranosida, como dongsides E, tiogenina-3-O- β -D-xilopiranosida(1 \rightarrow 3) β -D-xilopiranosida(1 \rightarrow 2)[β -D-glucopiranosida(1 \rightarrow 3)] β -D-glucopiranosida(1 \rightarrow 4) β -D-galactopiranosida, como dongsides D, y tiogenina-3-O-a-L-ramnopiranosida(1 \rightarrow 4) β -D-xilopiranosida(1 \rightarrow 2)[β -D-glucopiranosida(1 \rightarrow 3)] β -D-glucopiranosida(1 \rightarrow 4) β -D-galactopiranosida. En 1992 el Dr. Ding publicó otro artículo donde explica la continuación de su trabajo con el *A. sisalana* en donde aisló dos saponinas esteroidales mas llamándolas dongsides A y B. Se caracterizaron como tiogenina-3-O-a-L-ramnopiranosida(1 \rightarrow 4) β -D-glucopiranosida(1 \rightarrow 2)[β -D-glucopiranosida(1 \rightarrow 3)] β -D-glucopiranosida(1 \rightarrow 4) β -D-galactopiranosida, como dongsides A y tiogenina-3-O-a-L-ramnopiranosida(1 \rightarrow 4) β -D-glucopiranosida(1 \rightarrow 2)[β -D-xilopiranosida(1 \rightarrow 3)] β -D-

glucopiranosida(1? 3)] β -D-glucopiranosida(1? 4) β -D-galactopiranosida, como
dongside B.

