

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

FILIFERINAS C Y D, NUEVAS SAPONINAS DE SEMILLA DE YUCCA FILIFERA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
LUZ MARIA DOLORES ALBA GONZALEZ
MEXICO, D. F. 1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	pág.
I. ANTECEDENTES	1
II. GENERALIDADES	6
III. PARTE TEORICA	18
Semilla tierna: hidrólisis total, separación de saponinas.	
Semilla semi-tierna, hidrólisis - total de filiferinas C y D, cromatografía en papel, separación de filiferinas C y D, hidrólisis parciales y RMN ¹³ C.	
IV. CONCLUSIONES	48
V. PARTE EXPERIMENTAL	50
VI. ESPECTROS	61
VII. BIBLIOGRAFIA	69

I. ANTECEDENTES

I. ANTECEDENTES

Las plantas del género Yucca se encuentran distribuidas geográficamente desde el Norte de los Estados Unidos hasta Centro América. En México, estas forman densas agrupaciones denominadas "Izotales".

Inicialmente la Yucca fue estudiada desde el punto de vista botánico para su ordenación y clasificación -- dentro de la familia Liliaceae. A través del tiempo, y según los criterios de diferentes especialistas la clasificación -- del género Yucca, y otras plantas afines, han sufrido numerosas modificaciones. Con fines prácticos y de acuerdo con el actual conocimiento, Hutchison estableció una nueva clasificación, la cual fue apoyada por otros investigadores¹, por lo que se estableció el nuevo orden de las Agavales y la nueva familia Agavaceae en la que se incluyó géneros anteriormente considerados en la familia de las Liliaceas². El autor citado anteriormente divide a la nueva familia Agavaceae en diferentes tribus, una de las cuales es la denominada Yuceae.

Al revisar la literatura química sobre el género Yucca se encontró que los compuestos más característicos -- de estas, son saponinas con esqueleto esteroidal. Las saponinas son glicósidos que producen por hidrólisis dos tipos de -- compuestos, una fracción de carbohidratos y una fracción este

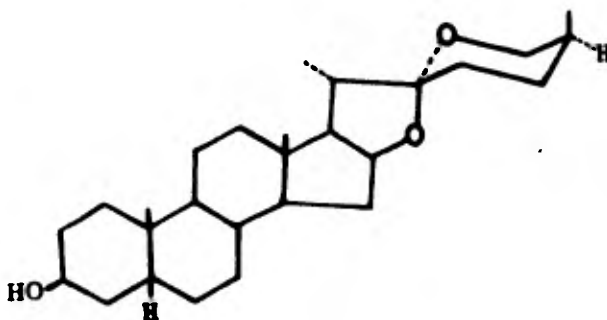
roidal llamada aglicona o sapogenina.

El estudio de saponinas y sapogeninas que se encuentran en diferentes plantas, entre ellas los Agaves y las Yuccas, fué iniciado por Russell E. Marker³, descubriendo así una nueva fuente vegetal que proporciona materia prima para la elaboración de esteroides.

En un período de 1942 a 1961 se encontraron las siguientes sapogeninas cuyas estructuras fueron establecidas por métodos convencionales de degradación^{4,5}.

La sarsasapogenina se ha encontrado en las siguientes especies de Yuccas :

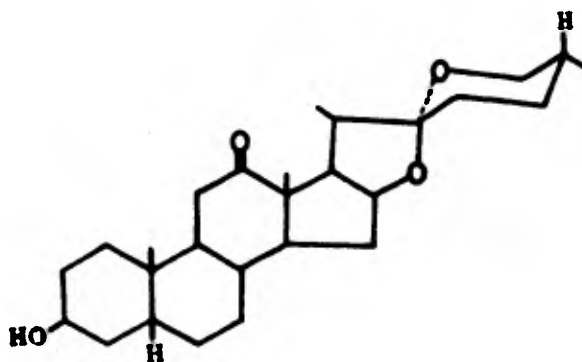
Yucca baccata, Y. elata, Y. schottii, Y. filífera y Y. carnerosana.



SARSASAPOGENINA

La hecogenina fué aislada de las siguientes especies:

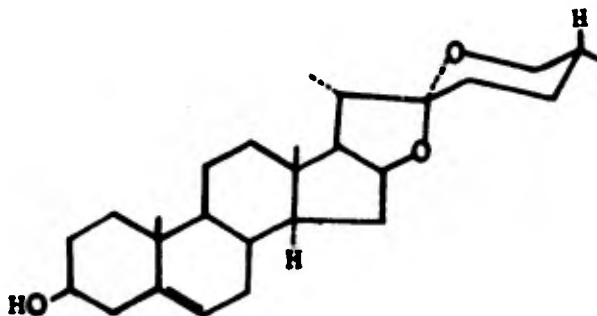
Y. brevifolia, Agave endlichiana, A. schottii y A. lecheguilla.



HECOGENINA

La tigogenina fué encontrada en las siguientes especies:

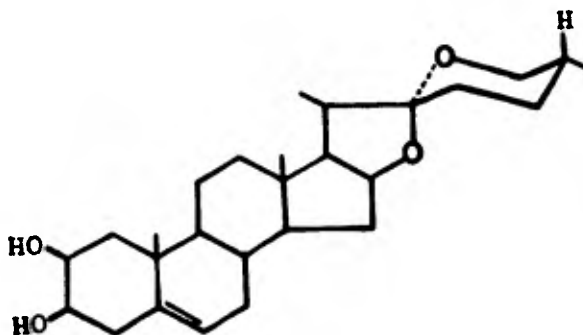
Y. brevifolia, Y. peninsularis y Y. whipplei.



TIGOGENINA

La yuccagenina fué descubierta en las siguientes especies:

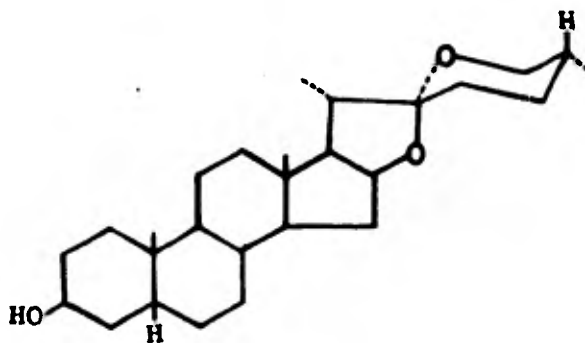
Y. schotti, Y. elata y Y. flaccida.



YUCCAGENINA

La esmilagenina que fué aislada de las siguientes especies:

Y. schotti y Y. flaccida.



ESMILAGENINA

Estudios realizados en Yucca filifera provenientes de la zona norte de México, determinaron el rendimiento

to de celulosa obtenida a partir de la pulpa, dicho rendimiento fue relativamente alto en un 35-45%. Los frutos y las flores se utilizaban como alimento; las hojas con fines decorativos. Pero además de esto, su estudio es interesante desde el punto de vista biológico pues a pesar de que la planta podría reproducirse vegetativamente, necesita reproducirse por medio de semillas, ya que el primer tipo de reproducción es muy lenta y se tendería a desaparecer la planta. Para que la reproducción por semillas se lleve a cabo es indispensable, en el caso particular de las Yuccas, la intervención de un insecto polinizador del género Tegeticula⁶.

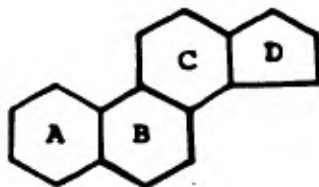
Por todos los aspectos anteriores se consideró de interés el estudio de la composición química de la Yucca filífera que es el objetivo del presente trabajo.

Estudios realizados en 1972, revelaron la existencia de un alto contenido de sarsasapogenina, en semillas de Yucca filífera, así mismo fué encontrada en hojas, tallos, flores, pedúnculos pero en menor proporción que en las semillas⁷.

