

**CAPITULO VI**

**RESULTADOS**

# CAPITULO VI

## 6. Resultados

### 6.1 Investigación bibliográfica

Se realizó una búsqueda bibliográfica del *Agave salmiana* relacionado con otros experimentos fitoquímicos o farmacognósticos y sólo se encontró una tesis realizada en 1954 en la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde un alumno de licenciatura aisló glucósidos del *Agave* pulquero. Al igual se encontraron otros artículos, principalmente en la revista *Phytochemistry*, con relación a la elucidación de distintos metabolitos secundarios en otros *Agaves* que no son el *Agave salmiana*. De estos artículos se pudo observar de qué manera separar y purificar los metabolitos de los *Agaves*.

### 6.2 Identificación macroscópica del *Agave salmiana*

Genty nos señala que el *Agave salmiana* se caracteriza por tener un tamaño mediano a grande, con pencas anchas formando un rosetón enorme de 1.5 a 2 metros de alto y el doble de ancho. Estas pencas son de color verde con un tono grisáceo, de forma cóncava. Las espinas en las orillas son mas grandes en la parte intermedia de la penca, de 5 a 10 mm de largo y de 3 a 5 cm entre ellas, de color café grisáceo. También se buscó la zona en que crece este tipo de *Agave* y se encontró que crece en el estado de Puebla, especialmente en la zona de Puebla-Tehuacán. Ya conociendo las características y su ubicación se identificó la planta en el municipio de Tepeaca y se cortaron las pencas.

### 6.3 Identificación microscópica del *Agave salmiana*

La penca del Agave contiene una epidermis que cubre la superficie completa de esta. La función principal de la epidermis de las pencas es reducir la pérdida de agua en la planta, a su vez la pared externa, epidermis, esta cubierta por una capa protectora llamada cutícula, esta se compone principalmente de cera. Las células epidérmicas en general son las células guardianas, esclerénquima y otras células especializadas como son algunas células que contienen cristales y células secretoras. Estas células se localizan un poco separadas entre sí, y no se han observado uniones intercelulares entre ellas. ( Jensen,W. 2000)

La epidermis contiene aberturas microscópicas rodeadas por dos células guardianas, estas aberturas son las que permiten que se lleve a cambio el intercambio gaseoso en la planta. La abertura junto con las células guardianas, oclusivas, se le llama estoma. Estas son importantes para que se lleve a cabo la fotosíntesis y permiten regular la pérdida de agua. Las células guardianas de los estomas regulan el tamaño de la abertura y ayudan a reducir la pérdida del agua, este cambio de tamaño es el resultado de las variaciones en la presión de turgencia dentro de dichas células. Las células guardianas se forman a partir de la división desigual de una célula epidérmica. (Jensen,W. 2000)

Los estomas en las plantas desérticas, como el Agave, se encuentran hundidas y juegan un papel muy importante en la conservación de turgencia de las hojas. Este tipo de células son muy importantes debido a que las células subsidiarias que rodean a la célula guardiana madre, que origina a todas las demás, es característica de cada especie. Por esto mismo se utilizan estas células como herramienta taxonómica para describir e identificar ciertas especies de plantas. (Jensen,W. 2000)

Por esta razón ya habiendo identificado al Agave por sus características físicas se tomó un pedazo de la penca para analizar sus estomas y fibras. En el laboratorio, con la penca fresca, se tomo una pequeña cantidad de unicel y se disolvió con xileno hasta quedar una sustancia pegajosa y transparente. Esta sustancia se extendió por los dos lados de la penca y se dejó secar al aire libre, una vez seca se prosiguió a colocar un pedazo de cinta adhesiva sobre la capa seca y retiró asegurándose que se lleva la epidermis de la planta junto con la cinta. Posteriormente se pasó la cinta a un portaobjetos y se observó por el microscopio. Se pudieron observar los estomas del Agave por los dos lados y a diferentes objetivos. Los estomas de las pecas del Agave se clasificaron como paralíticos o rubiáceos por medio del arreglo y la forma de las células subsidiarias. En la figura 6.2 podemos observar dos células subsidiarias, en las cuales el eje longitudinal es paralelo al eje del estoma. (SSA.FEUM, México, 2001)