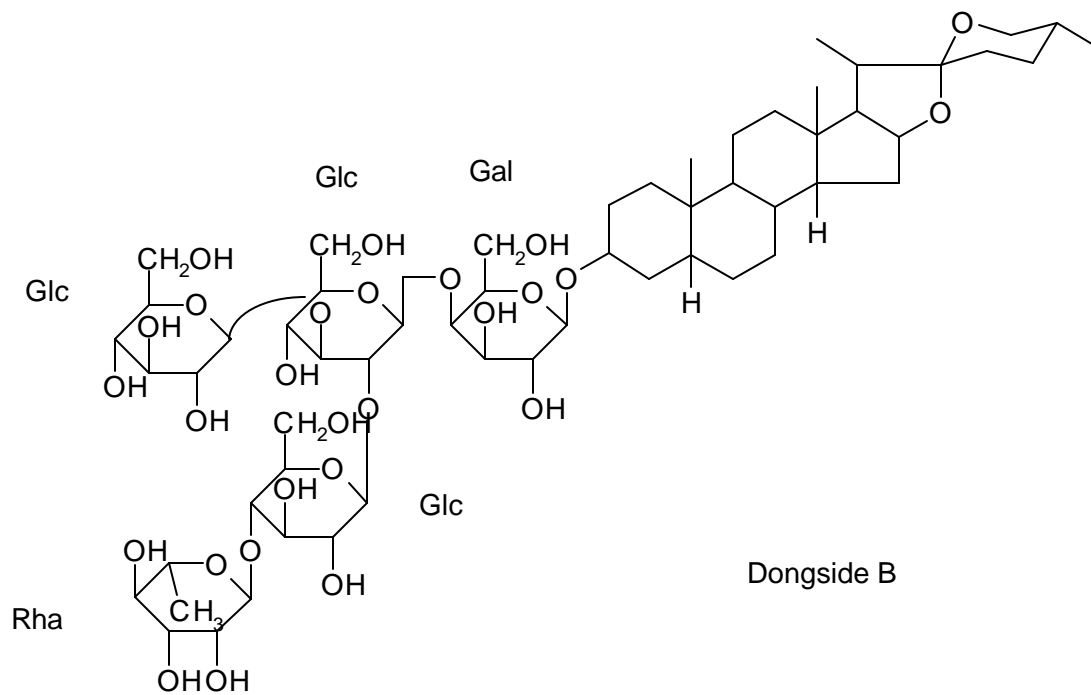
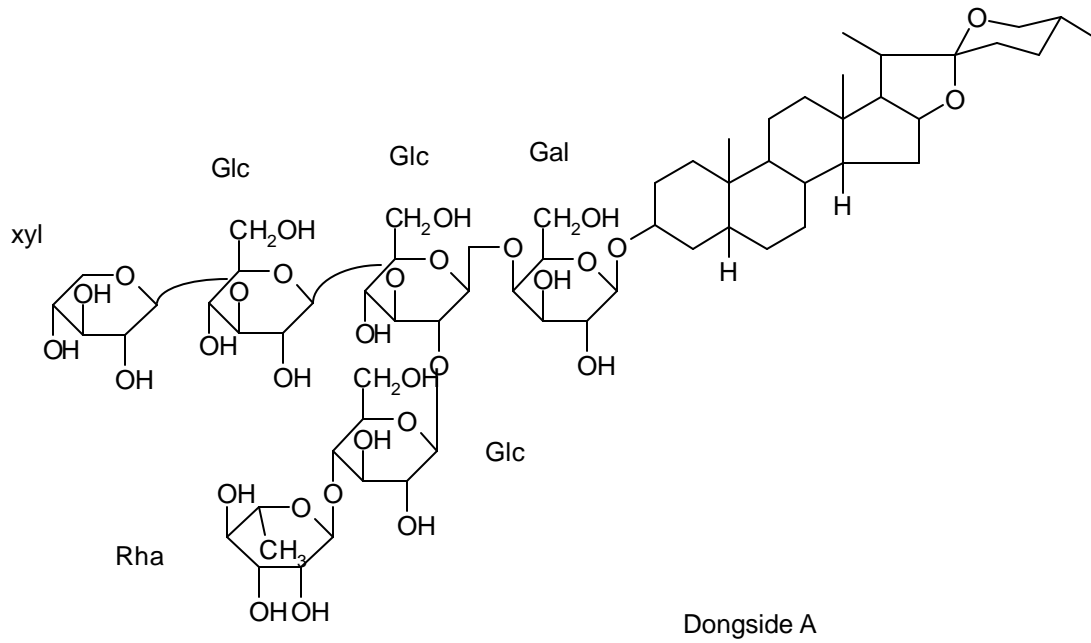
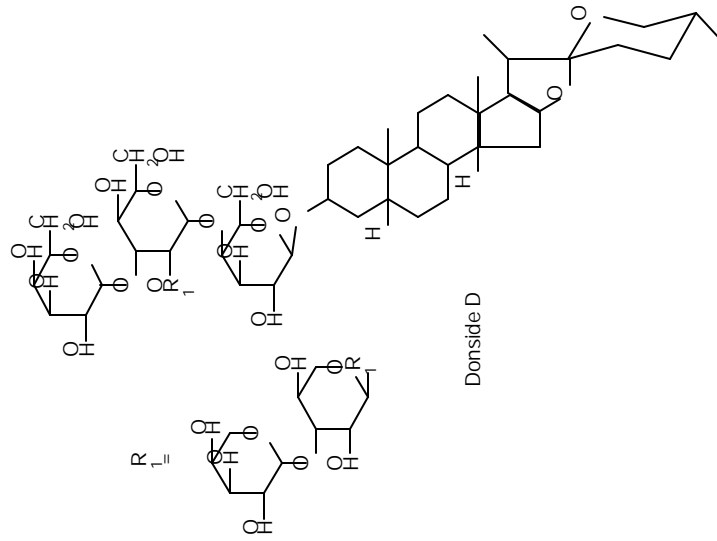
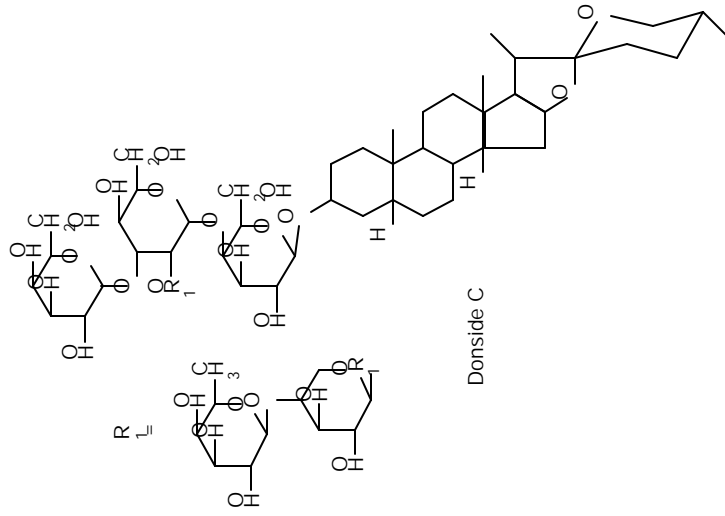


