

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



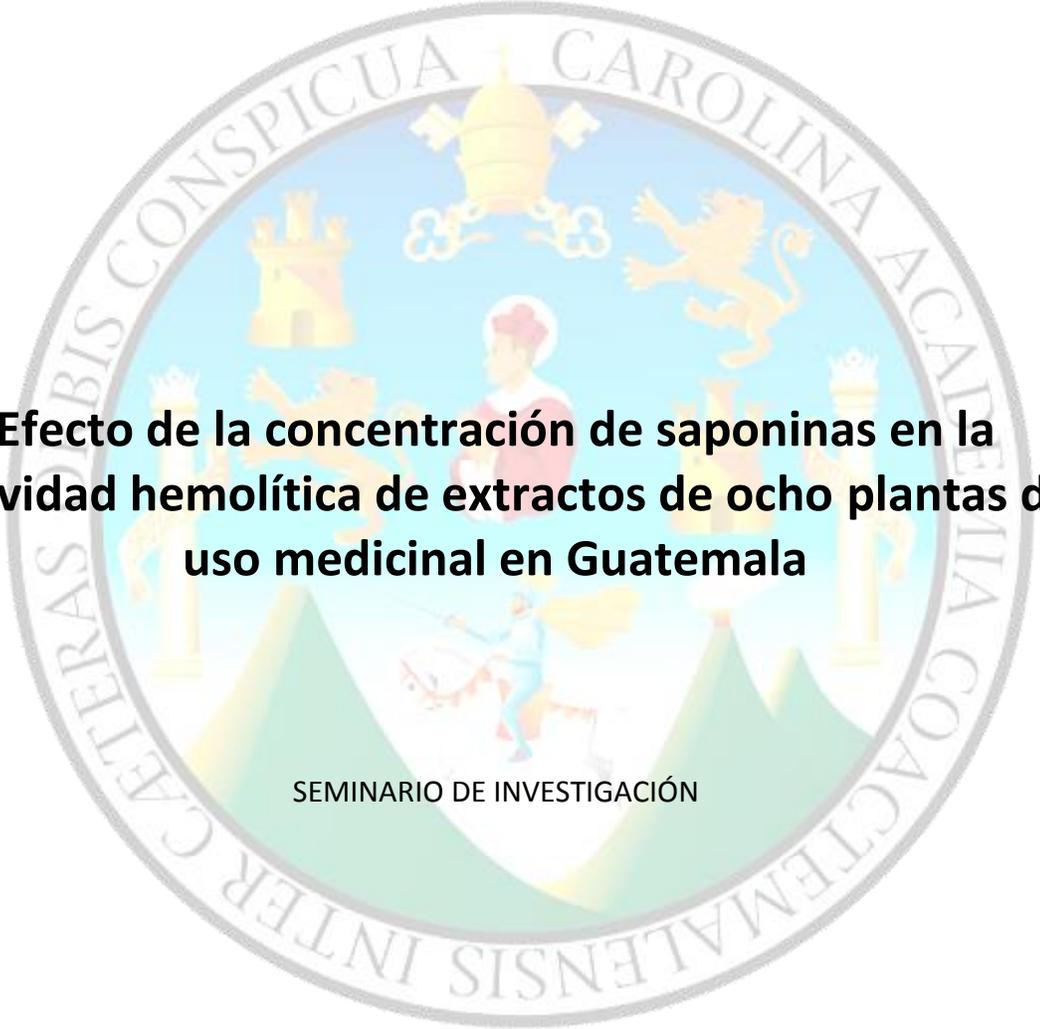
**Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala**

Astrid Carolina Hernández Guzmán  
Virginia Jeannette Hermosilla Carazo

QUÍMICAS BIÓLOGAS

Guatemala, julio de 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man on horseback, holding a staff, set against a background of a landscape with mountains and a sun. Above the figure is a golden crown. The seal is surrounded by a Latin inscription: "OBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CETERAS".

**Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

Presentado por

Astrid Carolina Hernández Guzmán  
Virginia Jeannette Hermosilla Carazo

Para optar al título de

Químicas Biólogas

Guatemala, julio de 2014

## JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cóbar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Lourdes Virginia Núñez Portales	Vocal IV
Br. Julio Alberto Ramos Paz	Vocal V

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios**

Por ser nuestro creador y ser una luz en nuestro camino, por darnos la oportunidad de ser de bendición a nuestra amada Guatemala.

### **A Nuestros Padres**

Por ser las personas que más han confiado en nosotras y por siempre brindarnos palabras que nos hacen sentir que podemos lograr todo lo que nos propongamos.

### **A Universidad de San Carlos de Guatemala**

Por ser nuestra *alma mater* y darnos la oportunidad de adquirir conocimientos para nuestra formación profesional.

### **A Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

Por ser nuestro centro de formación profesional.

### **A Lic. Armando Cáceres, Licda. Margarita Paz**

Por sus valiosos conocimientos, experiencia, asesoría, colaboración y apoyo.

### **A el Departamento de Citohistología, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Escuela de Química Biológica**

Por su apoyo en la realización de este seminario

## 1. AMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

Las saponinas se clasificaron antiguamente como algunos de los glucósidos vegetales que forman una espuma jabonosa cuando se mezclan y se agitan con agua, por lo que se han utilizado de forma rutinaria como detergentes, espumantes y emulsificantes. Se ha demostrado por medio de estudios anteriores que estos surfactantes naturales contienen glucósidos de esteroides y triterpenos, que existen ampliamente en las plantas terrestres, alimentos importantes y especialmente en las plantas medicinales. Hasta ahora, miles de saponinas homogéneas han sido aisladas y caracterizadas (Wang, Zhang, Zhu, Li, Li, & Yu, 2007).

Estos glucósidos muestran una gran diversidad estructural y un amplio espectro de actividad biológica, siendo la hemólisis probablemente la actividad común entre muchas saponinas estructuralmente diferentes (Wang et al., 2007).

La propiedad hemolítica de las saponinas ha sido el fundamento determinante en el desarrollo de diferentes potenciales terapéuticos, ya que amedrenta el uso de abundantes productos naturales; sin embargo la relación de la lisis con otras actividades biológicas como la antitumoral, adyuvante y anti-inflamatoria ha tenido buenos resultados sobre las membranas celulares (Wang et al., 2007).

El objetivo principal de esta investigación, fue determinar el efecto que causan las saponinas a la membrana eritrocitaria, dependiendo de su concentración. Para ello se utilizaron extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala (*Bixa orellana*, *Byrsonima crassifolia*, *Litsea guatemalensis*, *Lippia graveolens*, *Phlebodium pseudoaureum*, *Petiveria alliacea*, *Smilax domingensis* y *Solanum nigrescens*), con el fin de establecer algunos parámetros de seguridad para implantar un uso terapéutico que sea de beneficio para poder evitar efectos secundarios en la administración de los medicamentos que contienen estos extractos vegetales.

Para llevar a cabo la investigación de la acción lítica de las saponinas en los eritrocitos, así como de su cuantificación se contó con el apoyo del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) y el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

## 2. RESUMEN

Las plantas se han utilizado desde tiempos antiguos para el tratamiento de todo tipo de afecciones, considerándose en el tiempo actual como una alternativa para la medicina tradicional natural que está fuera del alcance de la población en países como el nuestro.

La presente investigación tuvo como principal objetivo determinar la actividad hemolítica *in vitro* de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala (*Byrsonima crassifolia*, *Bixa orellana*, *Lippia graveolens*, *Litsea guatemalensis*, *Petiveria alliacea*, *Phlebodium pseudoaureum*, *Smilax domingensis*, *Solanum nigrescens*). Estudios previos han demostrado que estas plantas contienen saponinas, las cuales son un grupo de glucósidos solubles en agua y que contienen características tensoactiva, hemolíticas y citotóxicas (Bruneton, 2001).

Se comprobó la presencia de saponinas en las ocho plantas estudiadas, por medio de pruebas cualitativas iniciando con la prueba de espuma. Posteriormente se realizó la identificación por medio de análisis cromatográfico, comparándose con estándares de saponinas esteroidales. La cuantificación de las mismas se realizó por medio de espectrofotometría obteniéndose para *Byrsonima crassifolia*  $1.78\% \pm 0.222\%$ , *Bixa orellana*  $0.80\% \pm 0.04\%$ , *Lippia graveolens*  $0.21\% \pm 0.06\%$ , *Litsea guatemalensis*  $3.19\% \pm 0.10\%$ , *Petiveria alliacea*  $0.92\% \pm 0.04\%$ , *Phlebodium pseudoaureum*  $1.06\% \pm 0.05\%$ , *Smilax domingensis*  $0.21\% \pm 0.006\%$  y *Solanum nigrescens*  $1.42\% \pm 0.007\%$ .

La actividad hemolítica de los extractos de las plantas determinada cualitativamente en agar sangre, no se presentó en ninguno de los extractos estudiados, al compararla con un estándar de saponinas que presentó un halo de hemólisis de 4mm de diámetro. Así mismo se realizó otro ensayo cualitativo en tubo, el cual demostró la presencia de hemólisis en cinco de las ocho plantas de estudio, la cuales son *Bixa orellana*, *Byrsonima crassifolia*, *Petiveria alliacea*, *Phlebodium pseudoaureum* y *Smilax domingensis*

La cuantificación de la hemólisis de los extractos en estudio, se realizó por medio de espectrofotometría a dos diferentes temperaturas, 25°C y 37°C y a diferentes concentraciones, en donde se obtuvo un mayor porcentaje de actividad hemolítica con los extractos de *Solanum*

*nigrescens*, *Petiveria alliacea* y *Bixa orellana*. También se demostró que la hemólisis aumenta mientras aumenta la concentración del extracto.

Se calculó para cada extracto la concentración a la cual ocurre el 50% de hemólisis ( $CH_{50}$ ), para establecer diferencias de hemólisis a dos temperaturas: 25°C y 37°C obteniendo una correlación entre la concentración de los extractos y la actividad hemolítica. A 25°C solamente *Bixa orellana*, *Petiveria alliacea* y *Solanum nigrescens* tienen importante actividad hemolítica; mientras que a 37°C tienen importancia *Bixa orellana*, *Litsea guatemalensis*, *Petiveria alliacea* y *Solanum nigrescens*.

En este estudio, la actividad hemolítica de las saponinas de las plantas pudo ser comprobada, sin embargo no ha sido específica por lo que es importante profundizar en el tema dentro de los límites de la lisis y la toxicidad a los eritrocitos, ya que son plantas de uso popular medicinal.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Saponinas

Las saponinas constituyen un amplio grupo de heterósidos muy frecuentes en los vegetales. Se caracterizan por sus propiedades tenso-activas; se disuelven en agua formando disoluciones espumosas (Bruneton, 2001).

Entre los vegetales más comunes que contienen saponinas se encuentran las espinacas, espárragos, remolacha, leguminosas, especialmente la soja, y los brotes de alfalfa. La saponina más importante presente en la alfalfa es el 3  $\beta$ -O-triglucósido del ácido medicagénico. Entre las plantas que contienen saponinas y son utilizadas medicinalmente están las dioscoreas, ágaves, Liliaceae (*Smilax*), castaño de Indias, regaliz, rusco, Hiedra, saponaria, ginsen y palo de jabón entre otros (Bruneton, 2001).

Desde el punto de vista químico, las saponinas al ser hidrolizadas rinden de 2 a 6 residuos de monosacáridos y una porción carbonada policíclica que es la aglicona del glucósido, a la cual se le denomina genéricamente sapogenina (Bruneton, 2001).

Pueden tener un esqueleto tipo esteroidal o de tipo triterpenoide (derivados del escualeno); la diferencia radica en que las saponinas esteroidales han eliminado 3 de sus radicales metilo mientras que las triterpénicas los mantienen intactos. Además, algunos triterpenos no presentan el sistema policíclico característico del esterano (Hernández, 1997).

Las saponinas se pueden encontrar en órganos vegetales muy diversos. Los de carácter monodesmosídico se dan con preferencia en raíces, cortezas y semillas, mientras que los bidesmosídicos, más hidrosolubles, muestran preferencia por los tejidos de asimilación como las hojas y las ramas tiernas (López, 2001).

El contenido de saponinas en las plantas depende de diversos factores tales como, el tipo de cultivo, edad de la planta, estado fisiológico, la localización geográfica o el órgano vegetal. Las saponinas de vegetales han sido conocidas por causar hemólisis, y estudios sobre la correlación entre las estructuras moleculares y la actividad hemolítica sugieren que menores modificaciones

en la estructura de la parte de la aglicona pueden tener enormes efectos sobre su potencia hemolítica (Bauman, Stoya, Völkner, Richter, Lemke, & Linss, 2000).

Las saponinas presentan un grupo de características generales que sirven de base para su identificación rápida: 1) producción de espuma al ser agitadas sus soluciones acuosas, lo cual es la base de la reacción de selivoflo empleada en el tamizaje fitoquímico; 2) producción de hemólisis de los glóbulos rojos por la mayoría de ellas, propiedad que se aprovecha en las técnicas en que se cuantifica la potencia de estas sustancias; 3) toxicidad en animales poiquilotérmicos, en especial los peces (sapotoxinas), a los cuales provocan parálisis de las agallas; 4) producción de una reacción positiva en la prueba de Liebermann-Burchard. Por lo general, las sustancias esteroidales en esta prueba manifiestan colores que van desde el azul hasta el verde y las triterpénicas, rosado, rojo o violeta. Además, la mayoría de las saponinas son solubles en diferente grado en soluciones de etanol al 80 %, propiedad que se emplea en diversas técnicas para su extracción y purificación (Hernández, 1997).

Su actividad hemolítica y antilipémica y su capacidad de bajar los niveles de colesterol en el suero son una de sus características más importantes (Bruneton, 2001).

En el organismo, las saponinas ocasionan dolor estomacal, náuseas, ligera diarrea y problemas en la digestión, puesto que la fase jabonosa producida al mezclarse con el agua y al ser agitada por los movimientos peristálticos de las vísceras, hace que se rompan las fuerzas de tensión superficial de las fases líquidas que intervienen en el proceso de digestión. Parte de estos tóxicos también puede ser asimilada por el organismo, teniendo que pasar por el hígado para ser biotransformados en formas menos tóxicas, y de esta manera propiciar un proceso de desintoxicación (Forturbel, 2003).

### 3.1.1 Saponinas esteroidales

Las saponinas esteroidales derivan de un esqueleto hexacíclico de 27 átomos de carbono, que es el núcleo espirostano. Algunas de estas saponinas son de gran interés e importancia por su relación con compuestos como las hormonas sexuales, cortisona, esteroides diuréticos, vitamina D y heterósidos cardíacos. Por este motivo, algunos son utilizados como material de partida para la síntesis de estos compuestos. En este sentido, destaca el uso de la diosgenina, saponina que se

obtiene, principalmente a partir de las partes subterráneas de distintas especies de lianas herbáceas tropicales del género *Dioscorea* (López, 2001).

Para que éstas posean interés industrial, su contenido en diosgenina debe ser superior al 3%. También se utiliza mucho la hecogenina, que es un saponósido muy semejante a la diosgenina. La hecogenina se obtiene de distintas especies de agaves o sisales (*Agave* sp.)(López, 2001).

Otras drogas con saponinas esteroídicas se utilizan por sus acciones farmacológicas concretas. Es el caso del rizoma de rusco *Ruscus aculeatus*, con ruscogenina de propiedades diurética, antiinflamatoria, protectora vascular y venotónica, y el rizoma de zarzaparrilla (*Smilax* sp.) que contiene sarsapogenina con efecto expectorante, diurético y depurativo. La zarzaparrilla también se utiliza como fuente de esteroides (Hernández, 2005).

Las saponinas esteroidales se encuentran por lo general en familias de la clase monocotiledónea, como son; Liliacea (Agavaceae), Dioscoreaceae y Amaryllidaceae. En las dicotiledóneas, se les ha encontrado en las familias Solanaceae y Scrofulariaceae. En el género *Agave* se han identificado varias sapogeninas como: hecogenina, manogenina, yucagenina, agavogenina, sarsapogenina, texogenina, esmilagenina, gitogenina, tigogenina y clorogenina (Hernández, 2005).

### 3.1.2 Saponinas triterpénicas

Las sapogeninas triterpénicas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y se presentan en 3 estructuras químicas diferentes (30-45 carbonos): acíclicas como el escualeno, considerado como el precursor natural de esta familia: tetracíclicas como el panaxadiol y pentacíclicas como la estallogenina. Estas sustancias pueden presentarse en sus fuentes naturales: en forma libre, formando ésteres, o como parte de un glicósido (saponina). Las sapogeninas pentacíclicas se subdividen a su vez en 3 grupos: tipo lupano; tipo ursano (derivado de la  $\alpha$  amirina), ambos no están presentes en los forrajes y los de tipo oleanano (derivados de la  $\beta$  amirina) presentes en estos últimos (Hernández, 1997).

### 3.1.3 Propiedades biológicas y farmacológicas de las saponinas

Las saponinas presentan diversas actividades biológicas y farmacológicas: como la actividad hemolítica, tensoactiva, actividad antibacterial, antitumoral entre otras. Las saponinas son afectadas por factores como el tipo de núcleo, el número de cadenas azucaradas y el tipo de grupo funcional (Hassan, Haq, Byrd, Berhow, Cartwright, & Bailey, 2010).