Fig. 6.1 Estoma a 10x



Fig. 6.2 Estomas 40x por adelante

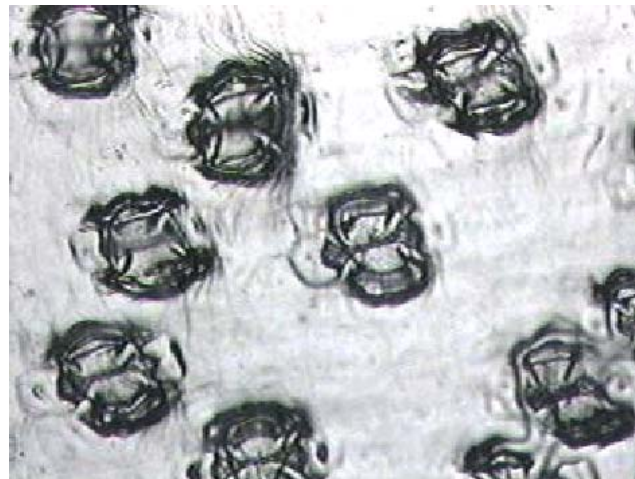


Fig. 6.3 Estomas 40x por atrás

Otra forma muy importante de identificación taxonómica de plantas es la identificación de fibras en las hojas o pencas. Las células de las fibras, que forman parte del esclerénquima, se caracterizan por su forma alargada y estrecha, sus paredes son gruesas, uniformes, altamente lignificadas en la madurez y terminan en punta. Las fibras tienen como función incrementar la fortaleza y apoyo de la planta al igual que conferir resistencia mecánica al tejido. En el caso del Agave se clasifican como fibras duras por su textura y son principalmente utilizadas para crear artesanías y sogas. (Jensen, 2000)

Después de haber identificado los estomas en la penca se prosiguió a separar las fibras de la penca para poder visualizarlas. Se tomó un pedazo pequeño seco de la penca y se metió en un tubo de ensaye con solución de dicromato de potasio y ácido nítrico 1:1, se colocó en baño María por una hora y se dejó enfriar. Ya fría la solución se lavó con etanol y cortaron pequeñas partes de la penca tratada para observar en el microscopio. Se observaron bastantes fibras y de estas se podía ver que en efecto acababan en punta y tenían una pared gruesa que las rodeaba. Estos resultados nos indicaban que aparte del uso tradicional que se le da a este Agave que es la fabricación de pulque también se puede utilizar en la elaboración de cuerdas o artesanías hechas con fibra.

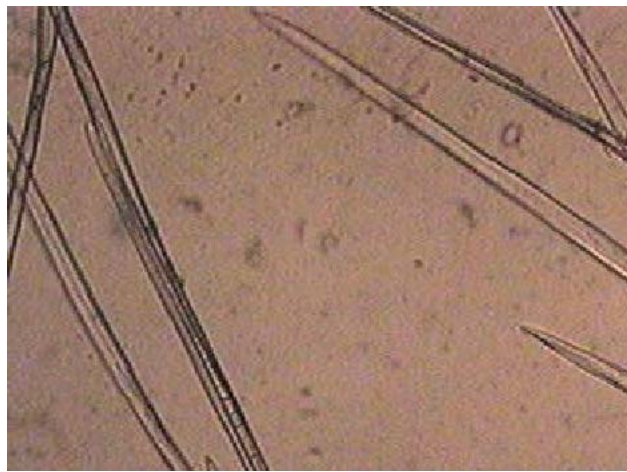


Fig 6.4 Fibras 40x puntas



Fig. 6.5 Fibras 10x pared celular



Fig. 6.6 Fibras 40x

#### **6.4 Recolección, secado y pulverizado del *Agave salmiana***

Ya identificada la planta nos dirigimos a la carretera federal Puebla-Tehuacán, por su alta diversidad de Agavaceas. En el kilómetro 30 en la comunidad de Santiago Acatlán se identificó la planta con ayuda de la información bibliográfica y los conocimientos de los especialistas en obtención de pulque de la comunidad. La comunidad de Santiago Acatlán se ubica en el municipio de Tepeaca, Puebla, en el kilómetro 30 de la carretera federal