Fig. 2.2 Dongside A y B



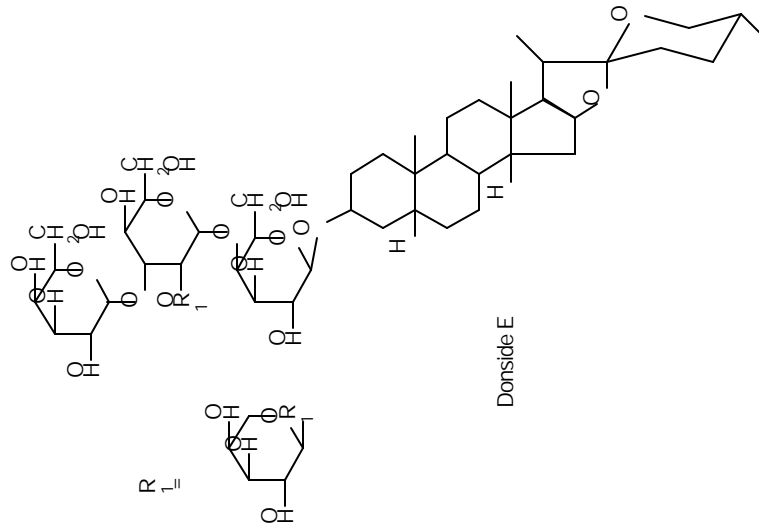


Fig. 2.3 Donside C, D y E

El Agave que más se ha estudiado es el *Agave cantala* por su uso medicinal en India. Se han estudiado sus diferentes partes como las pencas y frutas para obtener principalmente saponinas, la mayor parte de la investigación relacionada con este *Agave* la ha hecho el Dr. Uniyal con algunos colaboradores como el Dr. Agrawal, aunque no hay que descartar algunos autores que han trabajado con este *Agave* en el pasado como el Dr. Jain. En 1986 el Dr. Jain pudo aislar una nueva saponina esteroidea aislada de la parte aérea de la planta. A través de un extracto metanólico se pudo aislar y elucidar la estructura de una saponina la cual se caracterizó como gitogenina-3-O-β-D-glucopiranosida(1? 3)-β-D-glucopiranosida.