#### 3.1.3.1 Actividad hemolítica

El término hemólisis se refiere al fenómeno de ruptura o lisis de la membrana del eritrocito que provoca la liberación de la hemoglobina. Como consecuencia, se produce anemia y hemoglobinuria, posteriormente ictericia por exceso de hemoglobina transformada en pigmentos biliares (Hernández, 2006).

Las saponinas han demostrado, *in vitro*, tener un efecto hemolizante, propiedad que se atribuye a su interacción con los esteroides de la membrana eritrocitaria, que induce un aumento de la permeabilidad de la membrana y un movimiento de iones: el sodio y el agua entran, el potasio sale, la membrana explota, permitiendo de este modo la salida de la hemoglobina (Bruneton, 2001).

La actividad hemolítica depende de la naturaleza, número y secuencia de los azúcares en la saponina, y la mayor relación existente entre actividad y estructura se focaliza sobre la aglicona o sobre el número de unidades azucaradas involucradas (Chwalek, Lalun, Bobichon, Plé, & Voutquenne-Nazabadioko, 2006).

Los monodesmósidos que son las saponinas que tienen unidos azúcares en una sola posición, son mucho más hemolíticos que los bidesmósidos que son los que poseen dos o más partes de unión de los azúcares; y por tal razón la actividad decrece conforme la cadena azucarada se alarga (Bruneton, 2001).

El poder hemolítico es característico de las saponinas triterpénicas, pero es variable según los sustituyentes de la estructura (Hernández, 1997). En particular, las saponinas esteroidales y triterpénicas con una sola cadena del azúcar en el C3 tienen fuerte actividad hemolítica cuyas lesiones aparecen como agujeros de la membrana eritrocitaria, que pueden ser observadas mediante microscopía electrónica (Bauman et al., 2000).

Un estudio realizado por Bauman y cols. en el cual investigaron el efecto de las saponinas sobre la estructura de la membrana a través de la hemólisis de eritrocitos humanos *in vitro*, demostraron que estas lisaban los eritrocitos ocasionando un daño irreversible a la bicapa lipídica (Bauman et al., 2000).

#### 3.1.3.2 Actividad antiinflamatoria

Varias drogas conocidas por su efecto antiinflamatorio y antiedematoso deben estas propiedades a las saponinas. Esto ocurre con la raíz de regaliz y la semilla del castaño de Indias. También con drogas de la medicina tradicional china (*Bupleurum* spp. Apiaceae) y con saponinas tales como las que se han aislado de *Solidago virgaurea* L., *Camellia sinensis* (L) Kuntze o *Sanicula europea* L. La actividad puede tener distintas causas tales como: inhibición de la degradación de corticoides, interferencia con el metabolismo de mediadores de la inflamación, etc. (Bruneton, 2001).

De este modo, cabe mencionar que la Fruticesaponin B, una saponina bidesmosídica con una fracción ramificada de sacáridos, aislada de *Bupleurum fruticosens* L. (Apiaceae), ha demostrado tener la mayor actividad anti-inflamatoria de todas las saponinas probadas en los ensayos del edema de ratón. Otro estudio relacionado con esta actividad, indica que la saponina triterpenoide Ioniceroside C aislada de las partes aéreas de *Lonicera japonica* Thunb. (Caprifoliaceae), una planta medicinal conocida como un agente anti-inflamatorio mostró una actividad anti-inflamatoria *in vivo*, realizada experimentalmente en el edema de oreja de ratón provocado por aceite de crotón. Ioniceroside C inhibió el edema (15-31%) en concentraciones que iban desde 50 hasta 200mg/kg (Sparg, Light, & Van Staden, 2004).

#### 3.1.3.3 Actividad antifúngica

La actividad de las saponinas frente a hongos se ha establecido perfectamente *in vitro*, tanto a especies fitopatógenas (saponinas de la alfalfa) como frente a diversas cándidas o dermatofitos (caso de las saponinas de la hiedra o de la vara de oro). Salvo excepciones, esta actividad se debe a los monodesmósidos; y esta actividad es máxima cuando la molécula posee 4 ó 5 azúcares. Sin duda es consecuencia de la reacción del saponósido con los esteroides de membrana del microorganismo (Bruneton, 2001).

Así la actividad antifúngica de las saponinas ha sido un tema de interés para varios autores como lo es Sindambiwe y cols. que realizaron un estudio que demuestra que una mezcla de maesaponina aislada de *Maesa lanceolata*, inhibió el crecimiento de *Epidermophyton floccosum*, *Microides integralis* y *Trichophyton rubrum* a una concentración de 50µg/ml (Sparg et al., 2004).

Además otro estudio realizado por Barder y cols. demostró que la actividad antifúngica de las saponinas contra diferentes *Candida albicans*, pueden estar influenciada por la variación que hay en los enlaces eterglicosídicos de las unidades glucosídicas y de los enlaces acilglicosídicos de los oligosacáridos del C28 de la aglicona (Sparg et al., 2004).

#### 3.1.3.4 Actividad antibacteriana

A las saponinas también se les ha reportado actividad antibacteriana. Tres extractos de 5β-espirostano-3 β-ol saponina mostraron tener actividad antimicrobiana sobre organismos tanto en eucariotas como procariotas, pero solamente cuando hay una baja densidad celular (Sparg et al., 2004).

En un estudio realizado por Konishi y cols. se aislaron tres nuevas saponinas triterpenoides, Nudicaucins A, B y Cy una saponina conocida guaiacin D, aisladas de *Hedyotis nudicaulis* Wight & Arn. (Rubiaceae) que fueron probados contra *Bacillus subtilis*. Las cuatro saponinas aisladas mostraron actividad antibacteriana débil. Los resultados indicaron que las saponinas tetraglicosídica tienen una mayor actividad que las saponinas triglicosídicas (Sparg et al., 2004).

#### 3.1.3.5 Actividad citotóxica y antitumoral

Muchas saponinas sirven como antibióticos naturales. Además, si las saponinas son regularmente incluidas en la dieta, pueden ayudar a la protección del cuerpo contra el cáncer y las enfermedades cardíacas (Chwalek et al., 2006).

Muchas saponinas muestran tanto la actividad hemolítica (hacia eritrocitos) y citotoxicidad contra las células tumorales. La diosgenina, por ejemplo, es uno de los compuestos potenciales con una citotoxicidad IC<sub>50</sub> en rangos de µM contra varias líneas de células tumorales. Los datos anteriores sugieren que la hemólisis y la citotoxicidad de las saponinas

esteroidales dependen de sus estructuras, especialmente de la naturaleza, número y secuencia de los azúcares de las saponinas (Wang et al., 2007).

La diferencia significativa entre las dos actividades sugiere fuertemente que las saponinas esteroidales producen hemólisis y actividad citotóxica en diferentes mecanismos. Estos mecanismos no han sido descifrados. Fenómeno similar también fue observado por Voutquenne-Nazabadioko y cols. en diglicósidos de Hederagenina. Por otro lado, los resultados actuales demostraron que las saponinas esteroidales pueden ser un potente agente para el tratamiento antitumoral que carece de los efectos perjudiciales de la hemólisis (Wang et al., 2007).

Un estudio realizado por Tommasi y cols. aislaron saponinas triterpenoides citotóxicas de un extracto metanólico de las partes aéreas de *Trevesia palmata* Roxb. ex Lindl. Vis. (Araliaceae). Seis nuevas saponinas bidesmosídicas, junto con dos saponinas triterpénicas, se probaron por su actividad antiproliferativa contra tres cultivos de líneas celulares continuas (J774, HEK-293 y WEHI 164). Los resultados de esta investigación mostraron que el grupo hidroxilo en C-28 y la cadena esterificada de sacárido esterificados C-28 juegan un papel importante en la mediación de la actividad antiproliferativa (Sparg et al., 2004).

#### 3.1.3.6 Otras posibles actividades biológicas

Las propiedades analgésicas de los saponósidos de *Platycodon grandiflorum* DC. (*Campanulaceae*) o de diversos *Dianthus* (*Caryophyllaceae*) (Bruneton, 2001).

La influencia de los saponósidos de la alfalfa, soja o leño de Panamá sobre la absorción intestinal del colesterol; la disminuye formando complejos no reabsorbibles y, posiblemente actuando indirectamente sobre la síntesis de ácidos biliares a partir del colesterol (Bruneton, 2001).

La actividad inmunomoduladora; actividad mitógena *in vitro* de los saponósidos de *Mimosa tenuiflora*, interés de las quilayasaponinas posibles coadyuvantes de vacunas (Bruneton, 2001).

La actividad cito protectora de los ginsenósidos o de los saponósidos de los *Bupleurum* contra efectos de agentes hepatotóxicos como CCl<sub>4</sub>, galactosamina, en cultivos de hepatocitos (Bruneton, 2001).

Es necesario, después de esta enumeración de las actividades de las saponinas, señalar que muchas de estas comprobaciones han sido realizadas *in vitro* o en condiciones especiales (Bruneton, 2001).

Medicinalmente, las saponinas relajan el intestino e incrementan las secreciones de las mucosas bronquiales, fluidifican éstas y facilitan la expectoración (como la violeta, gordolobo y saponaria). Se emplean también como diuréticos y desinfectantes de las vías urinarias (como la zarzaparrilla). En usos externos son analgésicos y cicatrizantes (como la hiedra) (Bruneton, 2001).

Se han reportado una gran variedad de usos de las saponinas esteroidales. Investigaciones clínicas acerca de la *Dioscorea*, muestran que este tipo de saponinas esteroidales pueden aumentar el flujo coronario, nutrir el músculo cardiaco, mejorar la circulación periférica y deprimir la agregación plaquetaria, así como disminuir el colesterol y los triglicéridos en la sangre (Yuan, 2009).

Las membranas celulares combinan las propiedades opuestas de la fluidez y la estabilidad a fin de funcionar eficazmente. Un cierto grado de fluidez es esencial para permitir la señalización y el transporte. Sin embargo, la fluidez excesiva puede poner en peligro la estabilidad y viceversa. Como estabilidad de la membrana se conoce la capacidad de este complejo biológico para mantener su estructura en condiciones como el estrés oxidativo, hipotonía, pH extremos, el calor y la presencia de solutos (como el etanol, urea y guanidina) (De Freitas, de Cássia, da Costa, da Souza, Costa, Firmino, & Penha-Silva, 2008).

Muchos productos naturales presentes en plantas medicinales pueden afectar las membranas biológicas. Los efectos pueden ser positivos, por ejemplo, mediante la restauración de la fluidez que de otro modo tienden a disminuir con el envejecimiento. Los efectos también pueden ser negativos, sin embargo, a través de la promoción de la fluidez excesiva o la desnaturalización de las membranas. Los eritrocitos constituyen un buen modelo para el estudio

de la estabilidad de la membrana, ya que su lisis libera la proteína hemoglobina, que pueden medirse fácilmente por espectrofotometría (De Freitas et al., 2008).

#### 3.1.4 Extracción de saponinas

Las saponinas tienen un elevado peso molecular y su aislamiento en estado puro es difícil. Son hidrolizadas por ácidos, dando una genina (sapogenina) y diversos azúcares. Actualmente se conoce que las saponinas son sustancias muy polares, y es posible extraerse en caliente o en frío con agua o alcoholes de bajo peso molecular. Los materiales lipoides presentes en éstos extractos se separan con benceno. Al concentrar la solución alcohólica se separan las saponinas y después se cristalizan en mezclas de alcohol-agua. Para obtener sapogeninas se pueden hidrolizar las saponinas con sus enzimas naturales, con enzimas de origen microbiológico o hidrolizarlas con ácidos. Después se extraen con benceno, éter de petróleo o acetona y se recristalizan (Medinilla, 1993; Santa Cruz, 1987).

#### 3.1.5 Identificación y cuantificación de saponinas

La identificación de saponinas se determina mediante pruebas de espuma y de hemólisis, mediante Cromatografía de Capa Fina (CCF) usando como revelador reactivos específicos, que producen coloración. La técnica más utilizada es la CCF, en la que se utiliza mezclas de disolventes: cloroformo, metanol y agua. El método para la cuantificación de sapogeninas propuesto por Baccou y colaboradores en 1977, se basa en reacciones de coloración con anisaldehído, ácido sulfúrico y acetato de etilo (Santa Cruz, 1987).

Esta determinación puede realizarse directamente y no permite la interferencia de azúcares, esteroides, ácidos grasos y otros aceites vegetales, ya que las saponinas tienen las mismas propiedades colorimétricas ya sea que se encuentran en forma libre, enlazadas a azúcares, esterificadas con ácido acético o mono o polihidroxiladas. La sensibilidad del método es especialmente buena, ya que la formación del cromóforo (complejo coloreado), puede ser detectado sin dificultad, utilizando una longitud de onda a 430nm. Compuestos como el colesterol, lanosterol, cortisol y cortisona no muestran interferencias y ningún tipo de absorción (Santa Cruz, 1987).

La estructura de los productos coloreados aún no se ha dilucidado, sin embargo se cree que son los anillos E y F los que toman parte en reacciones de condensación. El ácido sulfúrico

causa la hidrólisis de las saponinas, y las sapogeninas formadas reaccionan inmediatamente con el ácido sulfúrico, acetato de etilo y anisaldehído, formando un complejo coloreado responsable del espectro de absorción (Baccou, 1977).

#### 3.1.5.1 Ensayo de espuma

Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, en una probeta por 15 segundos, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar una solución acuosa de un jabón. Esta es una prueba presuntiva de saponinas, ya que existen otras sustancias que también pueden formar espuma (Medinilla, 1993).

#### 3.1.5.2 Caracterización por CCF

La CCF es un método de separación fisicoquímico. Se lleva a cabo sobre una delgada capa de material granular (fase estacionaria), la mezcla a separar, en forma de solución, se aplica sobre dicha superficie, ya sea como manchas o bandas, a lo largo de la línea base. Luego que la cromatopla se ha colocado dentro de una cámara firmemente cerrada que contiene un solvente adecuado (fase móvil), se efectúa la separación a través de migración capilar. Normalmente la distancia que se deja correr el disolvente es de aproximadamente 10cm (Medinilla, 1993).

#### 3.1.6 Ensayo de hemólisis

Para la determinación de saponinas en plantas de uso medicinal una de las pruebas que se realizan es la de hemólisis, ésta puede llevarse a cabo de dos maneras: mediante ensayos en tubo en los cuales se utilizan eritrocitos humanos lavados y mantenidos en suspensión con amortiguador glicina-NaCl (glicina 0.1M en cloruro de sodio al 0.6%) a pH 5.8. La actividad hemolítica de los extractos puede ser evaluada en tubo y en placa por métodos directos e indirectos (Medinilla, 1993).

##### 3.1.6.1 Hemólisis en tubo

El método utilizado por Martínez, Bonilla & Zavaleta en 1989 para veneno de *Bothrops barnetti*, que se realiza determinando la cantidad de hemoglobina liberada mediante la técnica de la cianometahemoglobina que emplea el reactivo de Drabkin (Bonilla, & Zavaleta, 1997, Martínez, Bonilla, & Zavaleta, 1989). La actividad hemolítica se puede expresar como Unidad Específica de Hemólisis Directa (UEHD) o Indirecta (UEHI) según sea el caso:

$$\text{UEHD} = \frac{\% \text{ de Hemólisis directa}}{\text{mg Extracto}}$$

$$\text{UEHI} = \frac{\% \text{ de Hemólisis indirecta}}{\text{mg Extracto}}$$

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{HL}}{\text{HTx 100}}$$

Dónde:

HL = Hb liberada por tratamiento

HT = Hb Total (con Tritón X- 100)

#### 3.1.6.1.1 Hemólisis directa

La hemólisis directa se lleva a cabo en tubos conteniendo eritrocitos lavados y amortiguador glicina - NaCl a los que se adiciona el extracto vegetal, esta solución se incuba, se centrifuga y luego se realiza una cuantificación de la hemoglobina liberada en el sobrenadante (Bonilla, & Zavaleta, 1997; Martínez et al., 1989).

#### 3.1.6.1.2 Hemólisis indirecta

La hemólisis indirecta (método de Grassmann y Hanning). Se realiza con una mezcla del extracto vegetal y la suspensión de yema de huevo al 6,4% en amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7,5, ésta mezcla se pre-incuba obteniéndose un hidrolizado que es ensayado por el sistema de hemólisis directa, posteriormente se incuba la mezcla y se centrifuga, midiéndose la hemoglobina liberada en el sobrenadante (Bonilla, & Zavaleta, 1997; Martínez et al., 1989).

#### 3.1.6.1.3 Método colorimétrico

A una suspensión de glóbulos rojos en solución salina diluida, se añade una solución de la muestra que se presume es o contiene saponinas. Si los glóbulos rojos se hemolizan y la solución se torna transparente, se asume que el resultado es positivo (Medinilla, 1993).

#### 3.1.6.1.4 Método espectrofotométrico

Para la prueba hemolítica se utiliza una suspensión de eritrocitos, se añaden cantidades variables del agente hemolítico y se ajusta el volumen final de cada prueba con amortiguador isotónico. Después de 3 horas de incubación a temperatura ambiente, las muestras se centrifugan

y del sobrenadante obtenido se disuelven con igual volumen de amortiguador isotónico, posteriormente se estima la densidad óptica del hemolizado a una longitud de onda de 540nm, y se lee utilizando el amortiguador como valor de referencia cero y preparando una muestra patrón de hemólisis total tratada con agua destilada (Hernández, 1997).

Para la estimación de la potencia hemolítica (valor CH<sub>50</sub> expresado en mg/mL, que es la concentración de saponinas que hemoliza el 50%), se calcula la ecuación de la recta de mejor ajuste, para 5 puntos de concentraciones diferentes y se deduce de ello el valor CH<sub>50</sub> (Hernández, 1997).