II. GENERALIDADES

II. GENERALIDADES

El nombre "sterol" (gr. stereos=sólido), fue originalmente dado a los alcoholes cristalinos obtenidos de una porción no saponificable de extractos de lípidos. El nombre general ESTEROIDE fue introducido en 1936 para ser aplicado a todos los compuestos que tienen un esqueleto básico, con 17 átomos de carbono que consiste de 4 anillos fusionados arreglados en forma de ciclopentanoperhidrofenantreno ^{8,9,10}.



Esqueleto Esteroidal

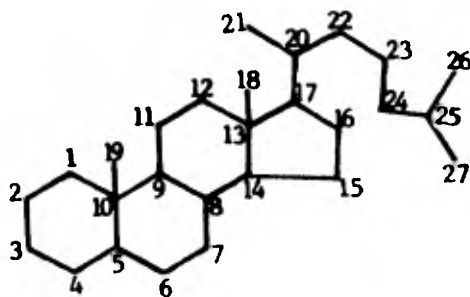
Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y animal, por lo que son una clase muy importante de los productos naturales, ya que estos incluyen compuestos de vital importancia para la vida, tales como son los esteroides, ácidos biliares, hormonas sexuales, hormonas adrenocorticales, glicósidos cardiotónicos, saponinas, vitamina D y hormonas de crecimiento en insectos ^{8,10,11}. Los esteroides han sido estudiados tanto por su importancia química, como por su importancia farmacológica. En especial las hormo--

nas sexuales que fueron investigadas con gran empeño debido a que hay una fuerte demanda de estas hormonas, por lo que se buscaron fuentes vegetales que proporcionarían mayores rendimientos de materia prima; debido a esto, gran número de esteroides han sido preparados en el laboratorio, en adición a aquellos que se encuentran en forma natural.

La elucidación de la estructura básica de los esteroides fue basada en numerosas investigaciones que culminaron en los estudios brillantes de Windaus y Wieland en la investigación del colesterol y ác. biliares respectivamente, proponiendo así la estructura correcta del esqueleto esterooidal, sin establecer totalmente y en definitiva su configuración.

En 1950 se establece una nomenclatura oficial, la cual fué aprobada por la INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Los nombres de los esteroides, así como de otros compuestos orgánicos se basan en la estructura fundamental usualmente hidrocarbonada, a la que se agregan prefijos y sufijos indicando la naturaleza de los sustituyentes, la posición de estos se indica por el átomo de carbono en el cual están unidos ^{8, 10}.

Numeración del esqueleto Esteroidal

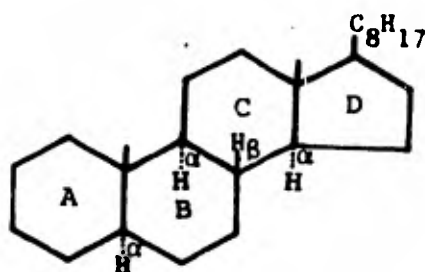


En 1952 la configuración nuclear se establece, en un sistema tetracíclico, la unión de sus anillos pueden ser cis o trans, este sistema posee 6 centros quirales, cuyas posiciones corresponden a los átomos de carbono 5, 8, 9, 10, 13 y 14. Cuando hay una cadena lateral y está se encontrará en la posición C-17 habrá un centro quiral más. Si posee dobles ligaduras es común encontrarlas en la posición C-5. Finalmente es frecuente encontrar un grupo hidroxilo con orientación β en la posición C-3 de la molécula ^{11,12}.

La unión de los anillos A/B puede ser cis o --- trans dando origen a dos series de los esteroides: cuando la unión del anillo es A/B es trans pertenece a la serie allo -- (estanoles) y el átomo de hidrógeno en la posición C-5 está orientado. Y cuando la fusión de los anillos A/B es cis (ác. biliares) pertenece a la serie normal y su átomo de hidrógeno

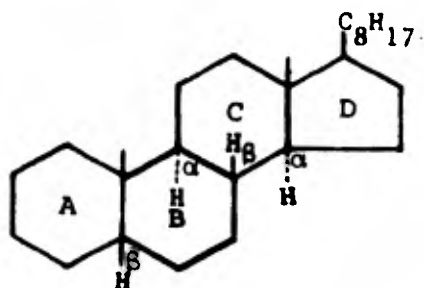
en la posición C-5 está β orientado. Los anillos B/C son -- trans en todos los esteroides que se encuentran en la naturaleza. La fusión de los anillos C/D y es común en todos los es teroides naturales, a excepción de las agliconas cardiotónicas. Los metilos en C-10, C-13 y C-17 tiene orientación β , al igual que el átomo de hidrógeno en C-8.

Toda la relación anterior se encuentra representada en las siguientes estructuras:



Colestano

Serie a ALLO A/B trans B/C trans C/D trans



Coprostando

Serie b NORMAL A/B cis B/C trans C/D trans

La configuración absoluta de la molécula esteroïdal fue realizada mediante asignamientos arbitrarios hechos de datos químicos y datos obtenidos de rayos X en años recientes.

A los esteroides se les encuentran en insectos y animales superiores por lo que se emprendió su búsqueda en todo tipo de vegetales.

Hay una cantidad abundante de glucosa y fructosa, estas son encontradas en estado libre; estos azúcares y otros menos comunes se encuentran en plantas de origen vegetal como son los glicósidos.

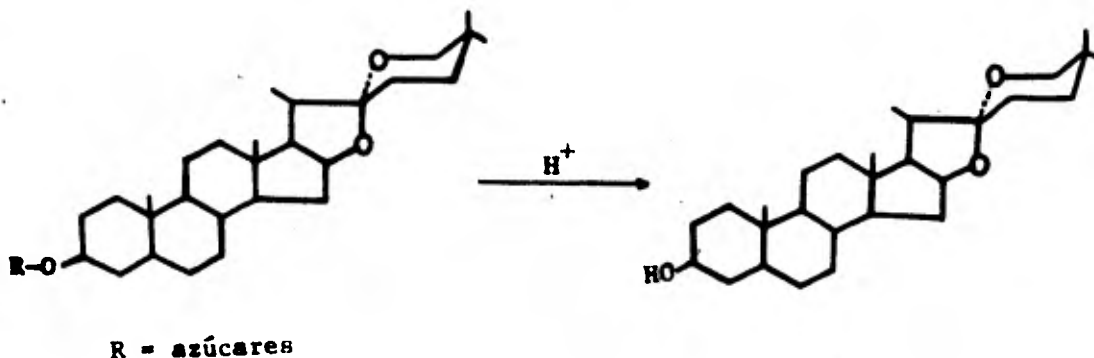
Se da el nombre de saponinas (del latín sapón=jabón) a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y -- que disminuyen la tensión superficial de ésta; por lo tanto al sacudir sus soluciones se forma una espuma abundante y relativamente estable (por tener esta propiedad se utiliza como jabón). Algunas saponinas son estimulantes cardiacos, por lo que han sido clasificadas separadamente debido a su acción fisiológica ¹³.

Se han encontrado diversos usos para las saponinas como son detergentes, medicinales (especies de Smilax), agentes espumosos de extinguidores de fuego, veneno para peces¹⁴, algunas saponinas como las filiferinas A y B tienen propiedades moluscicidas,¹⁵ con respecto a los seres humanos no son tó-

xicas debido a que cuando se toman oralmente, probablemente - no se absorben en el intestino.

Las saponinas son sustancias muy polares, por lo que son solubles en agua y metanol, estas no son fáciles - de aislar en estado puro, por eso es que han sido relativamente poco estudiadas.

Como las saponinas son glicosidos, al hidrólizarlas mediante el uso de ácidos minerales o de enzimas se obtienen carbohidratos y una aglicona llamada genéricamente sapogenina ¹⁶.