Puebla-Tehuacán. El área esta constituida por rocas calizas principalmente entre las que se encuentran, ígneas extrusivas, sedimentarias de origen marino, depósitos clásticos de relleno (arena y conglomerado) y aluvión silicoso color café utilizado para la elaboración de tabique rojo. Las rocas ígneas extrusivas consisten esencialmente en basaltos y tobas líticas. La mineralogía está representada por mármol muy fracturado de color rosa a blanco, encajonado en la caliza. También existe la presencia de calizas color gris claro microcristalinas con un contenido promedio de 88.7% de  $\text{CaCO}_3$  y pérdida de calcinación de 42.6%. Según el Consejo de Recursos Mineros se encontró en el suelo principalmente:  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ . (<http://www.economia.gob.mx/?P=1708#GEOLOGIA>)

Esta descripción del suelo concuerda con los requerimientos que el *Agave salmiana* necesita para crecer según Gentry. Este *Agave* crece principalmente en laderas rocosas ricas en minerales como el sílice y carbonatos datos que indican que la comunidad de Santiago Acatlán representa un excelente lugar de crecimiento para este *Agave*.

Ya estando en la comunidad se seleccionaron 3 *Agaves* y se cortaron 3 pencas de cada una, se aseguró que se tomaran las pencas distribuidas en el rosetón para asegurar que se tomaran pencas de diferentes edades. Se procuró que el *Agave* fuera una planta madura ya que los metabolitos secundarios se acumulan en esta fase de crecimiento, solo se tuvo cuidado de no tomar las pencas de una planta en floración ya que todos los metabolitos se ocupan en el crecimiento del quiote. Se cortó la penca a 20 cm del tallo con un machete y se transportó al laboratorio.



En el laboratorio se cortó en pedazos de 40 cm que no fueran muy gruesos y se metió en el desecador para evitar las reacciones de degradación que ocurren por la presencia de agua. Se dejaron secar por 3 días hasta asegurar que se encontraban perfectamente secas.

Una vez secas las plantas se molieron, para poder liberar los metabolitos secundarios. Esto se realiza para que al momento de estar en contacto con el disolvente los componentes químicos puedan extraerse y difundirse al disolvente. Se molió 1 kilogramo y medio de planta para poder utilizar en la identificación de metabolitos por pruebas preliminares y extracción para purificación de compuestos.

## **6.5 Pruebas preliminares**

Se tomó medio kilo de la planta seca y pulverizada y se cubrió con etanol para macerar, se dejó en reposo por 3 días y luego se filtró. El filtrado se evaporó en el rotavapor y el extracto se utilizó para las diferentes pruebas preliminares. Una vez realizadas estas pruebas se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 6.1 Resultados de Pruebas Preliminares

<b>Grupo de Metabolito</b>	<b>Tipo de prueba</b>	<b>Resultado</b>
Saponinas	Ensayo con agua caliente	+
	Rosenthaler	-
Triterpenos		+
Flavonoides	Shinoda	+/-
	Pew	-
	Hidróxido de sodio	+
	Coloración	-
Alcaloides	Mayer	++
	Wagner	+++
	Hager	+
	Draggendorf	+++
Taninos	Cloruro ferrico	+/-
	Gelatina	+
Glucósidos cardiotónicos y lactosas sesquiterpénicas	Baljet	-
	Legal	-
	Cloruro de antimonio	-
Cumarinas	Luz UV	-
Antraquinonas	Reacción Borntrager	-
Glucósidos cianogénicos		-