En otro ensayo realizado por Freitas y colaboradores en el 2008, los valores de absorbancia se combinan contra la concentración de NaCl y ajustando a la curva de regresión sigmoidea dada por la ecuación de Boltzmann:

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{A_1 - A_2 + A_2}{1 + e^{(S - H_{50})/dS}}$$

Donde A1 y A2 son los valores de absorbancia de la máxima media y la media mínima de la recta sigmoidea, respectivamente, S es la concentración de NaCl, H<sub>50</sub> es la concentración de NaCl que causa el 50% de hemólisis y dS es la amplitud de la transición sigmoidea entre A1 y A2. La intensidad de la hemólisis se mide por la diferencia entre A1 y A2 (H) (Wang et al., 2007; De Freitas et al., 2008).

El porcentaje de hemólisis en cada tubo de ensayo se calculará mediante la ecuación:

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{A}{A_1} \times 100\%$$

### 3.1.6.2 Hemólisis en placa de agar

#### 3.1.6.2.1 Hemólisis directa

La hemólisis directa se lleva a cabo preparando placas con agar Sigma tipo 1 de baja electroendósmosis al 1% y agar DIFCO de alta electroendósmosis al 1% preparados en amortiguador acetato de sodio 0,05 M a pH 7,5 y adicionando eritrocitos lavados a 40°C. Luego de

homogenizar la mezcla, agregarla a las placas y gelificar, realizar agujeros de 3mm de diámetro en el agar para agregar el extracto vegetal. Las placas conteniendo extracto vegetal y control salino, se incuban, por períodos variables de tiempo (0 – 120min), midiéndose a continuación el diámetro (mm) del halo producido (Bonilla, & Zavaleta, 1997; Martínez et al., 1989).

#### 3.1.6.2.2 Hemólisis indirecta

La hemólisis indirecta en placa se realiza empleando el método de agar yema de huevo-eritrocitos modificado por Da Silva. En las placas de este agar se realizan agujeros de 3mm para adicionar el extracto vegetal. Las placas conteniendo el extracto vegetal y un control de solución salina, se incuban por períodos variables de tiempo (15-120min), posteriormente se procede a medir el diámetro del halo (Bonilla, & Zavaleta, 1997; Martínez et al., 1989; Da Silva, & Gulmerme, 1981).

La actividad hemolítica directa e indirecta en placa se expresa como Unidad Hemolítica Directa (UHD) ó Indirecta (UHI) según sea el caso:

$$\text{UHD} = \frac{\text{Diámetro de Hemólisis directa (mm)}}{\text{hora x mg Extracto}}$$

$$\text{UEHI} = \frac{\text{Diámetro de Hemólisis indirecta (mm)}}{\text{hora x mg Extracto}}$$

Cuando la muestra contiene taninos, deben eliminarse antes de realizar la prueba ya que la interfieren. Esto se logra por tratamiento repetido de la muestra con óxido de magnesio, el cual forma complejo con los taninos, eliminándolos (Martínez et al., 1989).

El poder hemolítico de las saponinas depende de varios factores como el pH, temperatura, tipo de sangre, etc. Es por ello que la muestra siempre debe ser manejada bajo condiciones estándar (Medinilla, 1993).

La medicina natural se ha utilizado desde los tiempos antiguos, con el uso de la flora nativa, los hombres han desarrollado diversos medios para contrarrestar las enfermedades. En Guatemala, se utilizan medicamentos provenientes de extractos de plantas que demuestran una utilidad y efectividad como antimicrobianos, y muchas de estas presentan entre sus componentes

saponinas, las cuales pueden provocar efectos adversos como reacciones hemolíticas, así mismo puede provocar efectos positivos, como lo es la protección de célula por medio de la estabilización de la membrana eritrocitaria. Este estudio pretende cuantificar el contenido de saponinas y determinar el efecto que presentan en la estabilidad de la membrana del eritrocito.

A partir de un listado de 153 plantas de uso medicinal, se escogieron ocho plantas de las cuales se investigó su contenido de saponinas y propiedades antimicrobianas demostradas experimentalmente. Dentro de los estudios experimentales realizados, se demostró que entre los compuestos que contienen estas plantas se encuentran las saponinas como principios activos. Por su actividad de hidrolizar las membranas celulares estas moléculas podrían provocar hemólisis. Con este estudio se pretende evaluar la actividad hemolítica *in vitro* de estas ocho especies vegetales para recomendar su uso medicinal de forma segura.

## 3.2 Descripción de las plantas de estudio

3.2.1 Nombre científico: *Bixa orellana* L. Familia: Bixaceae,

Sinonimias: *Bixa acuminata* Bijer, *B. americana* Poir.

Nombres populares: Achiote, aneto, bija, kuxub, ox.

### 3.2.1.1 Descripción botánica y hábitat

Es un árbol arbusto de 3-9m de alto. Las hojas se encuentran siempre verdes, son delgadas, acorazonadas u ovaladas, de 8-20cm de largo, en punta. Las flores tienen 4-5cm de ancho, 5 pétalos blancos o rosados y cáliz peludo. Las cápsulas de las semillas son de 3-4cm de largo, ovoides o cónicas, café-rojizo o amarillo, con pequeñas espinas lisas; tiene numerosas semillas en celdas de 5mm de largo, cubiertas de fina pulpa rojo-naranja (Cáceres, 2006; Robineau, 2005).

Es originaria de América tropical, posiblemente del suroeste de la Amazonia. Se extiende desde México hasta Brasil y Argentina y en el Caribe. Actualmente se distribuye en los países tropicales del nuevo y viejo mundo. En Guatemala se cultiva en: Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Izabal, Jutiapa, Quetzaltenango, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (Cáceres, 2006).

### 3.2.1.2 Usos populares

La decocción de hojas y semillas se toma para combatir debilidad, diabetes, afecciones gastrointestinales, respiratorias, hepáticas, gonorrea, es cicatrizante. Es utilizada para el tratamiento de tos, bronquitis, lepra, quemaduras, micosis infecciones de la piel, también como afrodisíaco, antiinflamatorio conjuntival, antiinflamatorio vaginal, antidiarreico, y antihipertensivo. La decocción de la raíz se utiliza para tratar ictericia, oliguria, diabetes y gonorrea. Tópicamente se usa para evitar cicatrices, desinflamar hemorroides y erupciones (Cáceres, 2006).

### 3.2.1.3 Actividades demostradas experimentalmente

El extracto acuoso de la raíz posee actividad hipotensora y antisecretoria; los extractos acuosos y clorofórmicos de las semillas tienen actividad hipoglucemiante. La maceración etanólica de la raíz posee actividad contra *Salmonella typhi* y *Trichomonas vaginalis* no así contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae* y *S. flexneri* (Robineau, 2005).

La tintura de hojas es activa contra varias especies de *Neisseria gonorrhoeae*. La tintura de hojas y corteza es activa contra bacterias, *Candida albicans* y dermatofitos. El extracto acuoso y etanólico inhibe la proliferación de células de linfoma Molt (Cáceres, 2006).

El extracto metanólico de las hojas, mostró moderada inhibición del crecimiento de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *S. dysenteriae* (Shilpi, Ur-Rahman, Uddin, Alam, Sadhu, & Seidel, 2006).

El alto contenido de vitamina A podría explicar su acción sobre afecciones de la piel y quemaduras (Robineau, 2005).

Además posee propiedades diurética, emenagoga, galactogoga, sudorífica, tónica, antidiabética, repelente, antidiurética, antivenérea. Para afecciones digestivas, nerviosas, astenia, debilidad, quemaduras, gastritis, hemorroides, amigdalitis, laxante, antipirético, afrodisíaco, astringente y cardíaco (Stolze, 1981).

### 3.2.1.4 Toxicidad

La  $DL_{50}$  de la semilla en el ratón por vía intraperitoneal es de 700mg/kg; a dosis de 500mg/kg por vía intraperitoneal en la rata no provoca ningún signo de toxicidad. En perros causa toxicidad de páncreas, hepatotoxicidad con hiperglicemia y aparente aumento en los niveles de insulina. Estos síntomas disminuyen con la administración de riboflavina. La semilla puede ser abortiva (Cáceres, 1996; Navas, 2006).

No se ha observado efectos letales de las hojas, dentro de las 24h después de la administración del extracto a ninguna dosis usada (125, 250 y 500mg/kg). La  $DL_{50}$  del extracto en ratones no se ha podido determinar (Shilpi et al., 2006).

### 3.2.1.5 Composición química

El extracto acuoso de la pulpa de las semillas contiene 900-2000UI/g de vitamina A, carotenoides ( $\beta$ -caroteno, bixina, norbixina, luteína), aminos, flavonoides, triterpenos, leucoantocianinas, taninos y minerales. Las hojas contienen alcaloides, flavonoides (apigenina, hipoaletina, cosmosina), diterpenos (farnesilacetona) y un hidrocarburo sesquiterpeno tricíclico (ishwarano) (Cáceres, 2006; Robineau, 2005).

En las extracciones realizadas a las hojas de *B. orellana*, se ha obtenido sustancias químicas que contienen flavonoides, alcaloides, antraquinonas, esteroides y saponinas (Huamán, Sandoval, Arnao, & Bejar, 2009).

### 3.2.2 Nombre científico: *Byrsonima crassifolia* L. HBK Familia Malpighiaceae

Sinonimia: *Byrsonima cinerea* Dec., *B. cotinifolia* HBK, *B. cubensis* Juss, *B. ferruginea* Kunth, *B. laurifolia* var *guatemalensis* HBK, *Malpighia crassifolia* L.

Nombre popular: Nance, nanchi, nanche, nance blanco, nancite, nancito, chaparro, chaparro de chinche, chaparro de sabana

#### 3.2.2.1 Descripción botánica y hábitat

Es un árbol de 4-8m de altura con la copa irregular. La corteza se desprende en placas cuando adulto. Las ramillas nuevas tienen pubescencia herrumbrosa. Las hojas son opuestas, ovalado-elípticas, cortamente acuminadas, de base estrecha, de 4-15cm de longitud, con el envés pubescente. La nerviación es marcada y la textura es coriácea. Los racimos terminales erectos de 5-15cm de longitud, con el eje tomentoso. Las flores son de color amarillo anaranjado de 1-1.5cm de diámetro con pétalos unguiculados. El fruto es drupa globosa de 1.5-2cm de diámetro, de color amarillo, con el cáliz persistente (Morton, 1981).

Es nativo de México a Sur América y Caribe en bosques secos y tropicales hasta 1800msnm. Se ha descrito en la mayoría de zonas cálidas de Guatemala (FAO, 1987).

### 3.2.2.2 Usos populares

Son muy conocidas las propiedades del nance para curar afecciones de la piel como sarna, salpullido y heridas, mediante el uso de la cocción hecha con éste y trozos de corteza de cedro; además ha resultado eficaz para afianzar las encías, aliviar el dolor de cintura, resfriado y para las mordeduras de víbora, también se utiliza para infecciones en la matriz e inflamación en los ovarios y otros tipos de desórdenes digestivos como disentería y dolor de estómago (Cáceres, 2006).

### 3.2.2.3 Actividades demostradas experimentalmente

La corteza y el jugo del fruto son astringentes. Toda la planta tiene propiedades antitusiva, contra el asma, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, desinflamante, antidiarréica y antipirética. El tallo y la raíz (hervidos) tienen actividad sobre *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Bacillus subtilis* (Cáceres, 2006; López, Rojas, & Jiménez, 1981; Martínez, 1998).

Estudios revelan que al evaluar la actividad antibacteriana de compuestos aislados de extractos diclorometánicos contra un panel de doce bacterias y *C. albicans*, los compuestos aislados inhibieron el crecimiento de las bacterias a concentraciones en el rango de 64 a 1088µg/mL (Rivero-Cruz, Sánchez-Nieto, Benítez, Casimiro, Ibarra-Alvarado, Rojas-Molina, & Rivero-Cruz, 2009).

Estudios farmacológicos demuestran que el extracto de hojas y corteza tienen efecto espasmogénico dosis-dependiente en ratas y efecto bifásico en yeyuno e íleo de rata. Los efectos dosis-dependiente por la prueba hipocrática en rata demostraron disminución de la actividad motora, analgésica, exoftalmos, Robichaud positivo, catalepsia e hipotermia (Cáceres, 2006).

### 3.2.2.4 Toxicidad

A la corteza se le atribuye cierta toxicidad, pero no hay toxicidad aguda de la infusión por administración oral a ratas de 1- 5g/kg (Cáceres, 2006).

### 3.2.2.5 Composición Química

La corteza tiene taninos, ácido oxálico, glucósidos, flavonoides, saponinas, sesquiterpenolactonas y triterpenos ( $\beta$ -amirina). El tamizaje bioquímico de las hojas indica saponinas esteroides insaturadas cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles y terpenoides (birsonimol) (Cáceres, 2006).

En varios estudios realizados, se aislaron ocho compuestos conocidos,  $\beta$ -amirina, betulina, ácido betulínico, ácido oleanólico, quercetina, (-)-epicatequina, ácido gálico y  $\beta$ -sitosterol de la fracción de diclorometano derivada del extracto metanólico de *B. crassifolia* (Rivero-Cruz et al., 2009).

3.2.3 Nombre científico: *Lippia graveolens* HBK. Familia: Verbenaceae

Sinonimias: *Lantana origanoides* Mart. & Gal., *L. berlandieri* Schauer in DC, *Goniostachym graveolens* Small.

Nombres populares: Orégano, orégano de monte.

#### 3.2.3.1 Descripción botánica y hábitat

Es un arbusto delgado hasta 2m de alto, tiene ramas con pubescencia cortamente pilosa. Las hojas en pecíolos tienen 5-10mm de largo, son oblongas a elípticas de 2-4cm de largo, obtusas o redondas en el ápice, subcordadas a la base, densamente pilosas, suaves al tacto, densamente tomentosas. Las flores son subglobosas a oblongas de 4-12mm de largo, brácteas ovado-lanceoladas, agudas; cáliz glandular; corola blanca de 3-6mm de largo (Cáceres, 2006).

Es nativa del sur de Texas y se extiende hasta Nicaragua. Se encuentra en bosques secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes pedregosas muy secas, en matorrales húmedos o secos y planicies hasta 350msnm. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Chiquimula, El Progreso y Zacapa (Cáceres, 2006).

### 3.2.3.2 Usos populares

La infusión de hojas se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales (amebiasis, antiséptico intestinal, cólico, diarrea, disentería, dispepsia, estreñimiento e indigestión) y respiratorias (asma, bronquitis, catarro, resfrío, tos y tosferina (Cáceres, 2006).

### 3.2.3.3 Actividades demostradas experimentalmente

La tintura e infusión de hojas son activas contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. Los extractos con diclorometano, etanol y el aceite esencial son activos contra bacterias Gram positivas y hongos (*C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum* y *Trichophyton rubrum*) (Cáceres, 2006).

El efecto del extracto acuoso sobre la sobrevivencia y proliferación celular fue significativo y dosis-dependiente. Sin embargo, la mayoría de las concentraciones evaluadas (7.81, 15.63, 31.25 y 62.5µg/ml) tuvieron un mayor efecto sobre la sobrevivencia, es decir que a una concentración dada se tuvo un porcentaje menor de sobrevivencia que de proliferación (Zavala, Loarca & García, 2001).

Actúa como tónico general, antiséptico, digestivo, espasmolítico carminativo, expectorante, antiséptico de vías respiratorias y emenagogo; tópicamente es analgésico, cicatrizante, antiséptico y antifúngica (Cáceres, 1996).

### 3.2.3.4 Toxicidad

El extracto acuoso, liofilizado, de hoja y tallo frescos, fue administrado por vía oral a dosis única de 5g/kg/día por 5 días a 10 ratones; el cual no presentó mortalidad, ni signo de toxicidad aguda en los parámetros evaluados (Navas, 2006).

Está contraindicado en el embarazo ya que puede producir aborto. El lapacherol tiene actividad carcinogénica y podría explicar cierta actividad antifertilidad atribuida (Navas, 2006).

### 3.2.3.5 Composición química

El tamizaje fitoquímico de las hojas el contiene: aceite esencial, glicósidos saponímicos, taninos y triterpenos, celulosa pigmento y elementos minerales; además flavonas (pinocembrina y naringenina) y lapachenol; la corteza y raíz contienen glicósidos saponímicos, aceite esencial y taninos (Cáceres, 1996).

Los aceites esenciales de esta especie contienen limoneno,  $\beta$ -cariofileno, p-cimeno, canfor, linalol,  $\alpha$ -pineno y timol, los cuales pueden variar de acuerdo al quimiotipo. En extractos metanólicos, se han encontrado siete iridoides minoritarios (loganina, secologanina, secoiloganina, dimetilsecologanosido, aciso loganico, acido-8-epi-loganico y carioptosido) y tres iridoides mayoritarios (ácido carioptosidico y sus derivados 6'-O-p-coumaroil y 6'-O-cafeoil) (Arcila, Loarca, Lecon & González, 2004).

3.2.4 Nombre científico: *Litsea guatemalensis* Mez. Familia: Lauraceae.

Sinonimias: *Litsea acuminatissima* Lundell, *L. matudau* Lundell; *Tehranthera glaucescens* var. *subsolitaria* Maissn.

Nombres populares: Laurel, aguarel, laurelillo, spac-tzé, sufricalla, zit-zuch.