Como algunas de las sapogeninas encontradas en ciertas especies, son de naturaleza esteroidal, su biogénesis se lleva a cabo a través del mecanismo establecido para la -- formación de los esteroides, que empieza con la Acetil-S-CoA, acetoacetil-S-CoA, hidroximetilglutarato, ác. mevalónico, pirofosfato de isopentilo, pirofosfato de γ dimetil alilo, pirofosfato de geranilo, pirofosfato de farnesilo, escualeno, la-

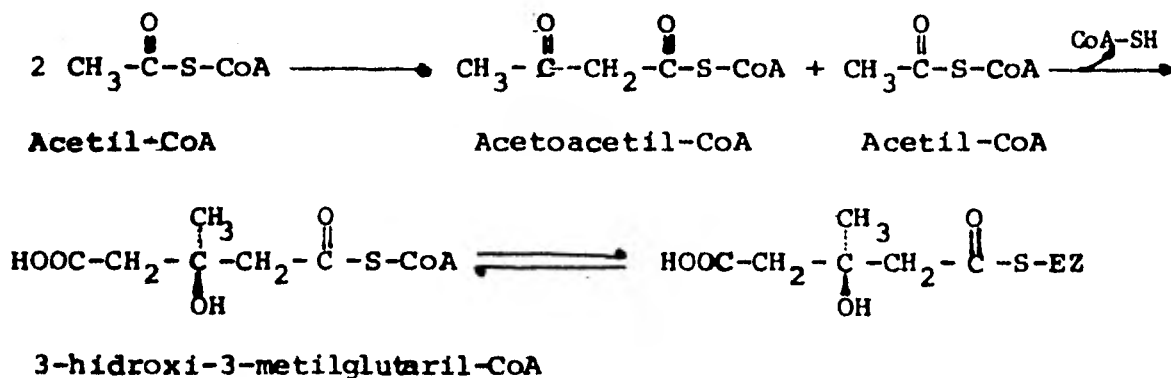
nosterol y Colesterol.

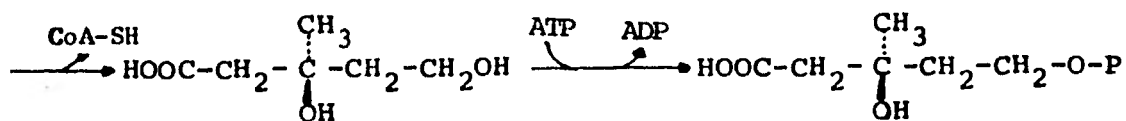
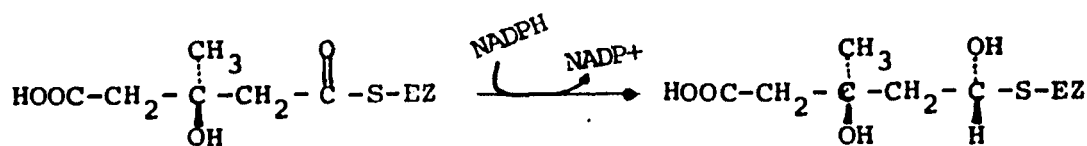
Se encontró que el ácido mevalónico es convertido a escualeno en un gran número de plantas como el frijol, tomate y la Digitalis purpúrea ^{17, 18}.

El colesterol se encontró en la Digitalis purpúrea; Bennett et al. llevaron a cabo experimentos biosintéticos con el ác. mevalónico marcado con C¹⁴ en la posición C-2, este fué utilizado como sustrato y fué metabolizado rápidamente para la formación del colesterol ¹⁹.

Posteriormente se demostró que el colesterol es un precursor para la formación de esteroides de 27 átomos de carbono y esto fue comprobado con un experimento biosintético en donde se demostró la conversión del colesterol marcado a Tigogenina, Diosgenina y Gitogenina ²⁰.

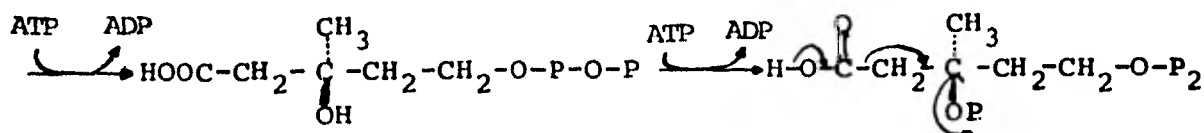
En el esquema I se demuestra la biogénesis de los esteroides, la cual parte de Acetil-S-CoA ^{17, 21}.



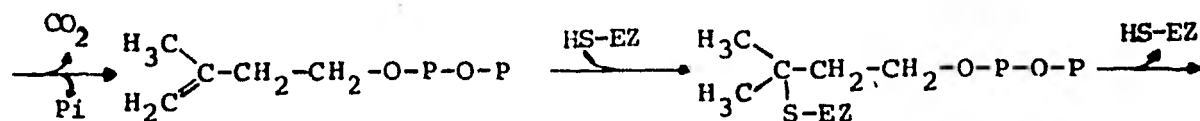
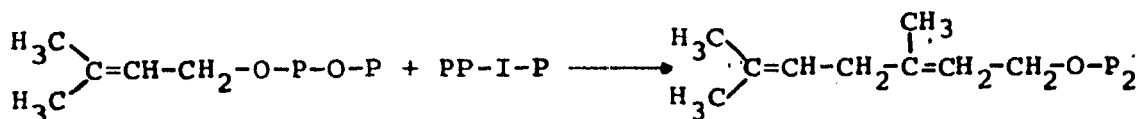


Ac. Mevalónico

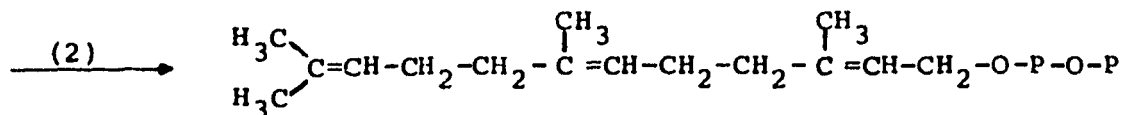
Fosfato del Ac. Mevalónico



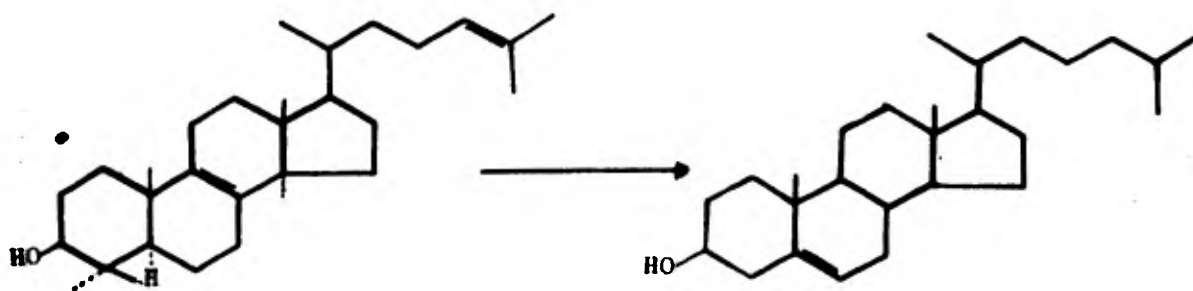
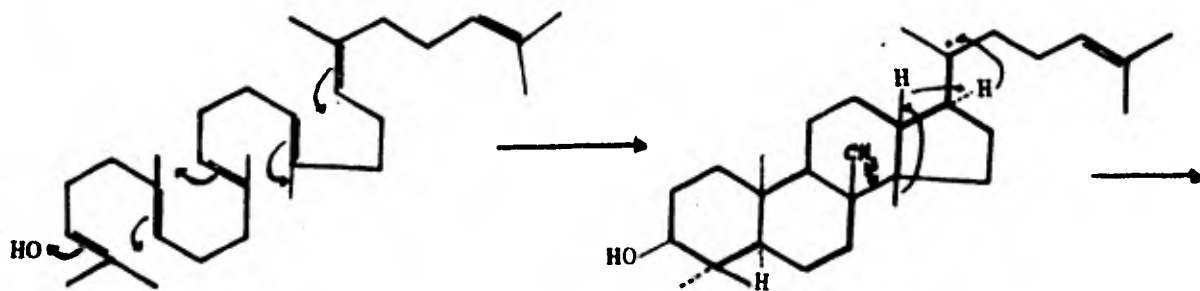
Pirofosfato del Ac. Mevalónico

Pirofosfato de Isopentilo
PP-I-PPirofosfato de $\gamma\gamma$ Dimetil
alilo

Pirofosfato de Geranilo



Pirofosfato de Farnesilo



Las estructuras de las saponinas esteroidales - fueron inicialmente elucidadas por medio de degradación de las mismas.