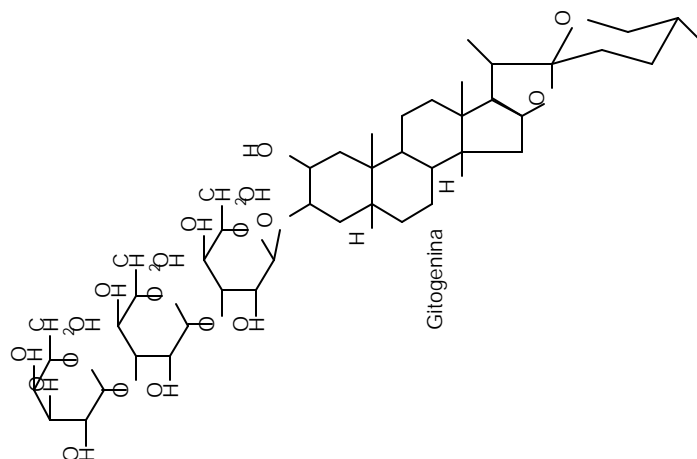


Fig. 2.4 Gitogenina

El Dr. Uniyal ha realizado varios estudios desde 1989 cuando publicó su primer artículo sobre la caracterización de glucósidos esteroidales obtenidos de las frutas del *A. cantala*. En un artículo reportado en 1989 el Dr. Uniyal presenta dos glucósidos esteroidales obtenidos de un extracto metanólico, estos agavasidos A y B se caracterizaron como: $3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-xilopiranosida}(1\rightarrow 2),\beta\text{-D-xilopiranosida}(1\rightarrow 3),\beta\text{-D-glucopiranosida}(1\rightarrow 3)[\beta\text{-D-xilopiranosida}(1\rightarrow 3)\beta\text{-D-galactopiranosida-(1\rightarrow 2)],\beta\text{-D-glucopiranosida}\}(25\text{R})\text{-5}\alpha\text{-spirostane}$, como agavasido A, y $3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-xilopiranosida}(1\rightarrow 2),\beta\text{-D-xilopiranosida}(1\rightarrow 3),\beta\text{-D-glucopiranosida}(1\rightarrow 3)[\beta\text{-D-galactopiranosida}(1\rightarrow 2)]\beta\text{-D-glucopiranosida}\}(25\text{R})\text{-5}\alpha\text{-spirostane}$, como agavasido B. En un estudio posterior, en 1990, el Dr. Uniyal describió un glucósido esteroideal, agavesido C, aislado de las frutas del *A. cantala* el cual fue caracterizado como $3\beta\text{-}\{\alpha\text{-L-ramnopiranosida}(1\rightarrow 2),\beta\text{-D-glucopiranosida}(1\rightarrow 3),\beta\text{-D-glucopiranosida}[\beta\text{-D-xilopiranosida}(1\rightarrow 4)\alpha\text{-L-ramnopiranosida-(1\rightarrow 2)],\beta\text{-D-glucopiranosida}\}2\alpha\text{-hidroxi-25R-5}\alpha\text{-spirostane}$. Finalmente este mismo autor reportó en 1991 un hexagluósido spirostane aislado de la fruta del *A. cantala*. Este se reportó como agavasido D y fue caracterizado

como 3β -{ α -L-ramnopiranosida(1 \rightarrow 2), β -D-glucopiranosida(1 \rightarrow 3), β -D-glucopiranosida[β -D-xilopiranosida(1 \rightarrow 4) α -L-ramnopiranosida-(1 \rightarrow 2)], β -D-glucopiranosida}-25R-5a-spirostane.