#### 3.2.4.1 Descripción botánica y hábitat

Es un árbol de 6m de alto, ramas delgadas, café. Las hojas coriáceas, pecíolo 1.5cm de largo, elíptico-lanceoladas de 8cm de largo, agudas en la base, lustrosas y glabras. Las flores son axilares, con pedúnculo simple, solitarias de 15mm de largo y tiene de 5-11 flores (Cáceres, 2006).

Crece en bosques mixtos densos, húmedos y frecuentemente en bosques abiertos de pino, entre 1,500 y 3,150msnm. Es endémica de los departamentos de Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango y Sololá (Martínez et al., 1989).

#### 3.2.4.2 Usos populares

El cocimiento o infusión de hoja por vía oral se usa para afecciones respiratorias y gastrointestinales, carencia de leche en la madre e hinchazón. En saumerios se usa para parálisis y en gargarismos para la inflamación de la garganta (Cáceres, 2006).

#### 3.2.4.3 Actividades demostradas experimentalmente

La tintura de no tiene actividad contra enterobacterias, pero tiene moderada actividad contra *C. albicans*, *E. floccosum* y *Mycrosporium canis*. El extracto etanólico presenta actividad insecticida contra hormigas (Cáceres, 2006).

#### 3.2.4.4 Toxicidad

No se encontró referencias sobre la toxicidad. Está contraindicado en el embarazo y en pacientes con gastritis, colitis y úlcera péptica (Cáceres, 2006).

El aceite puede producir dermatitis de contacto y fenómenos de fotosensibilización, en altas dosis puede ser tóxico al sistema nervioso central (Cáceres, 2006).

#### 3.2.4.5 Composición química

En la revisión de literatura en Chemical Abstracts y NAPRALERT se encontró poca información sobre la composición química de las dos especies nativas del país. Por su olor característico similar a *Laurus nobilis* L., se supone que tiene un aceite esencial rico en derivados terpénicos y glicéridos de los ácidos láurico, oleico, palmítico y linoléico (Cáceres, 2006).

El tamizaje fitoquímico indica en las hojas la presencia de alcaloides cuaternarios y no cuaternarios, saponinas, esteroides insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, quercitina, estibina, taraxon y aceite esencial que contiene limoneno y citral (Cáceres, 2006).

El aceite esencial de contiene 1,8 cineol,  $\alpha$ -terpineol, linalol, terinen-4-ol y 70 compuestos más (Cáceres, 2006).

3.2.5 Nombre científico: *Petiveria alliacea* L. Familia: Phytolaccaceae

Nombre popular: Apacín, anamú, hierba de gallinitas, ipacina, payche, zorrillo.

### 3.2.5.1 Descripción botánica y hábitat

Es una hierba perenne, el es tallo erecto hasta 1m de alto, leñoso. La raíz es profunda y olorosa. Las ramas son jóvenes puberulentas o glabras. Las hojas poseen pecíolo de 1-5cm de largo, limbo oblongo, verde brillante, inflorescencias en racimos delgados de 10-35mm de largo, poco floreados. Las flores son subsésiles o en cortos pedicelos con sépalos blanco-verduzcos, oblongo-lineares de 3-4mm de largo. Los frutos son comprimidos en el raquis, angostamente cuneado (Morton, 1981).

Nativa de México, Caribe, Centro y Suramérica. Se encuentra en campos calientes ya sean secos o húmedos, cerca de casas y en terrenos sin cultivar. En Guatemala se ha descrito en la mayoría de departamentos de clima caliente y húmedo (Morton, 1981).

### 3.2.5.2 Usos populares

Es utilizado para sanar nacidos o forúnculos, problemas del hígado, colerín, fiebre, problemas intestinales, para el pecho, epilepsia, constipados, sinusitis, gripe, tos, dolor de cabeza, aires, dolor de estómago, parálisis, reumatismo, tosferina (Cáceres, 2006).

### 3.2.5.3 Actividades demostradas experimentalmente

La tintura y cocimiento tiene ligera actividad contra *E. floccosum*, no así contra otros dermatofitos. El extracto etanólico es activo contra *Plasmodium falciparum* 100mg/ml; estimula la actividad fagocítica del sistema reticuloendotelial al proteger ratones inoculados con dosis letales de *E. coli* (Baccou, 1997). Los extractos acuoso y etanólico inhiben modelos de tumores e inhiben la proliferación de linfocitos y de células de medula ósea; las hojas son antimutagénicas en un sistema de segregación mitótica inducido por mebendazole en *Aspergillus nidulans* (DeLaveau, Lallouette, & Tessier, 1980).

Las hojas son antimutagénicas en un sistema de segregación mitótica inducido por mebendazole y *A. nidulans* (Martínez et al., 1989). Contienen polifenoles, a los cuales, se les ha descrito un efecto inhibitorio de la ciclooxigenasa-1 (COX-1). La acción anticancerosa de las hojas se atribuye al belcil-2-hidroxi-etil-trisulfuro presente en ellas. El dibenciltrisulfuro (DTS) se considera el principal compuesto lipofílico de la *P. alliacea* (Ferrer, 2007).

La decocción y extracto de hojas y raíz es antiinflamatoria y analgésica, inhibe el edema por carragenina y aspirina y las contorsiones por ácido acético, pero no tiene efecto en la pleuresía por carragenina (DeLaveau et al., 1980).

#### 3.2.5.4 Toxicidad

La DL<sub>50</sub> es de 360mg/kg en la rata (Estevez, 1976). La administración en ratones albinos, de los extractos etanólicos y acuoso de partes aéreas de la planta por vías interperitoneal, intramuscular e intratecal, produjo signos de toxicidad en relación con la supervivencia (Germeno, 1993).

La administración oral del extracto de raíz mostró baja toxicidad en ratas. El extracto hidroetanólico de raíz, 1mg del cual equivaldría a 7.7mg de raíz seca, en contacto local con la piel de las ratas, no produce reacción de irritabilidad durante los 15 días sucesivos a su aplicación (Morón, 1990).

La DL<sub>50</sub> por vía intraperitoneal en el ratón es de 1673.11mg/kg (Bernal, & Correa, 1992). Se demostró que los efectos producidos por la ingestión de un determinado peso de *P. alliacea* en ovinos raza africana, son similares a los presentados en los casos de intoxicación con pesticidas organofosforados, carbamatos. No se observó ningún signo externo de toxicidad durante 7 días ni causó la muerte de ratones después de la administración oral única de 10g/kg; la decocción no presenta genotoxicidad en células germinales de rata macho (Robineau, 1989).

No se recomienda su uso en embarazadas, pues puede producir abortos y su contenido en cumarinas limita su indicación en pacientes bajo tratamientos con anticoagulantes (Ferrer, 2007).

#### 3.2.5.5 Composición química

La planta contiene triterpenos, acetato de isoarbinol, cinamato de isoarbinol, cumarinas,  $\beta$ -sitosterol, pinitol, alantoina, alcohol lignocerílico, ácido lignocérico, lignocerato de lignoceníl y  $\alpha$ -friedilínol (Robineau, 1989).

El tamizaje fitoquímico de las hojas, contiene esteroides ( $\beta$ -sitosterol), terpenoides, saponinas, polifenoles y taninos (Ocampo, Martínez, & Cáceres, 2007).

La planta entra en la composición del curare. La raíz contiene derivados sulfurados, esteroides, terpenoides, saponosidos y polifenoles (Robineau, 1989).

3.2.6 Nombre científico: *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger Familia: Polypodiaceae

Sinonimias: *Polypodium aureum* L. *P. araolatum* H&B, *P. calahuala* L. y *P. leucotomos* Poir.

Nombres Populares: Calahuala, polipodio.

#### 3.2.6.1 Descripción botánica y hábitat

Es un helecho epífita con rizoma rastrero y sinuoso de 8-15mm de grueso, cubierto con una pelusa dorado-café. Las frondas son separadas y esparcidas sobre tallos brillantes, cafés. Las hojas ovado-oblongas, son verde brillantes, amarillentas o azul-verdosas de 30-120cm de largo y de 20-40cm de ancho, divididas en segmentos puntiagudos oblongos, algunas veces traslapadas (Morton, 1981).

Crece en América tropical desde Florida hasta Argentina. Bajo el nombre *Phlebodium pseudoaureum* la mencionó como única representante del género en Argentina, para las provincias de Catamarca, Jujuy, Misiones, Salta y Tucumán. Crece en el interior o márgenes de selva, y lugares semiabiertos (Ponce, 1996). En Guatemala, se ha descrito en Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa (Cáceres, 2006).

#### 3.2.6.2 Usos populares

La decocción e infusión del rizoma se usan oralmente para tratar afecciones respiratorias y cardíacas, reumatismo, diabetes, gota, hipertensión, purificar la sangre y afecciones genitourinarias (Stolze, 1981).

Tópicamente se usa la infusión en emplasto y cataplasma para el tratamiento de contusiones, reumatismo, úlceras, quebraduras, cáncer, cierto tipo de tumores, psoriasis y eczema. La decocción de las hojas se usa para detener las hemorragias (Stolze, 1981).

### 3.2.6.3 Actividades demostradas experimentalmente

La decocción del rizoma produce moderada actividad diurética en ratas. En tejido tumoral, una de sus saponinas (anapsos) reduce la incorporación de nucleoproteínas y precursores por un mecanismo anabolizante opuesto a la acción de citostáticos (Cáceres, 2006).

El extracto de hojas es activo contra bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas campestris*). La calahualina es una saponina aislada del rizoma que tiene actividad antitumoral (Linares, Flores, & Bye, 1998).

La administración oral del extracto acuoso tiene acción inmunomoduladora medida por proliferación del bazo de ratón con Con A. Una fracción del extracto acuoso (anapsos) produce en ratas hipoactividad cerebral dosis-dependiente posiblemente por variación en los niveles de IL-1 $\beta$  hipotalámica. El extracto prolonga la sobrevivencia de aloinjertos cutáneos en ratones, sugiriendo una actividad inmunosupresora (Cáceres, 2006).

Se le atribuye propiedad analgésica, antihemorrágica, depurativa, diurética, desinflamante, emenagogo, espasmolítico, expectorante, febrífuga, laxante, pectoral, purgante, sudorífica y tranquilizante (Cáceres, 2006).

### 3.2.6.4 Toxicidad

Los extractos acuosos y etanólicos del rizoma (500mg/kg) no fueron ictiotóxicos (Cáceres, 2006).

### 3.2.6.5 Composición química

El rizoma contiene azúcar, aceite esencial, mucilago, almidón, nitrato de potasio y colorantes rojo; calagualina, polipodina, aceites grasos y taninos, esteroides (ecdisterona y ecdisomas como la polipodaureina) (Cáceres, 2006).

La  $\alpha$ -ecdisona es un esteroide aislado de palomillas presente en algunos vegetales. Por fraccionamiento bioquímico por inhibición de células liberadoras de plaquetas (PAF) se aisló la adenosina como uno de los inmunomoduladores que podría explicar sus propiedades terapéuticas; inhibe la exocitosis por PAF (CL<sub>50</sub> 0.024 mg/ml) de manera dosis-dependiente, aunque es inactiva en el modelo de biosíntesis; es un nucleósido ampliamente distribuido en la

naturaleza, con usos farmacéutico como antiarrítmico, en la taquicardia supraventricular. El anapsos (saponina de cetosteroide y desohihexosa), posee actividad inmunomoduladora (Cáceres, 2006).

3.2.7 Nombre científico: *Smilax domingensis* Wild. Familia: Smilacaceae

Sinonimias: *S. lanceolata* L., *S. caudata* Lundell

Nombres populares: Zarzaparrilla, bejuco de la vida, cocolmecam China root, diente de chucho, palo de la vida.

#### 3.2.7.1 Descripción botánica y hábitat

Son bejuco leñosos, dioicos, trepando por zarcillos se distinguen en más de 200 especies, varias usadas en medicina. Se distinguen dos grupos de rizoma leñoso y raíz filiforme (Morton, 1981).

*S. domingensis* es glabra, tiene el tallo rollizo con agujones recurvados. Las hojas son de 1-6 veces más largas que anchas, ovadas con 5 nervios desde la base. Las umbelas son estaminadas y pistiladas solitarias, el pedúnculo es más corto que el pecíolo. Las bayas son de 7-10mm, rojas con rizoma leñoso (Morton, 1981).

Es nativa de bosques húmedos y espesuras hasta 2,100msnm; distribuida de Veracruz a Panamá y las Antillas (Morton, 1981).

#### 3.2.7.2 Usos populares

Por vía oral el cocimiento se usa para tratar anemia, afecciones digestivas, hinchazón, dolor de riñones, enfermedades de la sangre, hepatitis, reumatismo y tumores (Cáceres, 2006).

#### 3.2.7.3 Actividades demostradas experimentalmente

Estudios con material silvestre demostraron actividad antifúngica in vitro, que se confirmó con ensayos clínicos en candidiasis y tinea (Cáceres, 2009). Además se ha demostrado que la decocción y extracto metanólico son activos contra *C. albicans*, *E. floccosum*, *M. canis* y *Trichophyton mentagrophytes* (Cáceres, 2006).

La tintura del rizoma de *S. domingensis* es activa contra bacterias Gram positivo y Gram negativo (Cáceres,2009).

La decocción del rizoma tiene actividad diurética en ratas comparable con hidroclorotiazida y cierta actividad inmunomoduladora en ratones medida por un aumento en la población de linfocitos y en los títulos de anticuerpos séricos. El extracto etanólico tiene actividad antioxidante y hepatoprotectora (Cáceres, 2006).

Los esteroides de saponinas en *Smilax* sp. son los responsables de muchas propiedades medicinales atribuidos a esta planta (Robineau, 1989).

#### 3.2.7.4 Toxicidad

La parrillina contiene un DL<sub>50</sub> de 10mg/kg por vía intraperitoneal, mientras que por vía oral es de 30mg/kg (Cáceres, 1991).

#### 3.2.7.5 Composición química

Estudios realizados en *S. lundelli* indicaron la presencia de alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glicósidos esteroidales (saponinas, cardenólidos, bufadienólicos), flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas (Cáceres, & Martínez, 2001).

La raíz contiene glicósidos, saponinas (sarsaponina y parrillina), que dan por hidrólisis sapogeninas isoméricas como sarsapogenina y smilagenina (Cáceres, 1991; Cáceres, & Martínez, 2001).

3.2.8 Nombre científico: *Solanum nigrescens* Mart & Gal. Familia: Solanaceae

Sinonimias: *S. amethystinum* Kuntze, *S. leonii* Heiser, *S. douglasii* Dunal, *S. macrotonum* Bitter (Gentry, & Standley, 1974).

Nombres populares: Quilete, macuy, hierba mora, imut.

### 3.2.8.1 Descripción botánica y hábitat

*Solanum nigresces* es una hierba de 0.5-2m de alto, el tallo es piloso. Las hojas crecen en pares o solitarias de diferentes tamaños, similares en forma, lanceoladas de 3-18cm de largo con ápice acuminado y base atenuada. Tiene inflorescencia intermodal, racemiforme, el cáliz lobulado; la corola es blanca o lila con una mancha oscura en la base y filamentos ciliados; ovario glabro. Su fruto es globoso, generalmente negro en la madurez, de 4.5-7mm de diámetro. Las semillas son lenticulares de 1-1.5mm de diámetro, fuertemente comprimidas, aplanadas de superficie escalariforme, de color café-naranja a amarillo (Asociación Biotas, 2001; Cáceres, 2006).

Es nativa de México y Costa Rica, crece en matorrales y bosques mixtos. En Guatemala se ha descrito en el Altiplano en alturas de 1,500-3,900msnm (Cáceres, & Aragón, 1994).

### 3.2.8.2 Usos populares

El cocimiento de las hojas tiene amplio uso medicinal por vía oral ya que se administra en afecciones digestivas y respiratorias, anemia, hinchazón, nerviosismo, retención urinaria y reumatismo (Cáceres, 2006).

### 3.2.8.3 Actividades demostradas experimentalmente

La actividad antibiótica del género *Solanum* se atribuye  $\alpha$ -solanina, un alcaloide esferoidal básico que presenta actividad antifúngica contra *C. albicans* y hongos, además de ser insecticida y antiinflamatorio (Cáceres, 2006). Otros estudios revelan que por fraccionamiento bioguiado del extracto alcohólico, análisis de masa y resonancia magnética nuclear se demostró que el principio responsable de la actividad antifúngica en *S. nigrescens* es un glicósido de spiristanol (cantalasaponina) (He, et al., 1994).

La decocción de hojas es antibiótica, y activa contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. pyogenes*; la decocción y tintura son activas contra *C. albicans*, *C. neoformans*, la tintura de *S. nigrescens* inhibe 66% de cepas de *C. albicans* aisladas en lesiones de diferente región anatómica; la decocción es antidermatofítica (Cáceres, & Aragón, 1994).

Estudios in vitro en 1993 mostraron que *S. nigrescens* posee una mayor inhibición contra *Garnerella vaginalis* con halo promedio de 18.5cm de diámetro, además de ser la única planta que tiene acción inhibitoria contra cándida y tricomonas (Montes, 1993; Salazar, 2009)

La decocción de hojas es inmunomoduladora en ratones demostrada por proliferación de linfocitos y aumento de anticuerpos séricos. La infusión es antiinflamatoria en la inflamación podal por carragenina y espasmolítica frente a acetilcolina y a cloruro de bario, de donde se deduce que inhibe el espasmo por mecanismos muscarínicos y musculotrópicos (Cáceres, & Aragón, 1994; Salazar, 2009).