Tanaka y colaboradores demostraron que la espectroscopía de RMN¹³C, es un instrumento o herramienta potencial para la elucidación de estructuras glicosídicas que son inestables a hidrólisis ácidas; a condición de que los datos de ¹³C en sus agliconas y los azúcares sean diferentes ^{22, 23, 24}.

Eggert y C. Djerassi reportaron el estudio de - diferentes sapogeninas, que incluyen variaciones con respecto a sus configuraciones en C-5 (A/B cis y trans) y en C-25. En las siguientes sapogeninas esteroidales Deoxytigogenina, Tigogenina, Hecogenina, Esmilagenina y Sarsasapogenina, se asignaron las señales de RMN¹³C correspondiente a todos sus átomos de carbono ²⁵.

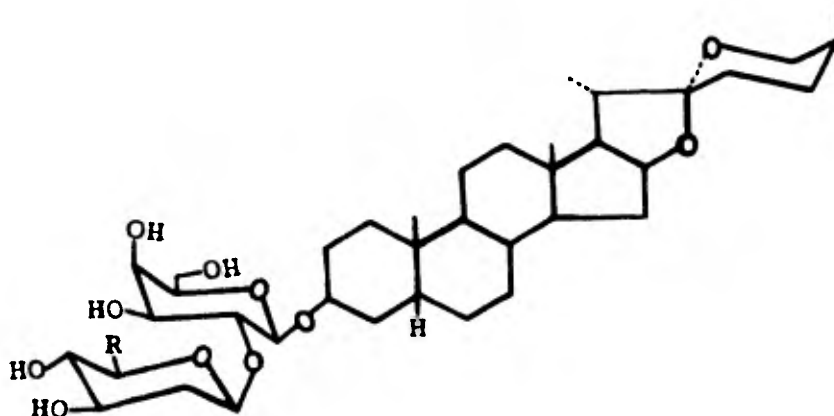
Estudios realizados en 1972, revelaron un elevado contenido de saponinas en semillas de Yucca filifera. En un trabajo posterior se separaron sus componentes y se determinó la estructura de dos filiferinas por medio de Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C. ²⁶.

La Filiferina A es:

(β -D-Xilosa) 1 \rightarrow 2 (β -D-Galactosa) 1 \rightarrow 3 (Sarsasapogenina).

La Filiferina B es:

(β -D-Glucosa) 1 \rightarrow 2 (β -D-Galactosa) 1 \rightarrow 3 (Sarsasapogenina).



Filiferina A: R=H

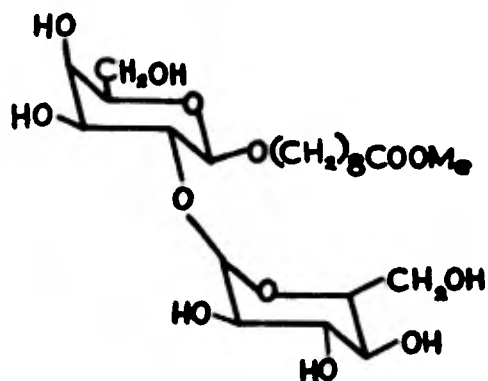
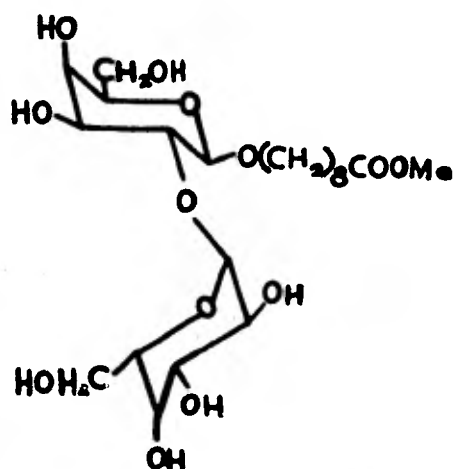
Filiferina B: R=CH₂OH

Para la determinación de las estructuras de las filiferinas A y B, se sintetizaron modelos simples para los que se asignaron todas las señales en RMN¹³C como se muestra enseguida:

# de C	Me- α -Xilosa ppm.	Me- β -Xil. ppm.	Me- α -Glucosa ppm.	Me- β -Glu. ppm.
1	100.2	104.7	99.7	104.2
2	72.0	73.2	72.5	72.9
3	73.4	76.5	73.4	76.9
4	70.0	69.6	70.1	69.9
5	61.7	65.6	71.9	76.9
6	--	--	61.0	60.3

Lemieux²⁶ para tener un modelo más cercano a las filiferinas, sintetizó modelos más complejos en los que se asignaron la señales de ¹³C, obteniéndose así una información más completa.

Modelos Complejos



a) 8-MeO-carboniloctil-
2-O-(α -D-Glucopiranosil)-
 β -D-galactopiranosil.

b) 8-MeO-carboniloctil-
2-O-(β -D-Glucopiranosil)-
 β -D-galactopiranosil.

Señales asignadas en RMN¹³C:

C	α -Glucop.	β -Galactop.	β -Glucop.	β -Galactop.
	ppm.	ppm.	ppm.	ppm.
1	97.9	103.6	104.2	101.7
2	71.8	76.0	72.9	80.1
3	73.5	71.8	76.9	74.8
4	70.1	68.2	69.9	67.8
5	72.2	74.8	76.9	74.8
6	60.3	60.7	60.3	60.7