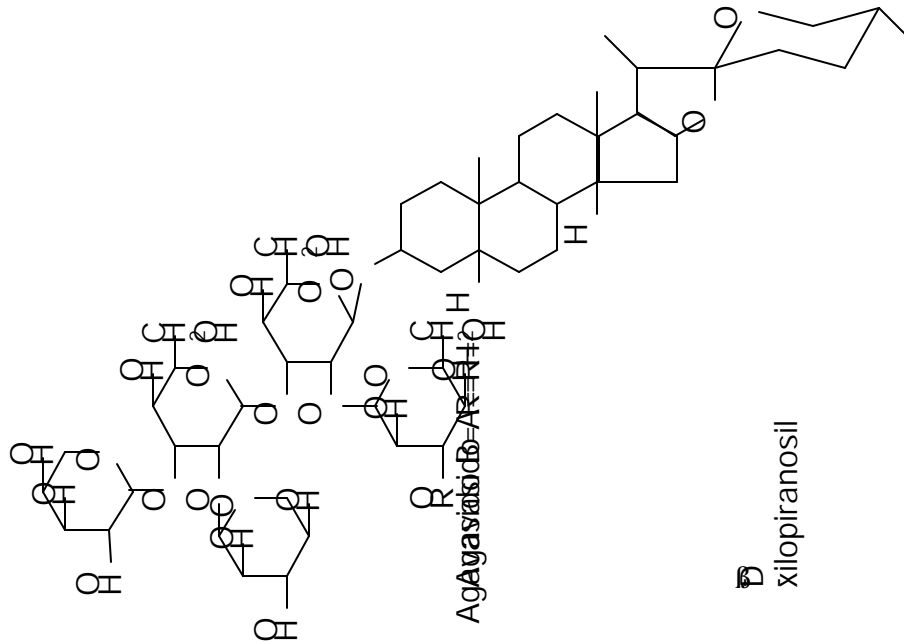


Fig. 2.5 Agavaside A y B

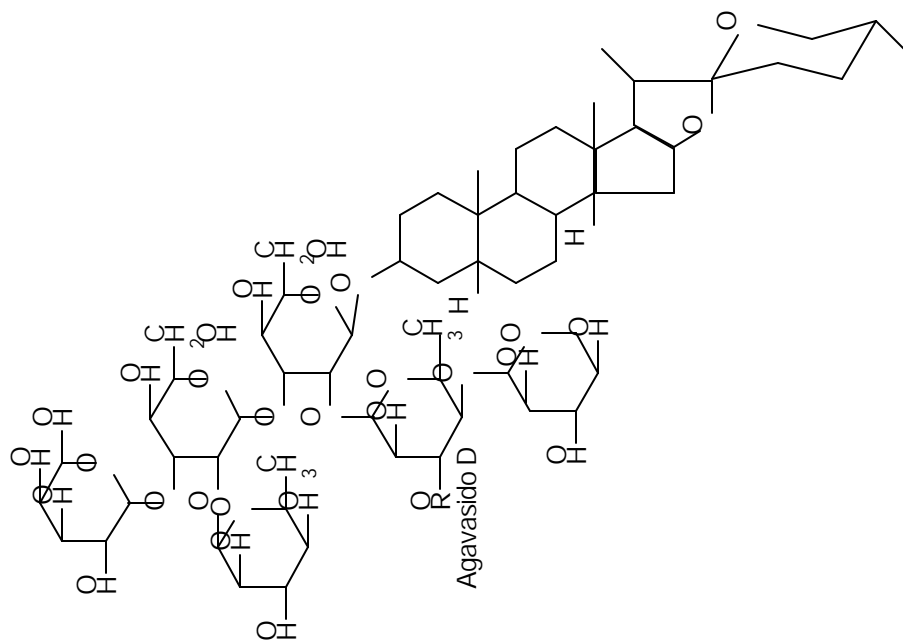
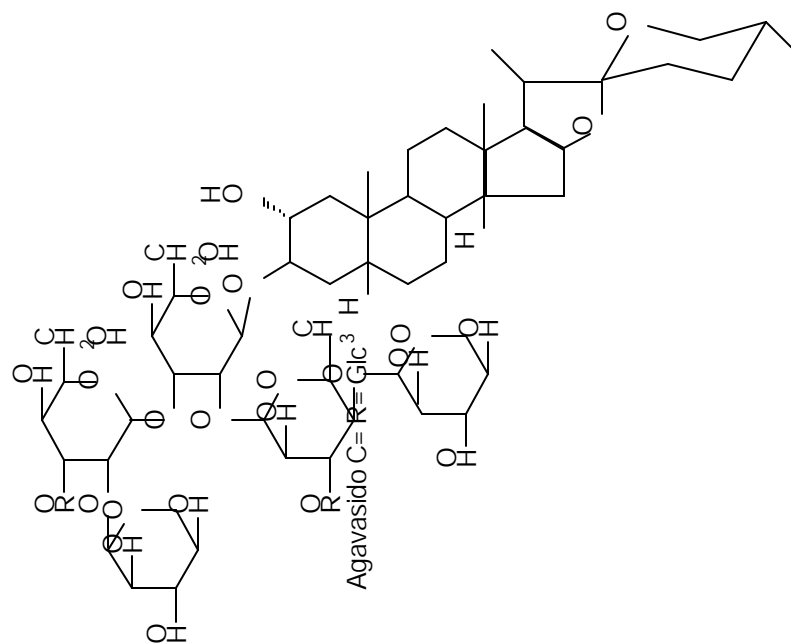
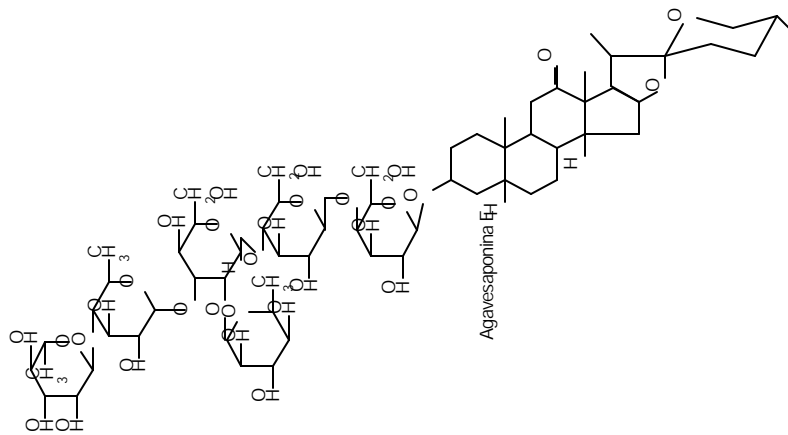