#### 3.2.8.4 Toxicidad

El extracto es hemolítico aún en altas diluciones; en concentraciones terapéuticas no presenta citotoxicidad a células de fibroblastoma; muestra cierta toxicidad subaguda al administrarse por vía intraperitoneal (IP) 500mg/ml. El clorhidrato de solanina se usa como insecticida en la agricultura, su  $DL_{50}$  es 42mg/kg por vía IP en ratón (Cáceres, & Aragón, 1994).

De acuerdo a trabajos realizados se encontró que la dosis de 5g/kg de peso en ratones el quilete no induce toxicidad aguda. Así mismo se refiere q no posee toxicidad al ser administrado en forma de infusión acuosa a ratones albinos a dosis de 7.50 y 1000mg/kg de peso (Vásquez, 1997).

#### 3.2.8.5 Composición química

Demostró  $\alpha$ -solanina, un alcaloide esferoidal básico, así como solasodina y solasonina, esteroides policíclicos insaturados, saponinas, azúcares 2-desoxigenados, taninos, cardenólidos, ácido málico, riboflavina, ácido ascórbico y sales minerales (Cáceres, & Aragón, 1994).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El uso de plantas medicinales ha sido siempre una fuente común de medicamentos tanto en la forma de preparaciones tradicionales como de principios activos puros. Datos obtenidos por la Organización Mundial de la Salud estiman que quizás el 80% de los habitantes de la tierra, confían en la medicina tradicional para sus principales necesidades de salud y se puede afirmar que gran parte de las terapias tradicionales entrañan el uso de extractos de plantas o de sus principios activos, constituyendo fármacos eficaces para su uso en la atención primaria o secundaria de salud (OMS, 2004).

En Guatemala, las plantas medicinales son usadas frecuentemente para el tratamiento de enfermedades, ya sea por las facilidades de obtención o por el bajo costo de las mismas en comparación con la medicina química.

Las plantas contienen una diversidad de metabolitos secundarios, entre los cuales unos de los más comunes son las saponinas. Estas tienen propiedades biológicas y farmacológicas tales como actividad antibacteriana, antimicótica y antitumoral, entre otras. Una de las propiedades descritas de las saponinas es su capacidad hemolítica.

El presente estudio pretende conocer y determinar experimentalmente el efecto *in vitro* sobre los eritrocitos humanos, cuando estos se someten a la acción de los extractos de ocho plantas de uso medicinal de Guatemala, los cuales se caracterizan por contener dentro de sus metabolitos secundarios alguna saponina, siendo estas moléculas las responsables de la actividad contra microorganismos patógenos al hombre.

Las ocho especies escogidas son de uso común en Guatemala, y es necesario estudiar si el consumo de estos extractos podría afectar la estabilidad de los eritrocitos humanos por la acción de las saponinas.

Así mismo se pretende cuantificar el contenido de saponinas con el fin de determinar el efecto a diferentes concentraciones sobre los eritrocitos humanos, de forma negativa, causando hemólisis.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General

Determinar el efecto hemolítico *in vitro*, de las saponinas de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala.

### 5.2 Específicos

- 5.2.1 Establecer un método cualitativo y uno cuantitativo para evaluar la actividad hemolítica *in vitro*, de ocho plantas de uso medicinal, utilizando eritrocitos humanos.
- 5.2.2. Evaluar la actividad hemolítica *in vitro*, de extractos de ocho plantas de uso medicinal con actividad antimicrobiana comprobada experimentalmente.
- 5.2.3 Cuantificar el contenido de saponinas de las ocho especies de uso medicinal por medio de una técnica cromatográfica y colorimétrica.
- 5.2.4 Determinar la relación entre la concentración de las saponinas y la actividad hemolítica *in vitro*, de las mismas, sobre eritrocitos humanos.

## 6. HIPÓTESIS

De los 8 extractos que contienen saponinas, ninguno presenta actividad hemolítica.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Universo De Trabajo

Plantas medicinales utilizadas en Guatemala para el tratamiento de diversas enfermedades.

### 7.2 Muestra

Constituido por los extractos vegetales de

- *Bixa orellana* (Achiote)
- *Byrsonima crassifolia* (Nance)
- *Lippia graveolens* (Orégano)
- *Litsea guatemalensis* (Laurel)
- *Petiveria alliacea* (Apacín)
- *Phlebodium pseudoaureum* (Calahuala)
- *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla)
- *Solanum nigrescens* (Quilete)

### 7.3 Recursos

#### 7.3.1 Humanos

- Autora: Virginia Jeannette Hermosilla Carazo
- Autora: Astrid Carolina Hernández Guzmán
- Asesor: Lic. Armando Cáceres
- Revisora: Licda. Margarita Paz

#### 7.3.2 Institucionales

- Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Productos Naturales Farmaya, S.A.
- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT).

#### 7.3.3 Material y equipo

- Cajas de Petri
- Tubos de ensayo

- Beakers
- Balones volumétricos
- Agitadores magnéticos
- Cromatoplaca de Silica gel 60F-254
- Lámpara de luz UV
- Gradilla para tubos de ensayo
- Papel filtro
- Tamiz
- Percolador de vidrio o acero inoxidable
- Centrífuga
- Incubadora
- Espectrofotómetro
- Vortex
- Balanza
- Autoclave
- Campana de flujo
- Refrigeradora
- Estufa
- Pinzas
- Embudo
- Espátula
- Medidor de humedad
- Baño de María
- Cronómetro
- Termómetro
- Horno
- Cámara para cromatografía
- Pipetas
- Tips para pipeta
- Pizeta
- Papel limpia lentes
- Varillas de vidrio

- Mechero
- Regla
- Tubos vacutainer
- Jeringas
- Algodón
- Ligadura
- Guantes
- Parafilm
- Mayordomo

#### 7.3.4 Reactivos

- Agua destilada
- Materia vegetal seca
- Control de saponinas (diosgenina, ergosterol, estigmasterol y colesterol)
- Extractos de las especies vegetales
- Metanol
- Etanol 95%
- Etanol 70%
- Cloroformo
- Cloruro de antimonio
- Acetato de etilo
- Reactivo A
- Reactivo B
- Sangre humana
- Ácido cítrico
- Amortiguador fosfato
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Disodio hidrogeno fosfato ( $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ )
- Reactivo Drabkin's
- Suspensión de eritrocitos
- Agar base

## 7.4 Metodología

### 7.4.1 Ensayo de espuma

Se pesó 100mg de material vegetal seco y pulverizado y se colocó en un tubo de ensayo. Se debe de utilizar 2 tubos control: 1) con 2ml de control de saponinas y 2) con 2ml de agua destilada.

Se añadió 10ml de agua destilada a cada tubo y se calentó en baño de María por 30 minutos.

Se dejó enfriar, luego se tapó y agitó vigorosamente durante 30 a 40 segundos. Se dejó reposar los tubos en posición vertical durante media hora. La prueba es positiva al formarse una capa de espuma mayor de 3cm sobre la superficie del líquido, se sospecha que contiene saponinas. Sin embargo, si la espuma es poca y fugaz puede atribuirse a una mínima concentración de saponinas o también puede deberse a la presencia de proteínas o ácidos orgánicos (Medinilla, 1993).

### 7.4.2 Caracterización de saponinas mediante CCF

#### 7.4.2.1 Preparación del extracto

Se extrajo 1g del material vegetal pulverizado con 5ml de metanol, calentando en baño de maría. Se evaporó hasta aproximadamente 1ml.

#### 7.4.2.2 Solución estándar

Se debe preparar una solución de saponinas al 0.1% en metanol.

#### 7.4.2.3 Fase estacionaria

Se utilizaron Cromatoplasmas de sílica gel 60F – 254.

#### 7.4.2.4 Fase móvil

Cloroformo – metanol – agua (64:50:10).

Se empleó cloroformo grado analítico (el grado técnico contiene alcohol), y la cromatografía se realizó a 20°C, 30 min. después de haber añadido el solvente, para saturar la cámara.

#### 7.4.2.5 Detección

Esta se realizó por medio del reactivo de cloruro de antimonio III: preparando una solución de cloruro de antimonio III al 10% en cloroformo. Se asperjó la cromatoplaca y luego se calentó por 5 – 6 min. a 100°C se evaluó en visible (colores rojo-violeta) y bajo luz ultra violeta de 365nm (fluorescencia rojo-violeta, azul y verde) (Medinilla, 1993).

#### 7.4.3 Método espectrofotométrico para cuantificación de sapogeninas

Se pesó exactamente 0.125g de la droga vegetal y se añadió 25ml de etanol de 95°. Se agitó y luego se calentó en baño de maría a 60°C por 20 min. Se filtró

Se transfirió una alícuota de 4ml a un beaker de 50ml y se dejó evaporar a sequedad en baño de maría.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió:

- 2ml de acetato de etilo
- 1ml de reactivo A (0.5ml de anisaldehído más 99.5ml de acetato de etilo)
- 1ml de reactivo B (Ácido sulfúrico al 50% en acetato de etilo).

Se agitó y calentó a 60°C en baño de María por 20 min.

Se dejó enfriar por 10 min.

La curva de calibración se realizó preparando una solución madre de diosgenina, a una concentración de 10µg/ml de etanol de 95°.

A partir de dicha solución, se preparan estándares de referencia, a concentraciones de 2, 4, 6 y 8µg/ml.

Como blanco se utilizó la mezcla de 2ml de acetato de etilo, 1ml de reactivo A y 1ml de reactivo B.

Tanto los estándares como el blanco se trataron igual que la muestra (Medinilla, 1993).

#### 7.4.4 Método de hemólisis directa en placa de agar

Se preparó una caja de Petri con agar sangre y usando un tubo de ensayo de aproximadamente 1cm de diámetro se removió una capa de agar de 3 partes diferentes de la caja, equidistantes entre sí (Medinilla, 1993).

Con la ayuda de un mechero se calentó un agitador de vidrio de 1 a 2mm de diámetro, e inmediatamente se sellaron los bordes del agar de cada agujero, para impedir que el extracto acuoso del vegetal no se difundiera por debajo de la capa de agar. (Medinilla, 1993). Este, se añadió utilizando una pipeta Pasteur. Se llenó la segunda copa con control de saponinas y la tercera con agua destilada (Medinilla, 1993).

La presencia de zonas claras de hemólisis que circunden cualquiera de las copas, luego de 24 horas de reposo, es un resultado positivo, este se midió desde el punto más lejano de hemólisis a la orilla de la copa en milímetros (Medinilla, 1993).

#### 7.4.5 Método cualitativo de hemólisis directa en tubo

##### 7.4.5.1 Preparación de la suspensión de eritrocitos

En un matraz aforado de 50ml se colocaron 1ml de sangre con amortiguador de fosfato con un pH 7.4 y cuidadosamente se diluyó hasta volumen. Esta suspensión de sangre diluida (solución al 2%) se almacenó a una temperatura fresca (OMS, 1998; Pharmacopea Italica/Vegetalium Compositiones, 1991).

##### 7.4.5.2 Preparación de solución de referencia.

Se transfirieron 10mg de saponina, exactamente pesados a un matraz aforado de 100ml y agregó amortiguador de fosfato a un pH de 7.4. Esta solución se preparo diariamente (OMS, 1998;Pharmacopea Italica/Vegetalium Compositiones, 1991).

##### 7.4.5.3 Ensayo preliminar

Se preparó una dilución del extracto de material vegetal con amortiguador fosfato de pH 7,4 y la suspensión de sangre (2%) con cuatro tubos como lo indica la siguiente tabla (OMS, 1998; Pharmacopea Italica/Vegetalium Compositiones, 1991).

Tabla 1.

Determinación de actividad hemolítica: dilución seriada para prueba preliminar

	Tubo No.			
	1	2	3	4
Extracto de planta (mL)	0.10	0.20	0.50	1.00
Amortiguador fosfato pH 7.4 (mL)	0.90	0.80	0.50	---
Suspensión de sangre al 2% (mL)	1.00	1.00	1.00	1.00

Fuente: *Quality control methods for medicinal plant materials. 1998. WHO*

Suavemente se invirtieron los tubos para mezclar, evitando la formación de espuma. Se dejaron reposar por 30 minutos y nuevamente se agitaron, luego se dejaron reposar durante 6 horas a temperatura ambiente.

La interpretación de los tubos se realizó por medio del registro de la dilución en la que la hemólisis es total, indicado por una solución clara, roja, sin ningún tipo de depósito de los eritrocitos, de la manera siguiente (OMS, 1998; Pharmacopea Italica/Vegetalium Compositioes, 1991).

- Si la hemólisis total sólo se observa en el tubo 4, utilizar el material vegetal original extraer directamente para la prueba principal.
- Si la hemólisis total se observa en los tubos 3 y 4, preparar una doble dilución del extracto de la planta original de material con amortiguador fosfato de pH 7.4.
- Si la hemólisis total se observa en los tubos 2, 3 y 4, preparar cinco veces la dilución de la original extraer material vegetal con amortiguador fosfato de pH 7.4.
- Si, después de 6 horas, los cuatro tubos contienen una solución clara, rojo, preparar diez veces la dilución del extracto de la planta original de material con amortiguador fosfato pH 7.4 y llevar a cabo el ensayo preliminar como se describió anteriormente.
- Si la hemólisis total no se observa en cualquiera de los tubos, repetir el ensayo preliminar con una mayor concentración de extracto de material vegetal.

#### 7.4.5.4 Prueba principal

Se preparó una dilución del extracto de material vegetal, determinado por el ensayo preliminar, con amortiguador fosfato pH 7.4 y la suspensión de sangre (2%) con 13 tubos de ensayo como se muestra en la Tabla 2.

Las diluciones y las evaluaciones se efectuaron como en la prueba preliminar, con la variante que la interpretación de los resultados se realizó después de 24 horas de reposo (OMS, 1998; Pharmacopea Italica/Vegetalium Compositiones, 1991).

Tabla 2.

Determinación de la actividad hemolítica: dilución seriada de la prueba principal

		Tubo No.												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Extracto de materia vegetal (mL)	de	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	1.00
Amortiguador fosfato pH 7.4 (mL)		0.60	0.55	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	--
Suspensión de sangre al 2% (mL)	de	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Fuente: *Quality control methods for medicinal plant materials. 1998. WHO*

La actividad hemolítica del material de las plantas en estudio se calculó por medio de la siguiente fórmula

$$1000xa/b$$

Dónde:

1000 = se define en la actividad hemolítica de la saponina en relación con la sangre.

A = cantidad de saponina que produce hemólisis total (g),

b = cantidad de material vegetal que produce hemólisis total (g).

#### 7.4.6 Método cuantitativo de hemólisis por espectrofotometría

##### 7.4.6.1 Suspensión de glóbulos rojos

La sangre humana se obtuvo a partir de recolección por punción venosa de individuos sanos y añadidos a tubos heparinizados; se centrifugó la sangre a 3000rpm por 5 minutos, se removió el plasma y la capa de glóbulos blancos y el botón de eritrocitos se lavó 3 veces con

amortiguador McIlvaines, hasta obtener un sobrenadante claro en la centrifugación. A partir de este material se preparó una suspensión al 2 % de eritrocitos, disueltos en amortiguador McIlvaines (Dehghan, Sharififar, Khatib, Behravan, & Ahmadi, 2009).

#### 7.4.6.2 Amortiguador McIlvaines

Se realizó de la siguiente manera: solución 1: 21g de ácido cítrico (100mM) y 8.775g NaCl (150mM), se aforó a 1000ml con agua desionizada y se mezcló con solución 2 la cual contiene 28.4g de disodio hidrogeno fosfato (200mM) y 8.775 NaCl (150mM) aforado a 1000ml con agua desionizada con un pH de 7.0 (Dehghan et al., 2009).

#### 7.4.6.3 Método Hemolítico

En microtubos se colocó 200µL de la suspensión de eritrocitos y 200µL de las muestras de extractos preparados en amortiguador McIlvaines (Dehghan et al., 2009).

Se incubaron a 25 y 37°C por 15 y 30 minutos respectivamente. Luego se centrifugaron a 3000 rpm por 35 segundos y se extrajeron 200µL del sobrenadante, para luego agregar 3ml del reactivo Drabkin's.

La absorbancia de las muestras se midió a una longitud de onda de 540nm en el espectrofotómetro (Dehghan et al., 2009).

Control positivo: 200µl de eritrocitos sin centrifugar, 200µL del amortiguador y 3ml de reactivo Drabkin's para evaluar el 100% de hemólisis (Dehghan et al., 2009).

Control negativo: 200µL de amortiguador y agregar 3ml de reactivo Drabkin's (Dehghan et al., 2009).

El porcentaje (%) de hemolisis de cada muestra se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$A/b*100$$

Dónde: A= absorbancia de la muestra; b= absorbancia del control positivo; 100= porcentaje

La concentración hemolítica media (CH<sub>50</sub>) indica la concentración a la cual se hemolizan el 50% de eritrocitos.

## 7.5 Diseño Estadístico

En la investigación, se efectuó la cuantificación de saponinas de cada uno de los ocho extractos, para los cuales se realizó un promedio de 3 determinaciones y con los resultados se reportó promedio y desviación estándar.

Para el análisis de la actividad hemolítica en placa de los ocho extractos de las plantas en estudio, el resultado se clasificó como: hemólisis o no hemólisis, por lo que se utilizó una distribución binomial, para un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , para lo cual se llevaron a cabo 5 repeticiones de cada extracto para realizar una prueba de hipótesis, las cuales se plantean de la siguiente forma:

Ho:  $p \leq 0.5$  (no tiene efecto hemolítico)

Ho:  $p > 0.5$  (si tiene efecto hemolítico)

Ho se rechaza si los 5 ensayos dan respuesta de hemólisis positiva.