III. PARTE TEORICA

III. PARTE TEORICA

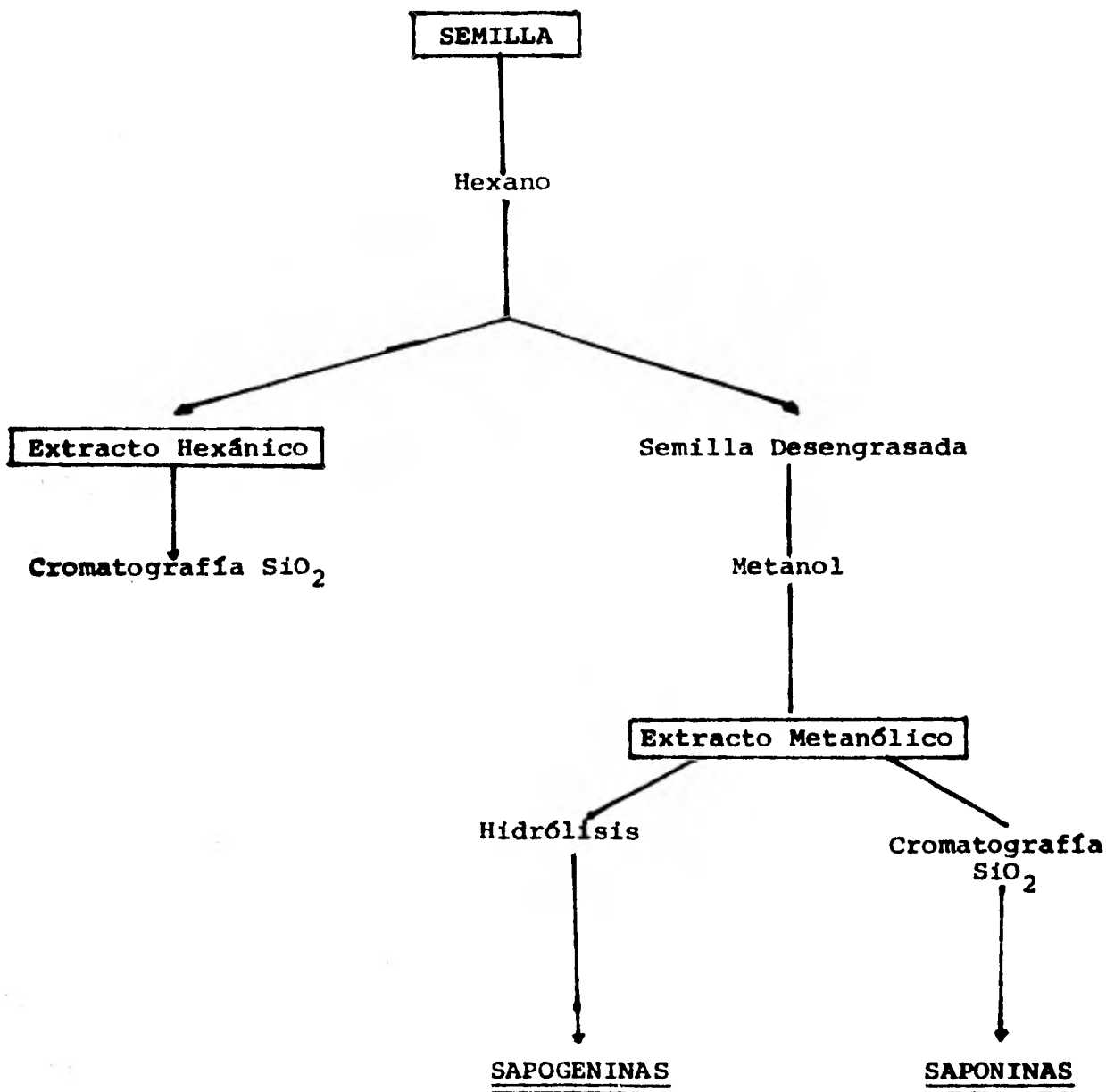
La Yucca filífera es también conocida como: Izo te, Palma china, Palma corriente, Palma grande. Es una planta que crece en clima semi-desértico y puede llegar a medir hasta 10 m. de altura; estas pueden ser acaules, arbustivas o arborecentes con tallo fibroso y con numerosas hojas rígidas, lanceoladas y provistas de una púa terminal. Produce grandes flores blanco-cremosas, dispuestas en paniculas colgantes que miden - hasta 1.50 m de longitud ¹. Estas flores son polinizadas mediante la concurrencia de un Lepidoptero conocido como Tegeticula mexicana ⁶, antes llamada Pronuba yuccasela ²⁷. Cuya larva se desarrolla en el interior de los frutos jóvenes o tiernos, consumiendo así una porción de la semilla. Sin embargo la Tegeticula mexicana es de gran utilidad ya que efectúa la polinización de esta planta. Para esto la mariposa transporta el polen desde las anteras al estigma, enseguida deposita sus huevecillos en el ovario de la flor, por lo que se va a observar una pequeña cicatriz al madurar el fruto. El fruto es una baya conocida como dátil, que mide de 5 a 8 cm. contiene cuando ésta madura una pulpa comestible que es rica en azúcares y en su interior se encuentran semillas negruscas planas delgadas que son ricas en aceites y saponinas esteroidales.

Este es un caso de simbiosis obligada ya que - solamente con la concurrencia de la Tegeticula mexicana, se - efectúa la fecundación de las plantas, de manera que donde no existe este insecto, las yuccas no fructifican y las flores - que se producen cada año se secan sin dejar fruto. Aunque en condiciones naturales, cada año hay abundante producción de - semillas fértiles pero también se reproducen vegetativamente⁶.

Este trabajo se basa en el aislamiento de saponinas a partir de semillas a diferentes grados de madurez, por lo que para su realización se dividió en dos etapas:

- I. Aislamiento e identificación de sapogeninas y saponinas presentes en semillas de Yucca filifera tierna.
- II. Aislamiento e identificación de sapogeninas y saponinas presentes en semillas de Yucca filifera semi-tierna.

Para su estudio, se realizó el siguiente esquema de trabajo:



SEMILLA TIERNA

Se inició el estudio con semillas tiernas de Yucca filífera, las que son de color blanco, grandes y aplanadas. En la cicatriz del fruto se observaron huevecillos de Tegeticula mexicana (observados al microscopio con el lente - 40 x).

Las semillas se separaron del fruto y se secaron en la estufa a 90°C, después se procedieron a molerlas -- hasta dejar un polvo grueso.

Extracción Hexánica

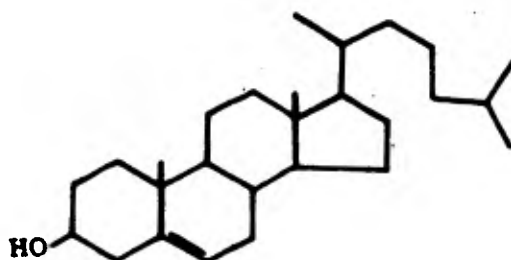
La semilla se extrajo con hexano a temperatura ambiente durante 24 hrs. La operación se repitió 4 veces, obteniéndose así un extracto de color amarillo limón.

El extracto hexánico se fraccionó mediante cromatografía en columna de sílice con el propósito de separar sus componentes.

En la fracción eluida con hexano-benceno 1:1 - se formaron sólidos amorfos de consistencia aceitosa, los cuales se separaron por medio de filtración. A estos sólidos se les realizó una cromatografía en placa fina (cuyos eluyentes fueron acetato de etilo-benceno 9:1), comparando a estos sólidos con un patrón de Colesterol puro. Los sólidos amorfos estaban constituidos por tres componentes y uno coincidía con

el Colesterol. Con el objeto de verificar la presencia del Colesterol se realizó un espectro de cromatografía de gases corriendo primero un patrón de colesterol puro con el objeto de observar su tiempo de retención y posteriormente, se corrió una muestra de los sólidos amorfos.

-- Cromatograma # 1: Como un pico correspondió con el Colesterol (esto es en tiempos de retención); a la muestra de los sólidos amorfos que pesaban 104 mg se les agregó 64 mg de Colesterol puro y se observó un aumento en el pico que correspondía al del colesterol. Por lo que queda identificado cualitativamente.



COLESTEROL

En las semillas procedentes de frutos tiernos o inmaduros se encontró Colesterol Libre, indicando la posible naturaleza precursora de esta sustancia en la formación de saponinas esteroidales. El colesterol encontrado en el fruto tierno, es además el probable precursor de la hormona de -

muda indispensable en el ciclo evolutivo de la Tegeticula mexicana.

Posiblemente la larva de la polilla al comer la semilla consumirá el colesterol, el cual le serviría como precursor para elaborar sus hormonas de muda o ecdisona, la que a su debido tiempo, provoca el cambio de larva a Tegeticula adulta, que es la mariposa que va a seguir polinizando las flores de la Yucca. Esto es posible, ya que el colesterol es el precursor para todos los insectos, solo con raras excepciones como es la Dropsophila pachea que en su lugar usa lofenol²⁸.

El colesterol se ha considerado por muchos años como el esteroide animal típico y ha sido diferenciado al de las plantas o fitoesteroide.

Aunque la identificación del colesterol no ha sido en el estudio de diferentes especies, rigurosamente suficiente para satisfacer a algunos investigadores, es claro que la presencia de este esteroide en las plantas no es esporádica. Por lo que es posible que el colesterol sea una sustancia clave en la síntesis de los esteroides en las plantas, también como en los animales²⁹.

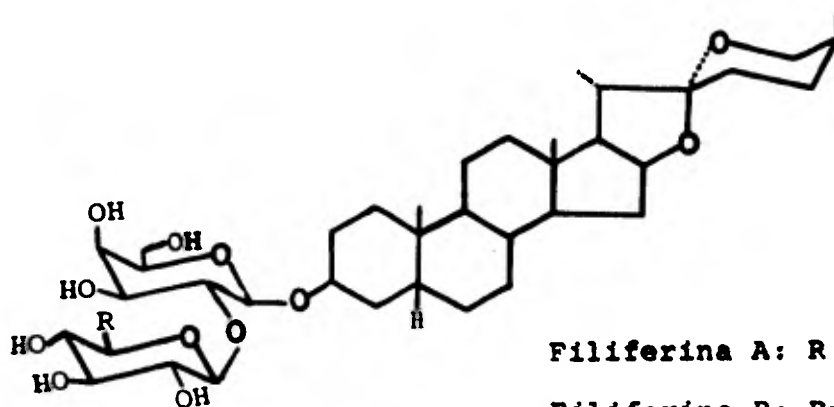
Extracto Metanólico

Las semillas molidas se desengrasaron previamente con hexano y posteriormente se le realizaron 9 extracciones con metanol, 6 a temperatura ambiente y 3 a reflujo con el objeto de obtener la mayor cantidad de saponinas existentes en los frutos tiernos de la Yucca.