Fig. 2.6 Agavaside C y D

El estudio del *Agave americana* ha tenido una larga trascendencia ya que ha sido estudiada por sus propiedades medicinales desde 1975 por la antigua Unión Soviética. Esta investigación la realizó el Dr. Wilkomirski y colaboradores en donde aisló varias saponinas de hecogenina de un extracto metanólico. Agavesaponina E y H fueron aislados y caracterizados como 3-O-[β-D-xilopiranosida-(1? 2glc1)-a-L-ramnopiranosida-(1? 4),a-L-ramnopiranosida-(1? 3glc1),β-D-glucopiranosida(1? 4)-β-D-glucopiranosida(1? 4)β-D-glucopiranosida-(1? 4),β-D-galactopiranosida]-5a-spirostane-12-on-3β-ol, como agavesaponina E, y 3-O-[β-D-xilopiranosida-(1? 2glc1)-a-L-ramnopiranosida-(1? 4),a-L-ramnopiranosida-(1? 3glc1),β-D-glucopiranosida(1? 4)-β-D-glucopiranosida(1? 4)β-D-galactopiranosida],26-O-[β-D-glucopiranosida]-(25R)-5a-furostano-12-on-3β,22a,26-triol, como agavesaponina H.



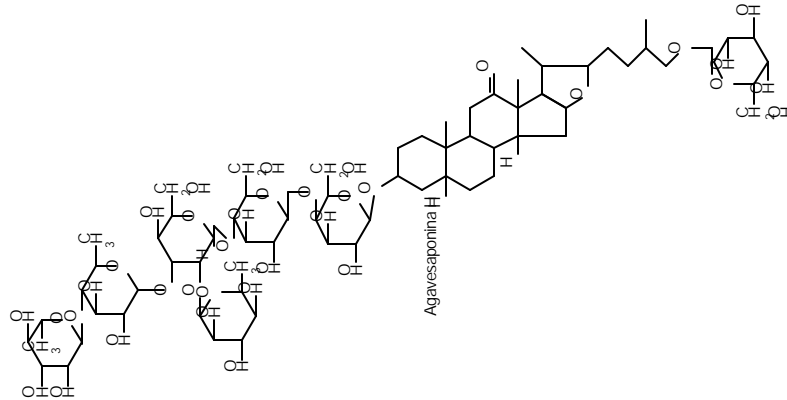


Fig. 2.7 Agavesaponina E y H

En 1991 el Dr. Parmar y colaboradores retomaron la investigación con el *A. americana* pero su investigación no se concentró en la caracterización de saponinas sino de un flavonoide. Se hicieron extractos con hexano y benceno los cuales se combinaron para purificar por cromatografía, a través de espectroscopia orgánica se pudo elucidar la siguiente estructura: 5,7-Dihidroxi-6,5'-dimetoxi-3',4'-metilenedioxiflavanone.

Podemos observar que las investigaciones realizadas para elucidar la estructura de los *Agaves* se concentra a un número muy reducido de *Agaves* y a un grupo de metabolitos también reducido. Esto demuestra la cantidad de trabajo que se necesita hacer para poder entender por completo la importancia del *Agave* como especie en el planeta. Por lo anterior en este proyecto se propone el estudio fitoquímico y farmacognóstico de los compuestos del *Agave salmiana*, se detectarán qué compuestos contiene la penca con pruebas preliminares y se extraerá, separará y elucidarán dichos compuestos.