Tabla 6.2 Comparación de los metabolitos secundarios encontrados experimentalmente con los reportados en la bibliografía. (*Agave salmiana*)

Grupo de Metabolito	Experimental	Bibliografía
Saponinas	+	+
Alcaloides	+	-

## 6.6 Extracción

Se tomó 1 kg de planta seca y pulverizada y se colocó en un matraz balón de 5000 mL y se le agregó 3 L de hexano. Se puso en un sistema de reflujo por 4 horas para después dejar enfriar, filtrar y concentrar en el rotavapor. El resultado fue una pasta espesa de color amarillo pálido con una textura pegajosa. Se repitió el mismo procedimiento con los extractos de benceno y acetato de etilo. Se puso en un sistema de reflujo por 4 horas con el disolvente correspondiente, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró con papel filtro Watman número 2 y se concentró en el rotavapor. En el caso del benceno el extracto se observó como una pasta color verde oscuro con textura pegajosa y con el acetato de etilo se observó un extracto no tan verde como el del benceno y con la misma consistencia pegajosa. Estos extractos se conservaron dentro de matraces de bola de 250 mL para su desengrasado en refrigeración.

### 6.6.1 Desengrasado:

A los 3 concentrados ya secos se les agregó 100 mL de metanol a cada uno, se calentó la mezcla y luego se metió al refrigerador para iniciar la formación de cristales y su precipitación. Una vez sedimentado se filtró y se separó el sobrenadante, a este se le repitió el proceso de calentamiento y enfriamiento para obtener precipitado, se repitió

este paso hasta que ya no se obtuvo precipitado. Del extracto hexánico se realizaron 4 extracciones del precipitado, y se obtuvo una pasta amarilla clara. Debido al color se decidió lavar el extracto con etanol pero se observó que este precipitado absorbía el disolvente que se le agregaba y formaba una pasta de apariencia grasosa y esponjosa, por esto se le adicionó un exceso de etanol el cual se calentó y posteriormente se dejó enfriar. Se separó el precipitado del sobrenadante etanólico y se probó la solubilidad del precipitado. Se observó que el precipitado no fue soluble en metanol, acetona, cloroformo y hexano frío pero si se observó solubilidad en hexano caliente. Se regresó el sobrenadante con el precipitado debido a que con los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  demostraron ser iguales, después de evaporar el etanol se observó que el sedimento era más blanco. Del extracto bencénico y extracto de acetato de etilo se realizó el mismo procedimiento para desengrasar pero en los dos casos se obtuvo una pasta más verde que la del hexano, aunque se lavó con etanol no se pudo obtener un precipitado completamente blanco.

Los sobrenadantes ya desengrasados se concentraron en el rotavapor y se pesaron, el extracto hexánico peso: 7.400 g (Anexo 1), el extracto bencénico peso: 3.500 g (Anexo 2) y el extracto de acetato de etilo peso: 3.400 g (Anexo 3).

## **6.7 Separación**

### **6.7.1 Separación por columna cromatográfica**

Para separar el extracto hexánico se montó una columna con 500 g de silica gel y se inyectaron 5 g del extracto hexánico para poder empezar a separarla, la columna que se utilizó tiene una altura de 84.4 cm y un diámetro de 3 cm. Se sacó un espectro de RMN

de  $^1\text{H}$  del material para separar para poder tener una referencia de lo que se busca (Anexo 1).

Se obtuvieron fracciones de 50 mL a la vez y se evaporaron en el rotavapor. Se extrajeron 60 fracciones con hexano obteniéndose de todas ellas unas cuantas gotas de producto oleoso, observando que ya no se obtenía mas producto con esta polaridad se prosiguió a cambiar este. Se obtuvieron 60 fracciones con la polaridad (99:1) hexano:acetato de etilo y con la ayuda de placas preparativas se juntaron las fracciones de polaridad similar y con el mismo número de componentes. Después de no obtener producto en la última fracción se decidió cambiar la polaridad a 9:1 hexano:acetato de etilo y a través de las placas preparativas y RMN de  $^1\text{H}$  se decidió juntar las fracciones de polaridad similar y con el mismo número de componentes. Al obtener las últimas fracciones se observó que estas permanecían igual y no había cambio entre ellas por lo que se decidió cambiar de polaridad a 8:2 hexano:acetato de etilo.