REACCION DE HIDROLISIS

A 7 g de este extracto denso, de color miel que contiene las saponina, se le adicionaron 50 ml de HCl al 18% y se mantuvo durante 4 hrs a la temperatura del baño de vapor, - al término de está reacción, los enlaces de los glicósidos o saponinas se rompen para obtener los azúcares libres al igual que la aglicona. Se formaron en el seno de la reacción unos sólidos de color café; estos se filtraron y se neutralizaron con NaHCO_3 al 10%, por último se lavaron con agua destilada para quitar el exceso de NaHCO_3 . El sólido se disolvió en cloroformo y se secó con Na_2SO_4 anhidro; se evaporó el cloroformo y se recristalizó con acetona obteniendose cristales blancos identificados como SARSASAPOGENINA con pf 193-194°C, se comparó su I.R. con otro espectro de I.R. patrón, comprobandose su identidad.

- I.R. (espectro # 2) v máx: 3400 cm^{-1} banda característica para grupo OH; 2900 cm^{-1} para grupo C-H y numerosas bandas entre $1450-850 \text{ cm}^{-1}$.



Filiferina A: R = H

Filiferina B: R = CH₂OH



HCl 18%, 4 hrs. reflujo

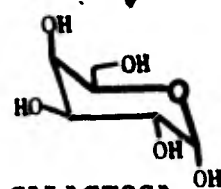
Residuo color café

Aguas madres

que contienen los
azúcares libres.

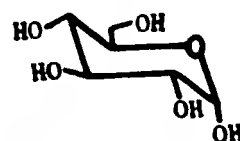
NaHCO₃ 10%

Cristalización MeOH/∞



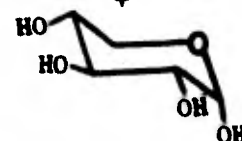
GALACTOSA

+

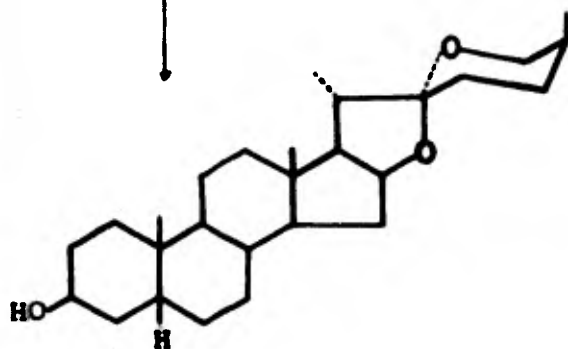


GLUCOSA

+



XILOSA



SARSASAPOGENINA

SEPARACION DE SAPONINAS

Los 7 g restantes del extracto metanólico se fraccionó mediante una cromatografía en columna de sílice -- usando como eluyentes una mezcla de cloroformo/metanol 1:1, - aumentando gradualmente el metanol hasta llegar al 100%.

En la polaridad 4:6 de cloroformo-metanol se obtuvieron sólidos blancos que son las filiferinas A y B identificadas por cromatografía en placa fina eluidas con metanol cloroformo 2:3, contra patrones puros de filiferinas A y B.

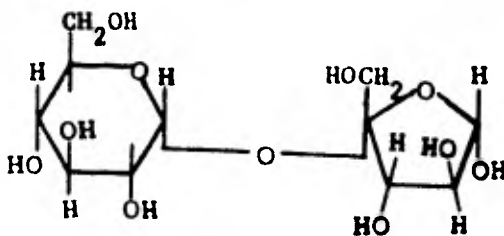
De las siguientes fracciones a una polaridad - de 3:7 cloroformo-metanol se obtuvieron 2 sustancias sólidas mezcladas a las que se les denominó como filiferinas C y D.

De las fracciones eluidas 2:8 metanol-cloroformo se obtuvo una sustancia cristalina con pf 185°C que fue - identificada como sacarosa. Su identificación se realizó, por medio de la comparación de su espectro de I.R. con el de sacarosa reportado en el catálogo The Sadtler Standar Spectra ³⁰ con el número Δ 8659. Correspondiendo totalmente sus bandas.

- I.R. (espectro 3) ν máx: 3400 cm^{-1} banda característica para grupo O-H; 2900 cm^{-1} para grupo C-H; 1130 cm^{-1} para C-O-C.

La sacarosa es un disacárido cuya hidrólisis - produce una mezcla equimolecular de glucosa y de fructosa, este azúcar se encuentra distribuido en el reino vegetal.

Este disacárido es ingerido por los seres vivos, son generalmente hidrolizados dando componentes monosacáridos, los cuales van a ser utilizados como fuente de energía ³¹. Por lo que la Tegeticula mexicana la puede utilizar como fuente de energía al comerla junto con la semilla.



SACAROSA

SEMILLA SEMI-TIERNA

Las semillas semi-tiernas de Yucca filífera, - que son blancas se encuentran mezcladas con negras, estas se secaron y se molieron, posteriormente se le realizaron 5 extracciones con hexano, obteniendo así un aceite de color amarillo.

Extracción Hexánica

El aceite se fraccionó en una columna de sílice y sus eluyentes fueron hexano-benceno en polaridad creciente hasta un 100% de benceno.

En las fracciones eluidas con hexano-benceno 1:1 se obtuvieron sólidos amorfos de aspecto ceroso. Se les realizó una cromatografía en capa fina comparando los sólidos con un patrón de colesterol puro, pero no coincidió ninguna mancha con la del Colesterol. También se realizó un cromatograma de gases de la muestra o sea de los sólidos amorfos y se verificó que no había colesterol.

Extracción Metanólica

Ya desengrasadas las semillas con hexano se realizaron 9 extracciones con metanol a reflujo, obteniendose así un extracto de color miel, el cual va cristalizando conforme avanzan las primeras extracciones, estos sólidos se se-

paran por filtración y estos se purifican por cristalizaciones sucesivas con metanol/acetona, se obtuvo una mezcla de filiferinas A y B (identificadas por cromatografía en placa fina).

SEPARACION DE SAPONINAS

El extracto metanólico se fraccionó mediante cromatografía en columna de sílice cuyos eluyentes fueron una mezcla de cloroformo/metanol (1:1) hasta llegar a 100% de metanol.

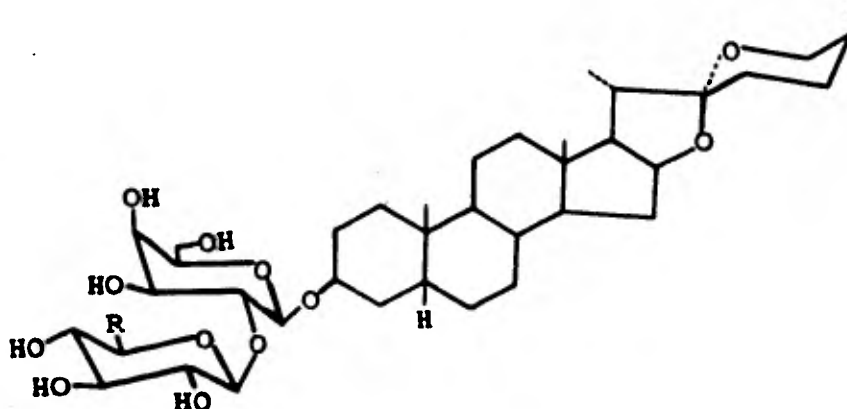
En la polaridad 1:1 metanol-cloroformo se obtuvieron cristales amorfos de filiferina A con pf 291°C y se identificó por cromatografía en placa fina, por medio de la comparación con una mezcla de filiferinas A y B, también por que su I.R. fué comparado con otro de filiferina patrón, los cuales resultaron idénticos.