Se realizó un análisis de hemolisis en tubo, para corroborar la prueba de hemolisis en placa, esta se efectuó por triplicado a diferentes concentraciones y los resultados se tabularon en forma descriptiva semicuantitativa, evaluado en cruces.

Para la curva de hemólisis, se realizó para cada dosis del extracto ( $n=8$ ) un mínimo de 3 réplicas. Se hizo un análisis de regresión para encontrar la ecuación de cada extracto, evaluándose estadísticamente por medio del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el análisis de varianza para la regresión. Luego calcular cada  $CH_{50}$  de acuerdo a las ecuaciones, con un intervalo de confianza del 95%; estos valores se podrán comparar descriptivamente para establecer cuál o cuáles extractos son distintos.

El presente estudio es de tipo experimental, y se realizó totalmente al azar, los extractos se trabajaron aleatoriamente.

## 8. RESULTADOS

La presencia de saponinas se demostró por medio de la agitación de la solución acuosa de la muestra, para formar una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Esta prueba es presuntiva de saponinas esteroidales, ya que existen otras sustancias que pueden también formar espuma (Sparg et al., 2004).

Esta prueba se llevó a cabo por triplicado y se consideró como positiva si la capa de espuma formada fue mayor de 3 cm, sin embargo como puede observarse en el Cuadro 1, los resultados fueron menores a lo esperado por lo que puede ser debido a una mínima concentración de saponinas.

Cuadro 1 Prueba de espuma para determinación de saponinas

Plantas de estudio	Altura (cm) de espuma
<i>Byrsonima crassifolia</i>	1.5±0.12
<i>Bixa orellana</i>	0.5±0.06
<i>Lippia graveolens</i>	0.5±0.06
<i>Litsea guatemalensis</i>	0.1±0.06
<i>Petiveria alliacea</i>	0.3±0.06
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	0.2±0.12
<i>Smilax domingensis</i>	0.3±0.10
<i>Solanum nigrescens</i>	2.3±0.06
Estándar de saponinas	5.5±0.59

Fuente: datos experimentales

El total es en promedio de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar

Luego de la extracción de saponinas, se analizaron por el método de cromatografía en capa fina para su identificación, usando como estándares las saponinas esteroidales ergosterol, estigmasterol y diosgenina.

Todos los estándares demostraron la presencia de una hasta cinco bandas de saponinas como el caso de *L. graveolens* (Cuadro 2).

Cuadro 2 Caracterización de saponinas por medio de cromatografía en capa fina

Plantas de estudio	Valor Rf	Color	
<i>Byrsonima carssifolia</i>	1	Amarillo	
<i>Bixa orellana</i>	0.573	Violeta	
	0.897	Amarillo	
<i>Lippia graveolens</i>	0.955	Amarillo	
	0.823	Amarillo	
	0.676	Naranja	
	0.338	Amarillo	
	0.220	Azul	
<i>Litsea guatemalensis</i>	0.941	Amarillo	
	0.897	Amarillo	
	0.720	Verde	
	0.573	Amarillo	
<i>Petiveria alliacea</i>	0.970	Amarillo	
	0.411	Amarillo	
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	0.970	Azul	
	0.897	Azul	
	0.794	Amarillo	
<i>Smilax domingensis</i>	0.955	Amarillo	
<i>Solanum nigrescens</i>	0.647	Azul	
	0.455	Azul	
	○ Diosgenina	0.97	Amarillo
	○ Ergosterol	0.97	Amarillo
	○ Estigmasterol	0.97	Amarillo
		0.897	Amarillo
	○ Colesterol	0.97	Amarillo
	○ β-sitosterol	0.97	Amarillo
		0.897	Amarillo

Fuente: datos experimentales

Se realizó una curva de calibración para cada uno de los estándares para determinar la cantidad de saponinas totales en cada uno de los extractos de las diferentes plantas. Se validó el método como resultado un coeficiente de correlación de  $R^2$  de ergosterol de 0.9912, estigmasterol de 0.9928 y diosgenina de 0.9813 (anexo3).

Los datos obtenidos en la cuantificación de saponinas por espectrofotometría se observa en el cuadro 3.

Cuadro 3 Cuantificación de Saponinas en porcentaje del contenido del extracto

Planta	Ergosterol (%)	Estigmasterol (%)	Diosgenina (%)	Saponinas Esteroidales(%)
<i>Byrsonima crassifolia</i>	0	2.82 ± 0.0	2.53 ± 0.0	1.78 ± 0.2
<i>Bixa orellana</i>	1.06 ± 0.05	0.99 ± 0.05	0.36 ± 0.01	0.80 ± 0.04
<i>Lippia graveolens</i>	0.19 ± 0.06	0.28 ± 0.05	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.06
<i>Litsea guatemalensis</i>	2.03 ± 0.03	4.52 ± 0.02	3.03 ± 0.06	3.19 ± 0.10
<i>Petiveria alliacea</i>	1.23 ± 0.06	1.13 ± 0.05	0.40 ± 0.02	0.92 ± 0.04
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	1.43 ± 0.04	1.29 ± 0.04	0.44 ± 0.01	1.06 ± 0.05
<i>Smilax domingensis</i>	0.20 ± 0.04	0.27 ± 0.03	0.14 ± 0.09	0.21 ± 0.006
<i>Solanum nigrescens</i>	1.95 ± 0.01	1.72 ± 0.01	0.57 ± 0.03	1.42 ± 0.07

Fuente: datos experimentales

Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar

Para el análisis de la actividad hemolítica, se realizaron pruebas tanto cualitativas como cuantitativamente en triplicado.

Para la determinación de hemólisis en placa de agar, se utilizó agar base con sangre humana al 5%, en donde ninguna de las muestras analizadas produjo hemólisis, según se comparó con el estándar de saponinas.

El método de hemólisis cualitativo en tubo, se realizó en diluciones de los extractos. Los resultados se muestran en el Cuadro 4. Esta prueba se estandarizó según la metodología y no demostró hemólisis, por lo que se aumentó la concentración de los extractos para poder determinar la actividad hemolítica de los mismos.

Seis de las ocho plantas estudiadas (*B. crassifolia*, *B. orellana*, *P. alliacea*, *P. pseudoaureum*, *S. domingensis* y *S. nigrescens*) produjeron hemólisis en alguna concentración, y las otras dos (*L. graveolens* y *L. guatemalensis*) no produjeron hemólisis. Se calificó en cruces la cantidad de hemólisis (escasa, regular o abundante)

Cuadro 4 Determinación cualitativa de hemólisis en tubo

Plantas de estudio	Hemólisis			
	1 mg/ml	2mg/ml	5mg/ml	10mg/ml
<i>Byrsonima crassifolia</i>	----	----	+	++
<i>Bixa orellana</i>	+	+	++	+++
<i>Lippia graveolens</i>	----	----	----	----
<i>Litsea guatemalensis</i>	----	----	----	----
<i>Petiveria alliacea</i>	+	++	+++	+++
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	----	----	+	++
<i>Smilax domingensis</i>	----	+++	+++	+++
<i>Solanum nigrescens</i>	----	----	+	++
Estándar de saponinas	+++	+++	+++	+++
Solución salina	----	----	----	----

+ Escasa hemólisis ++ Regular hemólisis +++ Abundante hemólisis

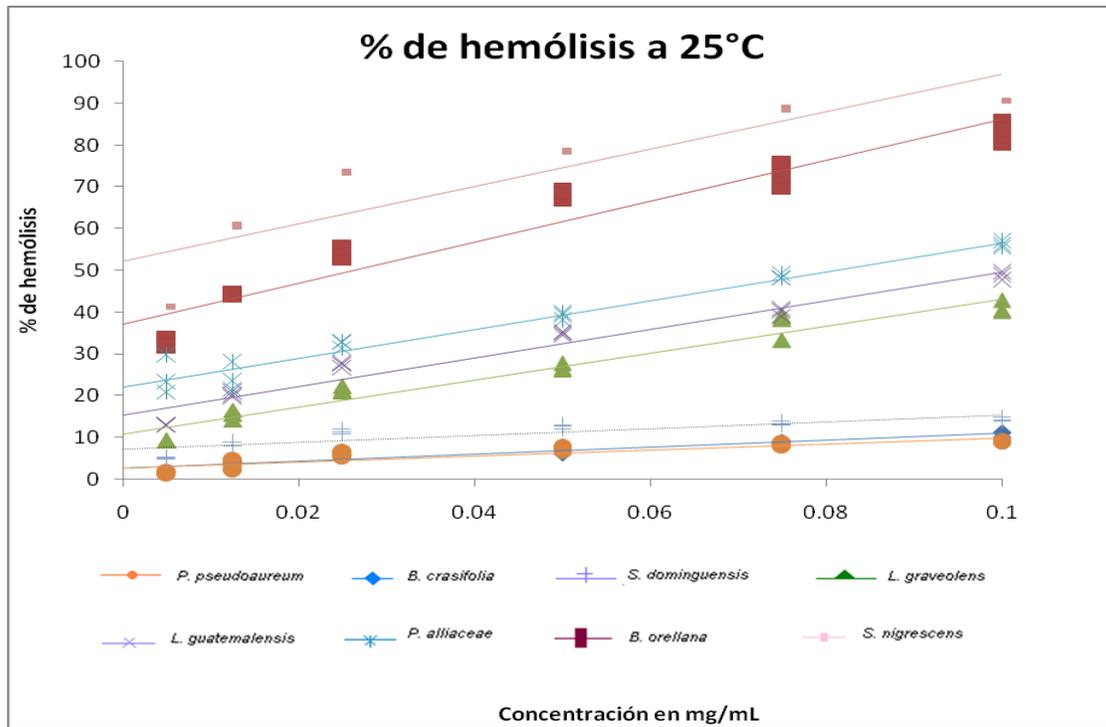
Fuente: datos experimentales

La cuantificación de hemólisis se llevó a cabo usando un método espectrofotométrico, en el cual se cuantificó la hemoglobina liberada por la hemólisis de los eritrocitos al estar en contacto con los extractos de las plantas en estudio, utilizando reactivo Drabkin's.

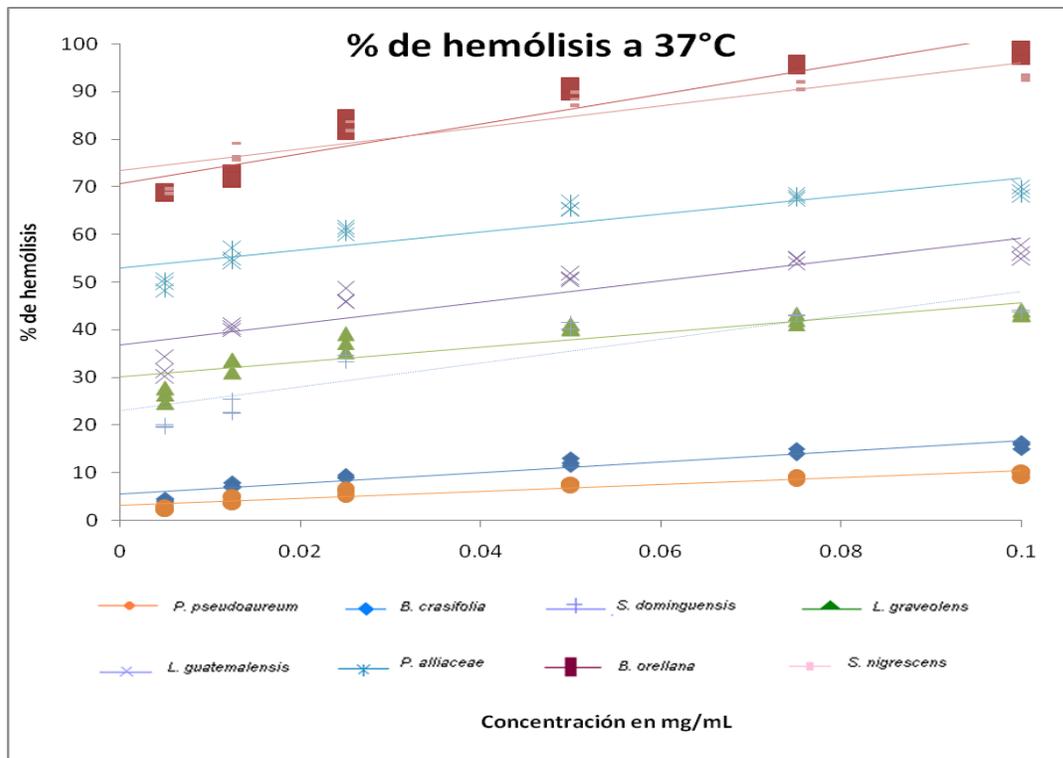
La reacción se realizó a 25 y 37°C y los resultados se muestran en la Gráfica 1 y 2. *B. orellana* y *S. nigrescens* fueron los extractos que más hemólisis produjeron, seguidos de *P. alliacea*, *L. graveolens* y *L. guatemalensis*.

En la Gráfica 1 se observa que en el aumenta la concentración aumenta el porcentaje de hemólisis, así mismo ocurre con la cuantificación de hemólisis a 37°C, por lo que hay una relación directa entre la concentración y el aumento de la temperatura.

Gráfica 1 Cuantificación de hemólisis en porcentaje a 25°C



Gráfica 2 Cuantificación de hemólisis a 37°C.



Según los diagramas de dispersión de hemólisis vs. concentración, presentaron a 25 y 37°C en todos los casos una tendencia lineal, por lo que se procedió a realizar los análisis de regresión para todos los extractos a ambas temperaturas y cálculo de la CH<sub>50</sub>. Las ecuaciones y la evaluación estadística de esta prueba se encuentran en anexo 3.

Cuadro 5 Determinación de CH<sub>50</sub> a 25 y 37°C

Planta	25°C		37°C	
	CH <sub>50</sub> (mg/ml)	IC 95% (mg/ml)	CH <sub>50</sub> (mg/ml)	IC95% (mg/ml)
<i>B. crassifolia</i>	0.568	0.476 – 0.699	0.395	0.336 – 0.476
<i>B. orellana</i>	0.026	0.015 – 0.041	< 0.005	-----*
<i>L. graveolens</i>	0.121	0.103 – 0.144	0.127	0.086 – 0.202
<i>L. guatemalensis</i>	0.101	0.085 – 0.121	0.059	0.035 – 0.098
<i>P. alliacea</i>	0.081	0.068 – 0.096	< 0.005	-----*
<i>P. pseudoaureum</i>	0.660	0.517 – 0.897	0.649	0.540 – 0.809
<i>S. domingensis</i>	0.522	0.390 – 0.765	0.108	0.075 – 0.163
<i>S. nigrescens</i>	< 0.005	-----*	< 0.005	-----*

Fuente: Datos Experimentales

\* El intervalo de confianza no se calculó, debido a que la concentración esta fuera del rango evaluado.

El Cuadro 5, presenta los valores de la CH<sub>50%</sub> a 25°C y a 37°C. Todas las plantas que presentan una CH<sub>50</sub> por arriba del rango de concentración evaluado (>0.100 mg/ml), pueden considerarse que no presentan una actividad hemolítica importante, o sea que requieren de altas concentraciones del extracto. Así mismo las que dieron <0.005 mg/dl, pueden considerarse que presentan una actividad hemolítica importante. Por lo que a 25°C solamente *B. orellana*, *P. alliacea* y *S. nigrescens* tienen importancia hemolítica; *L. graveolens* y *L. guatemalensis* están en el límite. A 37°C, solamente tienen importancia hemolítica *B. orellana*, *L. guatemalensis*, *P. alliacea* y *S. nigrescens*. *L. graveolens* y *S. domingensis* están en el límite.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se analizaron ocho extractos de los cuales se demostró el efecto hemolítico *in vitro* y su relación con el contenido de las saponinas esteroidales.

Con base en los resultados obtenidos en la prueba de espuma, dos de los extractos de las ocho especies analizadas presentaron actividad positiva, aunque no mayor al estándar; estas fueron *S. nigrescens* y *B. crassifolia*. Esta prueba presuntiva, indica que poseen saponinas. Los otros seis extractos presentaron escasa formación de espuma, lo cual puede deberse a que según la revisión bibliográfica poseen otros compuestos como los taninos los cuales pueden interferir con la prueba. Esta es una prueba preliminar, poco sensible y no es concluyente para la determinación de saponinas.

En el análisis de cromatografía en capa fina realizado para la identificación de saponinas esteroidales, se utilizaron como referencias los estándares de ergosterol,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y diosgenina. Según la literatura, la presencia de saponinas se distingue por una coloración azul – violeta y amarilla bajo la luz ultra violeta a 365nm. Los estándares presentaron un Rf de 0.97 con banda de coloración amarilla y *L. graveolens* (Rf 0.955), *L. guatemalensis* (Rf 0.941), *P. alliaceae* (Rf 0.970) *P. pseudoaureum* (Rf 0.970) y *S. domingensis* (Rf 0.955) presentaron una banda de color amarilla con Rf muy apegado al de los estándares, lo que indica que las plantas de estudio contienen saponinas esteroidales.

Según el Cuadro 2 todas las plantas de estudio además de la banda amarilla, presentaron otras coloraciones, llegando hasta cinco el total de bandas, que puede deberse a la presencia de otros compuestos o saponinas no esteroidales.