Se obtuvieron fracciones con polaridad 8:2 hexano:acetato de etilo. Se analizaron con placa preparativa y con RMN de  $^1\text{H}$  y se determinó juntar las fracciones con el mismo número de componentes. Se cambió de polaridad a 7:3 hexano:acetato de etilo y se juntaron estas fracciones ya que se observó con placa preparativa que contenían el mismo número de componentes. Finalmente se decidió cambiar la polaridad a 6:4 hexano:acetato de etilo, se analizaron y se decidió juntar estas fracciones.

A partir de este momento se decidió terminar esta columna adicionando le acetato de etilo para terminar de obtener los compuestos mas polares, los cuales se evaporaron y se juntaron. La columna finalmente se terminó de limpiar con la adición de metanol, al igual el producto se evaporó y juntó.

Al terminar la columna se analizaron los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de las fracciones obtenidas y se seleccionaron 4 grupos de fracciones para seguir separando las:

Tabla 6.3 Fracciones a Purificar de la Columna 1.

<b>Polaridad</b>	<b>Fracciones</b>	<b>Peso</b>
7:3 Hexano:acetato de etilo	1 a 41	2.200 g (Anexo 4)
8:2 Hexano:acetato de etilo	1 a 63	2.00 g (Anexo 5)
99:1 Hexano:acetato de etilo	37 a 60	0.3 g (Anexo 6)
Hexano	1 a 60	0.4 g

Por análisis de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y por la cantidad de muestra se decidió purificar a través de una columna las fracciones 37 a 60 de la polaridad 99:1 hexano:acetato de etilo (Anexo 6). Se montó una columna con 30 g de silica gel y se le agregó 0.3 g del compuesto de polaridad 99:1 hexano:acetato de etilo. La columna que se utilizó tiene una altura de 90 cm de alto y 2 cm de diámetro. En este punto de la investigación se decidió evaluar los artículos debido a que se observó que con el acetato de etilo no se separaban las muestras como deseábamos, debido a esto y con guía de los artículos científicos se decidió cambiar el acetato de etilo por el cloroformo.

Se corrió la columna con las polaridades: hexano y 99:1, hexano:cloroformo se observaron las fracciones en placa preparativa pero se observaba una mancha grande que no se separaba por lo que se juntaron las fracciones y se pesaron. El peso excesivo demostró que la columna se contaminó con los disolventes. Debido a que no se puede determinar que compuestos pertenecen al extracto original y cuales pertenecen a la

contaminación del disolvente se decidió no continuar con la columna. Se terminó de obtener el producto con cloroformo y se limpió la sílica gel con metanol. Las fracciones obtenidas de esta columna se guardaron y refrigeraron para su evaluación posterior.

Volviendo a analizar las fracciones seleccionadas para purificar se decidió montar otra columna con las fracciones 1-63 de la polaridad 8:2 hexano:acetato de etilo (Anexo 5). Se tomo 1 gr de la muestra y se agregó a una columna de un metro y medio de alto y 2 cm de diámetro que contenía 100 gr de sílica gel. Se corrieron las fracciones con las siguientes polaridades: hexano, 99:1, 9:1, 8:2, 7:3 y 6:4 hexano:cloroformo. En las fracciones de polaridad 7:3 se observó un aceite ligeramente amarillo, se analizaron las fracciones con RMN de  $^1\text{H}$  y se observó que estas fracción presentaban unas señales los cuales podían indicar la presencia de terpenos (Anexo 7). Al analizar las fracciones de polaridad 6:4 hexano:cloroformo se observó en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  unas señales significativas por lo que se decidió juntar las fracciones y guardarlas para ser analizadas. (Anexo 8). Se realizaron algunas fracciones con solo cloroformo y se juntaron, esto y se prosiguió a limpiarla con metanol, concluyendo el trabajo con esta columna.