-I.R. (espectro 4) v máx: banda entre 3200-3600 cm^{-1} para grupo O-H; 2900 cm^{-1} para grupo C-H; 1450 cm^{-1} para $-\text{CH}_2$; 1390 cm^{-1} para CH_3 y 1000-1150 cm^{-1} para grupo C-O-C.

También se aislaron de las siguientes fracciones cristales que corresponden a la filiferina B con pf >295°C y se identificó por comparación de su I.R. patrón en donde todas sus bandas resultaron iguales.

- I.R. (espectro 5) v máx: 3600 cm^{-1} para grupo OH; 2900 cm^{-1} para grupo C-H; 1000-1150 cm^{-1} para grupo C-O-C.

FILIFERINAS



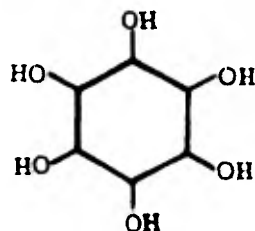
Filiferina A: $R = H$; Filiferina B: $R = CH_2OH$

De las siguientes fracciones eluidas con cloroformo-metanol 4:6 se obtuvo una mezcla de filiferinas B, C y D con pf 215-221°C.

De las fracciones eluidas con cloroformo-metanol 2:8 se obtuvieron cristales blancos que fueron identificados como Sacarosa mediante su pf y por comparación de su I. R. con el espectro # 3.

De las últimas fracciones de la columna se obtuvieron unos cristales identificados como INOSITOL con pf - 225°C y su I.R. se comparó con el del catálogo del Sadtler -- Standar Spectra ³² con el número 215 K, Vol 1., resultando idénticas sus bandas.

-I.R. (espectro 6) ν máx: 3600 cm^{-1} para grupo O-H; 2900 cm^{-1} para grupo C-H.

INOSITOL

El inositol es un azúcar que se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza. Este es un compuesto derivado del ciclo hexano, completamente hidroxilado.

Liebig postula en 1871 que el inositol es un factor de crecimiento para microorganismos e insectos ya que actúa en forma similar a las vitaminas para los seres vivos, además de otras sustancias como son el Colesterol y la Colina³¹.

Como la Yucca tiene Colesterol, Inositol y Sacarosa que son nutrientes para insectos, se considera un medio adecuado para que este presente la Tegeticula mexicana.

HIDROLISIS TOTAL DE FILIFERINAS C Y D.

La mezcla de las saponinas más polares que la A y la B, se sometió a una hidrólisis total. Se pesaron 304 mg de la mezcla y se le agregaron 20 ml de HCl al 18% y se colocó a reflujo a la temperatura del baño de vapor durante 6 hrs., - se formaron al término de la reacción un sólido, éste se filtró y se lavó con agua destilada hasta pH neutro. Los sólidos se disolvieron en cloroformo y se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se evaporó el cloroformo y se recristalizó con acetona, obteniéndose cristales con pf 196-198°C, identificados como sarsasapogenina por comparación directa con una muestra de sarsasapogenina patrón. Los espectros en el I.R. de ambas sustancias corresponden en todas sus bandas. En una cromatografía en placa fina se presenta una sola mancha con su rf igual al de la sarsasapogenina.

Como las sustancias son más polares que las filiferinas A y B, y también contienen la misma aglucona, que es la Sarsasapogenina, se le asignaron el nombre de Filiferinas C y D.

Los azúcares liberados fueron separados por -- una cromatografía en papel con el objeto de observar cuales - azúcares estaban unidos a la sarsasapogenina.

CROMATOGRAFIA EN PAPEL

Para la identificación de los azúcares se realizó una cromatografía en papel. Se cortó el papel Whatman # 1, en una pieza de 48.5 cm de largo por 16 cm de ancho (un lado ancho esta terminado en punta). Se aplicaron en el papel seco las siguientes muestras:

- 1) Hidrólisis total de C y D
- 2) Patrón de Glucosa
- 3) Hidrólisis total de A y B
- 4) Patrón de Galactosa
- 5) Hidrólisis parcial de B

Se usó como referencia muestras puras de azúcares. El sistema de disolventes utilizado en el desarrollo del cromatograma, fué una mezcla de Butanol-ác. acético-agua 4:1:5 v/v³⁴. Estos disolventes fueron agitados vigorosamente en un embudo de separación a los 15 min se separaron 2 fases: la superior se utilizó como fase móvil y la inferior como fase estacionaria. Se colocaron los disolventes en la cámara de cromatografía en papel hasta saturación, posteriormente se colocó el papel en forma descendente. El cromatograma se desarrolló en un lapso de 15 hrs., al terminó de este tiempo se secó el papel a temperatura ambiente, posteriormente se atomizó con una solución reveladora (que contenía 100 mg de ác. oxálico, más 0.9 ml de anilina en 100 ml de agua destilada)³⁵ y se colocó en un horno con temperatura de 110°C, durante 7 min, ob-

servandose la aparición de las siguientes manchas:

- 1) galactosa, glucosa y una pentosa
- 2) galactosa, glucosa y Xilosa
- 3) glucosa

Como se realizaron hidrólisis de la mezcla de filiferinas C y D, y también hidrólisis total de A y B, resultando sus rf iguales. Se concluye que los azúcares presentes en las filiferinas C y D, son los mismos que en las filiferinas A y B que son: galactosa, glucosa y Xilosa

SEPARACION DE LAS FILIFERINAS C Y D

Las filiferinas C y D se trataron de separar - por los siguientes métodos: Cromatografía en placa preparativa; cromatografía en columna en una relación extracto-sílice 1:30; separación en el aparato de cromatografía a contra corriente (DCC), pero los resultados fueron negativos.

Separación por Cromatografía en Columna:

La columna que se seleccionó para realizar la separación tenía las siguientes características 1.20 m. de -- largo por 2.5 cm de diámetro. La columna se empacó con sílice en una relación 1:180 mezcla de filiferinas C y D/sílice respectivamente. Se eluyó desde el principio la columna con una - mezcla de metanol-cloroformo al 25% hasta el final, sin cambio de polaridad en la mezcla, tomando fracciones de 20 ml, hasta la separación de las saponinas.

FILIFERINA C

La muestra analítica de esta saponina se obtuvo mediante recristalizaciones sucesivas con metanol/acetona.

Sus características físicas y espectroscópicas de éste compuesto son:

pf = 238°C y $\{\alpha\}_D^{20} = -41.93^\circ$ (DMSO)

- I.R. (espectro 7) ν máx: 3600 cm^{-1} para grupo OH; 2900 cm^{-1} para grupo C-H; 1000-1150 cm^{-1} para C-O-C.