En la cuantificación de saponinas determinada por espectrofotometría, se estableció que todas las plantas contienen saponinas, ya que todas se encuentran por encima de 0.1% considerado como mínimo para que una planta pueda ser utilizada como materia prima para la síntesis de hormonas sexuales, cortisona, esteroides, diuréticos, vitamina D y heterósidos cardíacos (Lurssen, 2001). Además es posible observar según el cuadro 3 que *B. crassifolia* tiene

una concentración de  $1.78 \pm 0.222\%$ , *L. guatemalensis* de  $3.19 \pm 0.10\%$ , *P. pseudoaureum* de  $1.06 \pm 0.05\%$  y *S. nigrescens* de  $1.42 \pm 0.007\%$  contienen un porcentaje alto de saponinas.

En la prueba cualitativa de hemólisis en agar ninguno de los extractos estudiados presentaron hemólisis, probablemente debido a que se utilizó una concentración baja de los extractos, los cuales fueron comparados con un estándar de saponinas, el cual mostró un halo de hemólisis de 4mm de diámetro.

Por el método cualitativo en tubo que se realizó utilizando diferentes concentraciones de los extractos por medio de diluciones, como lo muestra el Cuadro 4, es posible observar que seis de las ocho plantas del estudio presentan un efecto hemolítico, las cuales son *B. orellana*, *B. crassifolia*, *P. alliacea*, *P. pseudoaureum*, *S. domingensis* y *S. nigrescens*. Sin embargo en los extractos de *P. pseudoaureum*, *B. crassifolia* y *S. nigrescens* hubo efecto hemolítico solo en las concentraciones más elevadas (5 y 10mg/dl), *B. orellana* presentó efecto hemolítico en todas las concentraciones (1, 2, 5 y 10mg/dl) demostrando una relación dosis-efecto, ya que a menor concentración, menor cantidad de hemólisis. Con el extracto de *P. alliacea* sucede lo mismo que con *B. orellana*. Esta actividad se le puede atribuir a la cantidad de saponinas presentes en los extractos de nuestras plantas, sin embargo para poder avalar este ensayo fue necesario realizar una prueba cuantitativa, ya que la concentración utilizada en este procedimiento fue mayor que la descrita por la literatura.

Las plantas que demostraron tener mayor cantidad de saponinas como *L. guatemalensis* y *B. crassifolia* y *P. pseudoaureum* no demostraron mayor actividad hemolítica, ya que *B. crassifolia* y *P. pseudoaureum* presentaron un  $CH_{50}$  de 0.568 y 0.660mg/dl (a 25°C) respectivamente, esto quiere decir que necesitan de una cantidad elevada de extracto para hemolizar el 50% de los eritrocitos. Y *L. guatemalensis* se encuentra en el límite de la mayor concentración evaluada (0.1mg/ml). Esto puede deberse a la estructura de las saponinas y la relación con dicha actividad. Voutquenne y cols. (2002) demostraron en su estudio que existe una relación entre estructura y la actividad hemolítica de las saponinas; estas comparaciones se establecieron en base a los grupos funcionales de cada saponina y al número de las cadenas de azúcar unidas a la aglicona. Los resultados de Voutquenne concluyeron que las saponinas monodesmosídicas con una cadena simple éster en la posición 28 no son hemolíticas. Aunque en este estudio no se demostró la

presencia de la estructura química de las saponinas, teóricamente, están compuestas por un esqueleto esteroide. (Anexo 4)

Según los resultados obtenidos en la cuantificación de hemólisis los extractos que tuvieron un mayor porcentaje de actividad hemolítica son *S. nigrescens*, *P. alliacea* y *B. orellana* a 25°C y 37°C, lo anterior coincide con lo descrito en la prueba de hemólisis cualitativa en la cual hubo actividad hemolítica en las muestras de *B. orellana*, *P. alliacea* y *S. nigrescens*.

Según las gráficas 1 y 2 se puede observar que conforme aumenta la concentración del extracto aumenta el porcentaje de hemólisis, demostrando una relación directa dosis-efecto. Además la hemólisis aumenta a mayor temperatura, esto es porque la bicapa lipídica de las células se vuelve más fluida y permeable, por lo que tiende a romperse con mayor facilidad.

*L. graveolens* y *L. guatemalensis*, se encuentran en el límite de la máxima concentración evaluada, por lo que se necesita 0.100 mg/ml para producir el 50% de hemólisis.

*S. nigrescens* mantiene una actividad elevada ya que su  $CH_{50}$  es menor a la mínima concentración evaluada tanto a 25°C como a 37°C. Sin embargo al observar la relación dosis-efecto, *S. nigrescens* demuestra que es la única planta que correlaciona su alta concentración de saponinas y su alta capacidad de hemolizar, tanto cuantitativa como cualitativamente, puesto que contiene  $1.42 \pm 0.07\%$  de saponinas y su  $CH_{50}$  es  $<0.005 \text{ mg/dl}$  esto quiere decir que con muy poca concentración de extracto hemoliza el 50% de los eritrocitos.

## 10. CONCLUSIONES

10.1 Las ocho plantas de estudio contienen algún tipo de saponinas demostradas por cromatografía en capa fina.

10.2 *Lippia graveolens* presentó ocho bandas cromatográficas de saponinas, en baja concentración.

10.3 *Solanum nigrescens*, *Petiveria alliacea*, y *Bixa orellana* demostraron mayor porcentaje de actividad hemolítica.

10.4 Las plantas que presentan un  $CH_{50}$  con importante actividad hemolítica a 25°C fueron *Bixa orellana*, *Petiveria alliacea*, *Solanum nigrescens* y a 37°C *Bixa orellana*, *Litsea guatemalensis*, *Petiveria alliacea* y *Solanum nigrescens*.

10.5 Las plantas que presentaron mayor concentración de saponinas fueron *Litsea guatemalensis*, *Byrsonima crassifolia*, *Solanum nigrescens* y *Phlebodium pseudoaureum*.

10.6 La actividad hemolítica no depende de la concentración de las saponinas.

10.7 La diferencia entre la composición estructural de las saponinas, puede presentar un aumento en la actividad hemolítica de las plantas en estudio.

## **11. RECOMENDACIONES**

11.1 Dentro de las propiedades de las saponinas se encuentran las de adjuvante, la cual no está ligada a un proceso hemolítico, por lo que es importante poder incluirlo en estudios posteriores para el tratamiento de la respuesta inmune o su utilización en procesos de inmunización.

11.2 En este estudio se demostró que las plantas utilizadas contienen alta concentración de saponinas y no presentan actividad hemolítica, sin embargo en altas dosis se debe tener precaución al medicarse.

11.3 Realizar estudios que permitan ampliar el conocimiento de la interacción entre la concentración de saponinas y la actividad hemolítica, principalmente en las plantas que son de uso común y continuo.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arcila-Lozano, C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S. & González, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111.
- Asociación Biotas. (2001). "Plantas medicinales utilizadas por los Itzaes". San José, Petén. 118 p.
- Baccou, J. (1977). Spectrophotometer method for the determination of total steroidal sapogenin *Analyst*, 102, 458-465.
- Bauman, E., Stoya, G., Völkner, A., Richter, W., Lemke, C. & Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochemica*, 102, 21-35.
- Bernal, H., Correa, J. (1992). Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Tomo XII, Ministerio de educación y Ciencia. España. pp 383 – 422.
- Bonilla, C. & Zavaleta, A. (1997). Estudio bioquímico del veneno de la serpiente *Bothrops hyoprurus*. *Revista médica experimental*, 14(2), 18-32.
- Bruneton, J. (2001). Saponósidos. *In* Farmacognosia, Fotoquímica, Plantas Medicinales. (2ª. Ed.). Zaragoza, España. Editorial Acribia, S.A. pp 664-709.
- Cáceres A., (1991). Farmacopea Vegetal Guatemalteca. CONAPLAMED
- Cáceres, A. & Aragón, A. (1994). Vademécum Fitoterapéutico del Departamento de San Marcos, Fundación Salud Para Todos/Laboratorio Farmaya.
- Cáceres, A. (1996). Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala, Editorial Universitaria. pp 105- 107.
- Cáceres, A. (2006). Vademecun Nacional de Plantas Medicinales. MSPAS. USAC. 262p.
- Cáceres, A. (2006). Determinación fitoquímica y de actividad antifúngica de cultivares de *Solanum americanum* Miller y caracterización de preparaciones para la industria fitofarmacéutica. Universidad De San Carlos De Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Dirección General De Investigación (DIGI). Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB).
- Cáceres, A. (2009). Validación de la actividad biocida e inmunomoduladora del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Smilax domingensis* Willd. Cultivado en Guatemala. *Revista de Fitoterapia*, 9(S1), 45-48.
- Cáceres, A., Martínez J. (2001). Elementos para el manejo sostenible de zarzaparrilla (*Smilax* spp.) En Condiciones de Bosque. *Tikalía*, 19(3), 45-64.

- Chwalek, M., Lalun, N., Bobichon, H., Plé, K. & Voutquenne-Nazabadioko, L. (2006). Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, 1418-1427.
- Da Silva, M., Gulmerme, O. (1981). Titration of antiserum to south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> activity. *Toxicon*, 20, 563-569.
- De Freitas M., de Cássia, R., da Costa, J., da Souza, T., Costa, J., Firmino, C., & Penha-Silva, N. (2008). Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 22, 219-224.
- Dehghan, G., Sharififar, F., Khatib, M., Behravan, E. & Ahmadi, M. (2009). Study of aqueous extract of three medicinal plants on cell membrane-permeabilizing and their surface properties. *African Journal of Biotechnology*, 9(1), 110-116.
- DeLaveau, D., Lallouette, P. & Tessier, A. (1980). Drogues vegetales stimulant L'activite phagocytaire du système reticuloendotelial. *Planta Médica*, 40, 49-54.
- Espinosa, F.J. & Sarukhán, J. (1997). Manual de malezas del valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica, México, D. F. 50p.
- Estevez, A. (1976). Resultados de la actividad antitumoral y toxica del principio activo de la *P. alliacea* Linn. *Revista cubana de Biología Tropical*, 81-84.
- FAO. (1987). Cultivos Autóctonos Subexplotados de Mesoamérica. Santiago, FAO. 49p.
- Ferrer, J. (2007). Principales referencias etnomédicas sobre el anamú (*Petiveria alliacea* Linn) y principios activos encontrados en la planta. Un acercamiento al tema. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 38(1), 27-30.
- Forturbel, R. (2003). Problemática de la producción y comercialización de *Chenopodium quinoa* W. (Chenopodiaceae), debido a la presencia de saponinas. *Ciencia Abierta*, 21, 1-10.
- Gentry, J. & Standley, P. (1974). Flora de Guatemala, *Fieldiana: Botany* (24) 10
- Germeno, A. (1993). Tropical anti-Inflammatory activity and toxicity of *Petiveria alliacea*. *Fitoterapia*, 64(5), 459-462.
- Hassan, M. Haq, U.A., Byrd, J.A., Berhow, M.A., Cartwright, A.L. & Bailey, C.A. (2010). Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. *Food Chemistry*, 119, 600-605.

- He, X., Mocek U., Floss H.G., Cáceres A., Girón L., Buckley H., (1994). An antifungal compound from *Solanum nigrescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 43 (3), 173-177.
- Hernández, Y. 2006. Estudio de la actividad hemolítica de los posibles taninos extraídos a partir de la *Boldoa purpurascens* Cav. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 2(10), 1-5.
- Hernández, R. (1997). Obtención de crudos de saponinas hipocolesteromizantes del *Chenopodium quinoa* Willd. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". *Revista Cubana Médica Militar*, 26(1), 55-62.
- Hernández, R. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de Agave Lechuguilla Torrey. Universidad de Guadalajara México. Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Vol3 art. 11. 9 p.
- Huamán, O., Sandoval, M., Arnao, I. & Bejar, E. (2009). Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote), en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 70(2), 97-102.
- Linares, E., Flores, B. & Bye, R. (1998). Selección de Plantas Medicinales de México. México: Limusa. 125p.
- Karou, S., Tchacondo, T., Lassina Ouattara, L., Anani, K., Savadogo, A., Agbonon, A., Ben Attaia, M., de Souza, C., Sakly, M., Simporé, J. (2011). Antimicrobial, antiplasmodial, haemolytic and antioxidant activities of crude extracts from three selected Togolese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2011)808-813
- López, A.N., Rojas, N.M. & Jiménez, C.A. (1981). Potential antineoplastic activity of Cuban plants. IV. *Revista Cubana Farmacéutica*, 15, 71-77.
- López, M.T. (2001). Saponósidos. *Ámbito Farmacéutico, Fitoterapia. OFFARM*, 20(06), 124-128.
- Martínez, C., Bonilla, C. & Zavaleta, A. (1989). Acción hemolítica del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti* "macanche" sobre eritrocitos humanos. *Boletín de la Sociedad Química de Perú*, 56, 1-12.
- Martínez, M. (1998). Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* L. *Journal of Ethnopharmacology. Elsevier*.
- Medinilla, B. (1993). Manual de Laboratorio de Fitoquímica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. pp 8-9.
- Montes, A. (1993). Estudio de la actividad antibacteriana in vitro de seis plantas de la flora guatemalteca; *Psidium guajava* L. (guayaba), *B. orellana* L. (achiote), *Persea americana* Mul. (aguacate), *Tehobroma cacao* L. (guapinol) y *S. nigrescens* Mart & Gal (quilete). Guatemala.

- 83p. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Morón, F. (1990). TRAMIL V. Livingston Guatemala, Endo-Caribe/CONAPLAMED
- Morton, J.F. (1981). Atlas of medicinal plants of Middle América (Bahama to Yucatán). Springfield, Charles C. Thomas Publisher. USA.
- Navas, H. (2006). "La utilidad de las plantas medicinales en Costa Rica". Editorial Universidad Nacional EUNA. 123 p.
- Ocampo, R., Martínez, J., & Cáceres, A. (2007). Manual de agrotecnología de plantas medicinales nativas. Ediciones Sanabria. San José, Costa Rica. 144 p.
- OMS. (1998). Quality control methods for medicinal plant materials.
- OMS. (2004). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales.
- Pharmacopea Italica/Vegetalium Compositiones. (1991). Farmacopea Ufficiale de la República Italiana. Droghe vegetali e preparazioni. Ministero de la Sanita. Italia 333p.
- Ponce, M.M. (1996). *Pteridophyta*. In: Zuloaga F. O. y O. Morrone (eds.), Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina I: Pteridophyta, Gymnospermae y Angiospermae (Monocotyledoneae). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 60, 1-79.
- Rivero-Cruz JF., Sánchez-Nieto S., Benítez G., Casimiro X., Ibarra-Alvarado C., Rojas-Molina A., Rivero-Cruz B., (2009). Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia* *Revista Latinoamericana Química*, 37(2), 155-163.
- Robineau, L. (1989). Hacia una farmacopea Caribeña. Santo Domingo. Endo-Caribe y UNA Honduras. pp 278 – 282.
- Robineau L. (2005). Farmacopea Vegetal Caribeña. 2ª edición. Editorial Universitaria UNAN-León. México. 486p.
- Salazar, A. (2009). Actividad inhibitoria de seis plantas de uso medicinal contra *Gardnerella vaginalis* y especies de *Candida*. Guatemala. 48 p. Tesis Licenciada en Química Bióloga. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Santa Cruz, L.H. (1987). Manual de Selección Fitoquímica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. pp. 43-51.
- Shilpi, J., Ur-Rahman, T., Uddin, S., Alam, S., Sadhu, S.& Seidel, V. (2006). Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 264-271.

- Sparg, S.G., Light, M.E. & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plants saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219-243.
- Stolze, R.G. (1981). Ferns and fern allies of Guatemala. *Fieldiana: Botany New Series*, 6, 374-377.
- Sun, H.X., (2006) Haemolytic activities and adjuvant effect of *Bupleurum chinese* saponins on the immune responses to ovoalbumin in mice. *Elsevier*, 24, 1324-1331
- Vásquez, E. (1997). Estudio farmacológico de la actividad analgésica de infusiones de hojas de *Solanum nigrescens* Mart & Gal (macuy). Guatemala. 84p. Tesis Licenciado en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., Le Men-Oliovier, L. (2002). Structure-Activity Relationships of Hemolytic Saponin. *Pharmaceutical Biology*, 40, 137-146.
- Wang, Y., Zhang, Y., Zhu, Z., Li, Y., Li, M. & Yu, B. (2007). Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and Cytotoxicity of Steroid Saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 2528-2532.
- Yuan, Q. (2009). Acute toxicity and sub-chronic toxicity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 126, 543-550.
- Zavala, J., Loarca, G. & García, T. (2001). Evaluación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad citotóxica sobre células CaCo-2 del extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens* Kunth). 2° Congreso Nacional de Química Médica. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. pp. 1-5.