Las fracciones intermedias de la polaridad 7:3 se agregaron a una columna cromatográfica para separar. Se pesó 0.05 gr del compuesto y se obtuvo un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo 10), de este se montó una columna con 5 g de sílica gel y se obtuvieron 100 mL de las fracciones hexano, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, hexano:cloroformo, cloroformo y acetato de etilo. Se obtuvo de la fracción 5:5 un triterpeno mas separado del resto de los compuestos (Anexo 12) pero no se obtuvo suficiente material para poder analizarlo en RMN de  $^{13}\text{C}$ .

### **6.7.2 Cristalización:**

De las fracciones intermedias de la polaridad 7:3 hexano:cloroformo se realizó una cristalización con el objetivo de purificar y aislar los triterpenos presentes. Se probó cristalizar con varios disolventes y el que mostró buenos resultados fue metanol. Con el metanol se observó una cristalización mayor aunque no fue suficiente para poder separarla del sobrenadante y analizarlo. Las fracciones intermedias de polaridad 6:4 hexano:cloroformo también se cristalizaron con metanol pero a analizarla en RMN de  $^1\text{H}$  pero no se encontró nada significativo.

### **6.8 Hidrólisis ácida**

Se decidió realizar una hidrólisis ácida del extracto de acetato de etilo para poder extraer y purificar saponinas de la planta. Se revisaron los artículos relacionados con purificación de saponinas y se tomó la metodología de hidrólisis ácida citado en el trabajo del Dr. Ding donde purifico saponinas esteroidales del *Agave sisalana*. Se tomaron 500 mg del extracto de acetato de etilo ya desengrasado y se puso a reflujo por 4 horas con 25 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M y 25 mL de etanol. Al terminar las 4 horas se dejó enfriar y se diluyó con 100 mL de agua destilada y luego se filtró. El sobrenadante se neutralizó con  $\text{NaCO}_3$  y se extrajo la fase orgánica con acetato de etilo, se realizaron 3 extracciones con 20 mL de acetato de etilo cada una. Después de haber arrastrado la fase orgánica con el acetato de etilo se lavó éste con una solución saturada de agua y  $\text{NaCO}_3$ , cinco veces. La fase que contiene el acetato de etilo se separó y se evaporó a sequedad para poder cristalizar con metanol. De la cristalización se obtuvo una buena cantidad de cristales que se separaron del metanol y se analizaron en RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo 9).



Se decidió separar la muestra a través de una columna cromatográfica. La muestra pesó 0.04 g por lo que se utilizó una columna que contenía 4 g de sílica gel y que medía 47 cm de alto y 1 cm de diámetro. Se corrieron 100 mL de hexano para poder separar las impurezas, junto con fracciones 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, hexano:cloroformo, y finalmente solamente con cloroformo.

Se concluyó la columna observando que en las fracciones 5:5 y cloroformo (Anexo 11) se observaban en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  unas señales indicando la presencia de triterpenos, aunque se necesita purificar la muestra más para poder identificar correctamente un compuesto. Se observaron señales en las siguientes regiones:

Tabla 6.4 Señales del Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Cloroformo

<b>Desplazamiento Químico (<math>\delta</math>) en ppm</b>	<b>Tipo de Hidrógeno</b>
0.8 a 1.4	Protones en Grupo Metilo
1.8	Protón Alílico
2.2 y 2.0	Protón Unido a un Grupo Aroli
4.2 a 5.0	Protón Base de OH
5.3 a 6.0	Protón Etilénico

Solamente se puede especular la presencia de un triterpeno por lo que se recomienda que en tesis posteriores se purifique mas las muestras obtenidas en estas para que de esta forma se pueda aislar e identificar compuestos.