### 13. ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de hemólisis por espectrofotometría, a 25°C

% Hemólisis a 25°C								
Concentración	B.	B.	L.	L.	P.	P.	S.	S.
en mg/ml	crassifolia	orellana	graveolens	guatemalensis	alliaceae	pseudoaureum	dominguensis	nigrescens
	%	%	%	%	%	%	%	%
<b>0.005</b>	1.78	31.88	9.34	13.02	23.15	1.52	5.09	41.39
	1.73	33.45	9.25	12.87	29.65	2.06	5.35	40.97
	1.75	32.15	9.17	12.99	20.98	1.33	4.89	41.44
<b>0.0125</b>	4.01	44.28	15.62	19.57	21.66	3.71	8.79	60.02
	4.27	43.98	16.66	20.06	27.96	4.56	7.98	60.33
	3.98	44.01	14.22	20.78	23.44	2.22	9.01	60.98
<b>0.025</b>	5.79	53.22	20.95	27.65	32.75	5.29	11.35	73.22
	6.66	53.01	21.33	27.77	32.89	6.78	10.78	74.01
	5.98	55.22	22.22	26.55	31.45	6.01	12.04	73.02
<b>0.05</b>	7.98	67.01	27.75	35.23	39.68	7.99	12.96	78.03
	7.36	68.77	26.55	34.56	39.21	7.15	11.99	78.05
	6.15	68.98	26.22	35.03	38.1	6.82	12.78	78.66
<b>0.075</b>	8.23	75.33	38.25	40.16	48.25	8.52	13.28	89.12
	9.22	70.01	39.01	39.09	48.03	7.98	13.01	88.01
	9.01	72.55	33.22	40.66	49.03	8.66	13.98	88.98
<b>0.1</b>	11.3	80.44	42.77	48.75	56.93	9.02	14.23	90.19
	10.98	85.44	40.22	49.56	56.01	8.96	14.98	90.33
	10.01	83.55	40.56	47.55	55.66	9.16	13.98	91.08

Fuente: Datos Experimentales

Anexo 2. Cuantificación de hemólisis por espectrofotometría a 37°C

% Hemólisis a 37 °C								
Concentración	B.	B.	L.	L.	P.	P.	S.	S.
en mg/ml	crassifolia	orellana	graveolens	guatemalensis	alliaceae	pseudoaureum	domingensis	nigrescens
	%	%	%	%	%	%	%	%
<b>0.005</b>	4.29	68.25	26.45	30.08	49.83	2.09	19.41	68.78
	4.56	69.01	27.68	31.23	48.25	2.15	19.69	69.45
	3.98	68.56	24.69	34.21	50.67	2.98	20.13	68.48
<b>0.0125</b>	7.85	73.26	31.01	39.99	54.09	3.61	22.39	75.58
	7.07	71.25	33.64	41.23	54.96	3.98	25.46	76.45
	6.98	71.69	33.52	40.28	57.03	4.87	22.69	79.15
<b>0.025</b>	8.95	81.28	35.31	45.93	60.05	6.1	33.27	81.67
	9.39	84.65	37.22	48.52	61.33	6.78	34.01	83.73
	8.78	82.66	39.15	45.87	60.78	5.12	34.69	81.76
<b>0.05</b>	13.01	90.04	40.25	50.84	65.41	7.71	40.21	89.69
	12.01	89.63	41.23	51.69	65.13	7.45	40.2	88.45
	11.45	91.26	40.08	50.29	66.72	7.09	41.56	86.91
<b>0.075</b>	13.92	96.15	42.13	54.01	68.25	8.97	42.89	91.93
	13.98	95.16	41.23	54.98	67.23	8.45	43.01	90.26
	14.98	96.32	43.29	54.93	67.98	9.01	42.98	91.98
<b>0.1</b>	15.03	98.11	44.1	55.91	69.17	9.13	43.68	92.39
	15.84	97.1	43.25	55.01	68.15	9.98	44.08	93.25
	16.24	99.01	43.09	57.65	69.78	10.26	43.75	92.89

Fuente: Datos experimentales

### Anexo 3. Curvas de Calibración

#### CURVAS DE CALIBRACIÓN

#### CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS

ESTANDARES A USAR : DIOSGENINA, STIGMASTEROL Y ERGOSTEROL

Y = absorbancia

X = concentración

Estándar	Ecuación lineal	Coefficiente de determinación ( $r^2$ )
Diosgenina	$y = 0.228x - 0.044$	0.981
Stigmasterol	$y = 0.055x - 0.061$	0.973
Ergosterol	$y = 0.095x + 0.031$	0.993

Fuente: Datos Experimentales

Ecuaciones y evaluación de las regresiones a 25°C

y = % de hemólisis

x = Concentración (mg/ml)

Planta	Ecuación lineal	Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	Significancia estadística (p)
<i>B. crassifolia</i>	$y = 2.75 + 83.18x$	0.9029	< 0.00001
<i>B. orellana</i>	$y = 37.23 + 489.88x$	0.9251	< 0.00001
<i>L. graveolens</i>	$y = 10.78 + 323.07x$	0.9557	< 0.00001
<i>L. guatemalensis</i>	$y = 15.35 + 343.35x$	0.9553	< 0.00001
<i>P. alliaceae</i>	$y = 22.15 + 344.08x$	0.9652	< 0.00001
<i>P. pseudoaureum</i>	$y = 2.80 + 71.53x$	0.8190	< 0.00001
<i>S. domingensis</i>	$y = 7.27 + 81.82x$	0.7625	< 0.00001
<i>S. nigrescens</i>	$y = 52.19 + 446.60x$	0.8019	< 0.00001

Fuente: Datos Experimentales

En todos los casos la regresión lineal fue significativa

Ecuaciones y evaluación de las regresiones a 37°C

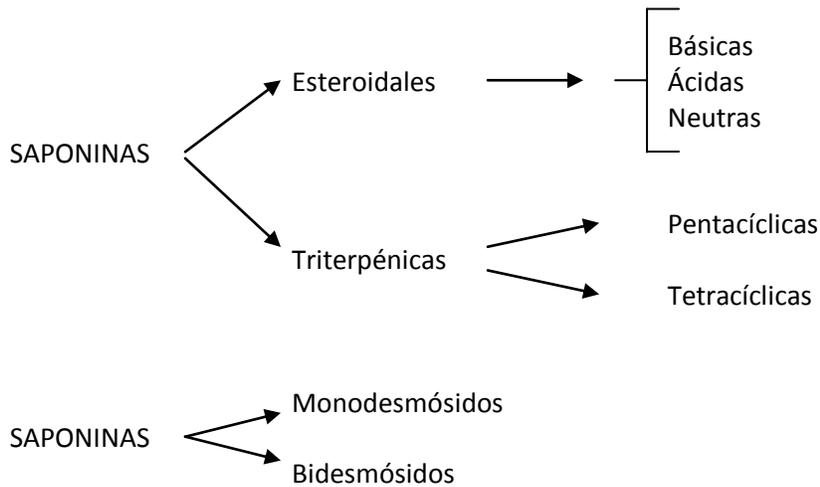
Planta	Ecuación lineal	Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	Significancia estadística (p)
<i>B. crassifolia</i>	$y = 5.43 + 112.82x$	0.9241	< 0.00001
<i>B. orellana</i>	$y = 70.70 + 312.59x$	0.8991	< 0.00001
<i>L. graveolens</i>	$y = 30.11 + 156.20x$	0.7714	< 0.00001
<i>L. guatemalensis</i>	$y = 36.78 + 224.99x$	0.8117	< 0.00001
<i>P. alliaceae</i>	$y = 53.00 + 187.96x$	0.8279	< 0.00001
<i>P. pseudoaureum</i>	$y = 3.22 + 71.04x$	0.8921	< 0.00001
<i>S. domingensis</i>	$y = 22.95 + 250.48x$	0.8180	< 0.00001
<i>S. nigrescens</i>	$y = 73.37 + 227.01x$	0.8312	< 0.00001

Fuente: Datos Experimentales

En todos los casos la regresión lineal fue significativa

#### Anexo 4. Estructuras químicas de saponinas

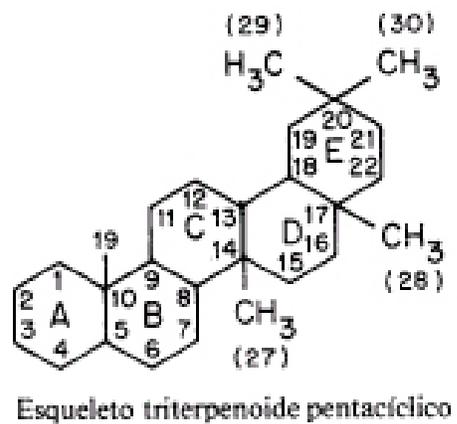
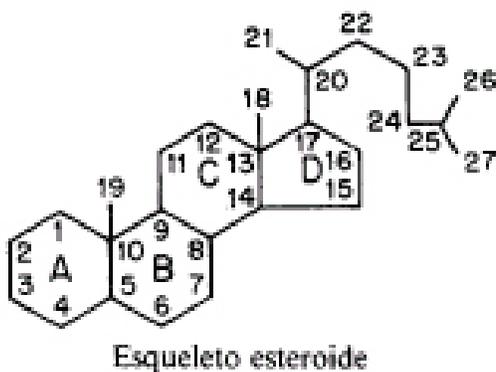
Las saponinas son compuestos naturales caracterizados desde el punto de vista estructural por presentar enlaces glucósidos y/o éster entre una genina poco polar y restos glucídicos.



#### AZUCARES MÁS COMUNES

- D-glucosa
- D-galactosa
- L-ramnosa
- L-arabinosa
- D-xilosa
- D-fucosa
- ác. galacturónico
- ác. glucurónico

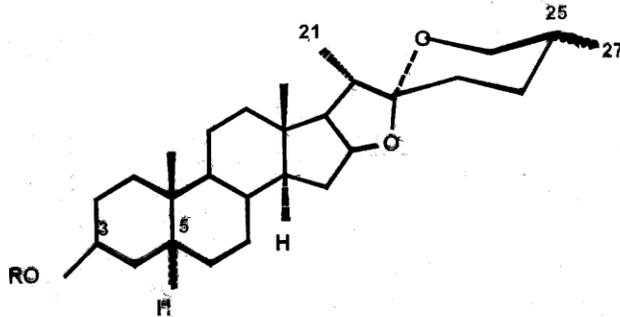
#### Estructura química general de las saponinas



## Anexo 5. Saponinas Esteroidales Neutras

Son derivados del SPIROSTANO o sus modificaciones.

### ESTRUCTURA QUÍMICA



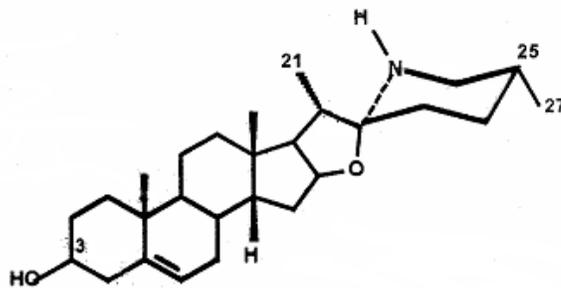
### SAPONINAS ESTEROIDALES BÁSICAS

Pertenece al grupo de los alcaloides esteroidales característicos del género *Solanum*.

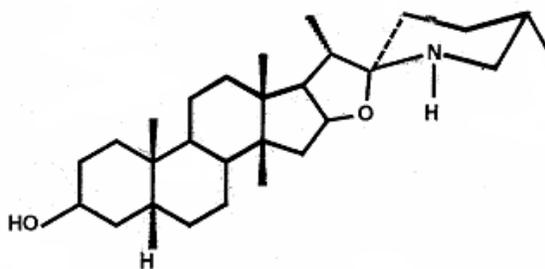
Presentan N en el anillo F.

Derivados del SPIROSOLANO (N secundario).

Según el oligosacárido unido por el enlace glicosídico a la aglicona se encuentran diferentes glicósidos.

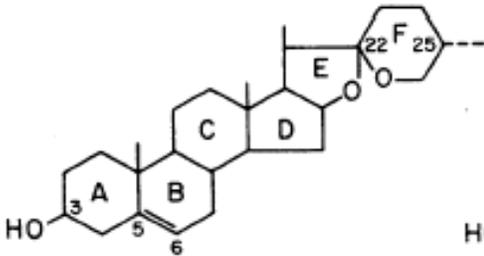


**SOLASODINA.**

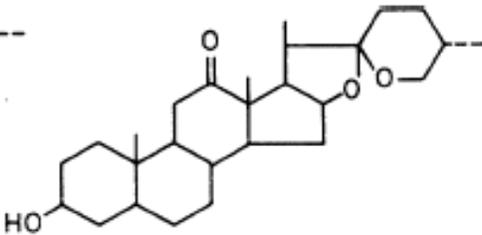


**TOMATIDINA.**

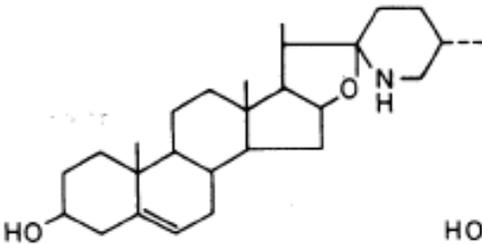
Algunos esteroides naturales



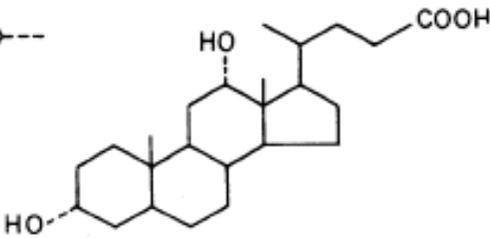
Diosgenina ( $\Delta^5$ 25 $\alpha$ -espirosten-3 $\beta$ -ol)  
(varias spp. de *Dioscorea*, Alholva)



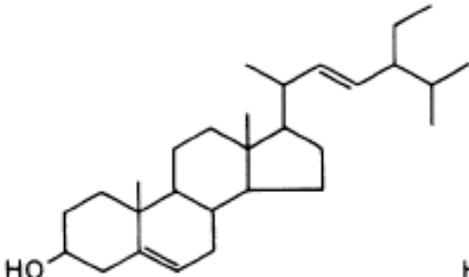
Hecogenina (*Sisal* spp.)



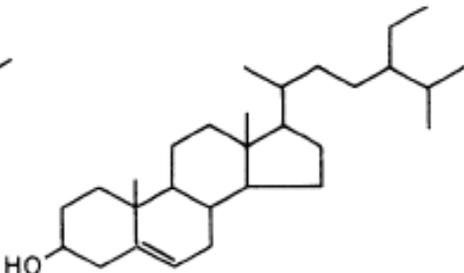
Solasodina (*Solanum* spp.)



Acido desoxicólico (bilis de buey)



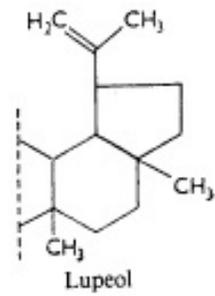
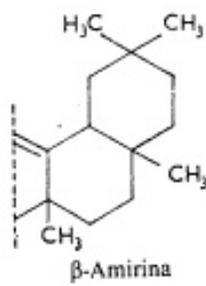
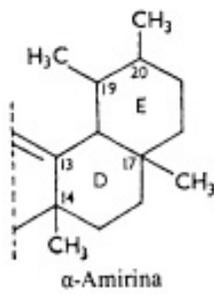
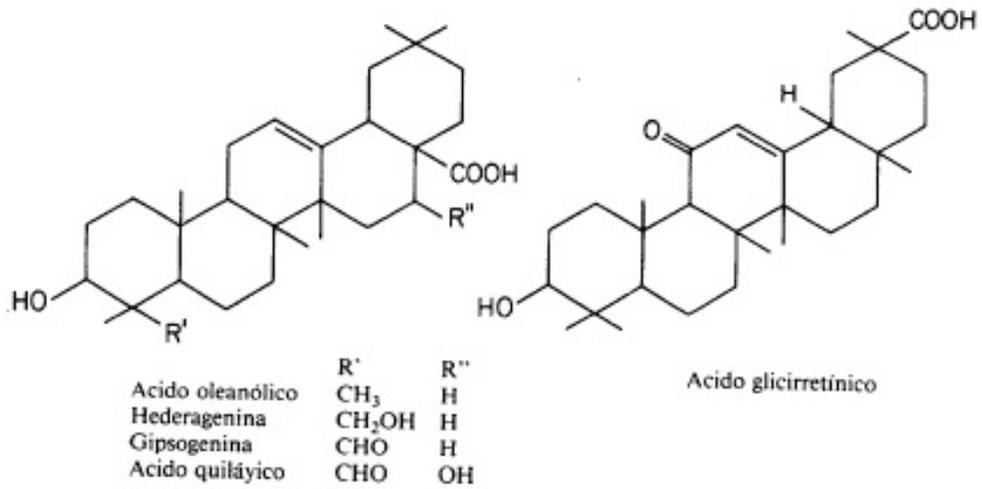
Estigmasterol (soja)



Sitosterol (soja)

Fuente: Biblioteca digital de Chile

Algunos ácidos triterpenoides de saponinas



Anexo 6. Fotos de plantas utilizadas en el estudio

*Bixa orellana* (Achiote)



Fuente: Montoso Gardens, © 1995-2003 Missouri Botanical Garden

*Byrsonima crassifolia* (Nance)



Fuente: The New York Botanical Garden, ethnobotany and floristics of belize

*Lippia graveolens* (Orégano)



Fuente: Mountain Valley Growers USDA organic herbs and perennials

*Litsea guatemalensis* (Laurel)



Fuente: Mountain Valley Growers USDA organic herbs and perennials

*Petiveria alliacea* (Apacín)



Fuente The New York Botanical Garden, ethnobotany and floristics of belize

*Phlebodium pseudoaureum* (Calahuala)



Fuente The New York Botanical Garden, ethnobotany and floristics of belize

*Smilax domingensis* (Zarzaparrilla)



Fuente: Inflorescences of *Smilax domingensis* © Alwin Gentry. Missouri Botanical Garden.

*Solanum nigrescens* (Quilete)



Fuente: Pedro Tenorio Lezama 2000