- RMN¹³C: Ver tabla 2 (DMSO)

- Análisis elemental para C₄₄H₇₂O₁₇

Calculado: C = 60.53% H = 8.32% O = 31.16%

Encontrado: C = 59.44% H = 8.52% O = 31.10%

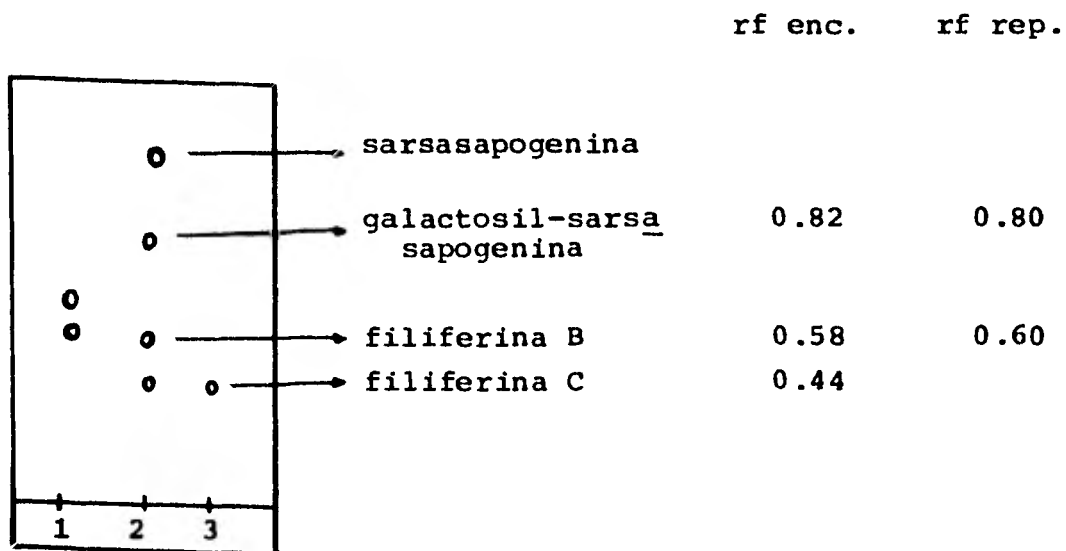
El análisis elemental corresponde para una fórmula C₄₄H₇₂O₁₇ de esto se puede deducir que debido al número de átomos de carbonos y de oxígenos presentes en la molécula, se encuentran unidos a la sarsasapogenina 2 hexosas y una pentosa. Como ya se tenían identificadas a las hexosas por cromatografía en papel, estas pueden ser galactosa o glucosa y la pentosa (xilosa).

- Masas: No se obtuvieron y esto es debido a la escasa volatilidad y casi instantánea ruptura del enlace acetalico de los glicósidos en especial en las saponinas.

Hidrólisis Pracial de FILIFERINA C:

A 76.5 mg de filiferina C pura se le agregaron -- 25 ml de agua destilada y se le adicionaron 0.2 ml de HCl, es tá saponina se disolvió completamente en agua, produciendo al agitar espuma. La solución teniendo un pH~3 se colocó a reflujo a la temperatura del baño de vapor, (considerándose este - instante como tiempo = 0).

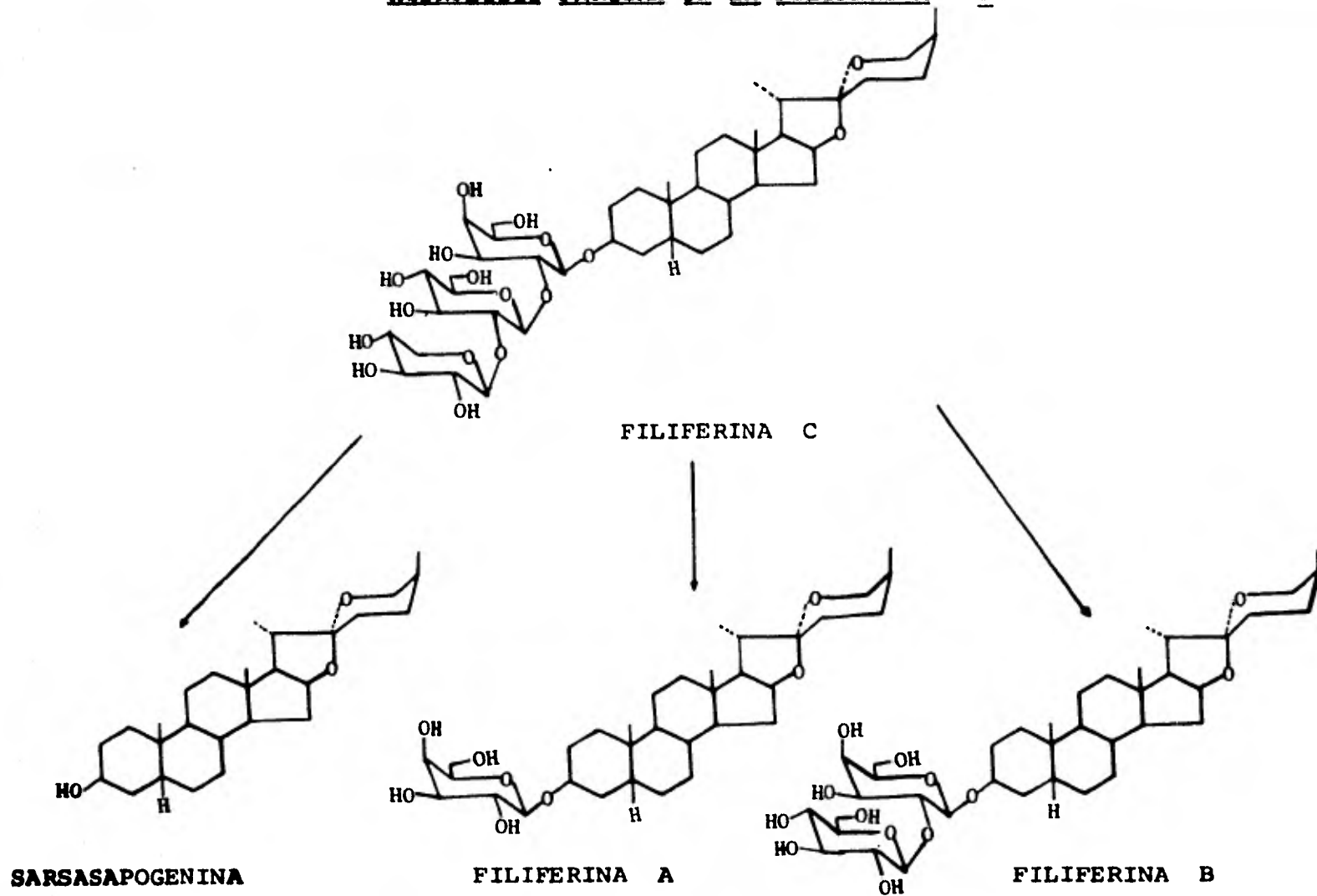
La solución se agitó esporádicamente y con un capilar de vidrio se sacaron muestras a diferentes intervalos de tiempo. A los 15 min. se puso turbia la solución, se tomó una muestra y no se observó ningún cambio por medio de la cromatografia en placa fina. A los 30 min. se observaron sólidos en pequeñas cantidades, fué imposible filtrarlos ya que pasaban el filtro, por lo que a toda la solución se le hicieron extracones con cloroformo en un embudo de separación, observandose dos capas, en la parte superior es agua que contenía los azúcaores libres y en la capa inferior contenía a las saponinas di--sueltas en cloroformo. Este extracto clorofórmico se le realizó una cromatografía en placa fina, comparandolo con mezcla de filiferinas A y B. En seguida se muestran los resultados de la cromatografía en placa fina, cuyos eluyentes fueron cloroformo/metanol/agua 65:35:10 (capa inferior). Además los rf de las tras son comparadas con los rf reportados por Hosttetman ¹⁵.



- 1) Mezcla de filiferinas A y B.
- 2) Hidrólisis parcial de filiferina C.
- 3) Filiferina C patrón.

Como se identificó a la filiferina B como un producto de la hidrólisis parcial de la filiferina C, se puede concluir que dos de las hexosas de la filiferina C, es la galactosa y la glucosa, con la misma forma de unión y estereoquímica que la filiferina B, por lo que solo resta identificar a la pentosa.

HIDROLISIS PARCIAL DE LA FILIFERINA C



FILIFERINA D

La muestra analítica de esta saponina se obtuvo mediante recristalizaciones sucesivas con metanol/acetona.

Sus características físicas y espectroscópicas de éste nuevo compuesto son:

pf = 209 - 211°C y $[\alpha]_D^{20} = -29.78$ (DMSO)

- I.R. (espectro 8) v máx: 3300 - 3600 cm^{-1} banda para grupo OH; 2900 cm^{-1} grupo C-H; 1050-1150 cm^{-1} para grupo C-O-C.

- RMN¹³C: Ver tabla 3 (DMSO)

- Análisis elemental para $\text{C}_{51}\text{H}_{84}\text{O}_{23}$.

Calculado: C = 57.50% H = 7.94% O = 34.54%

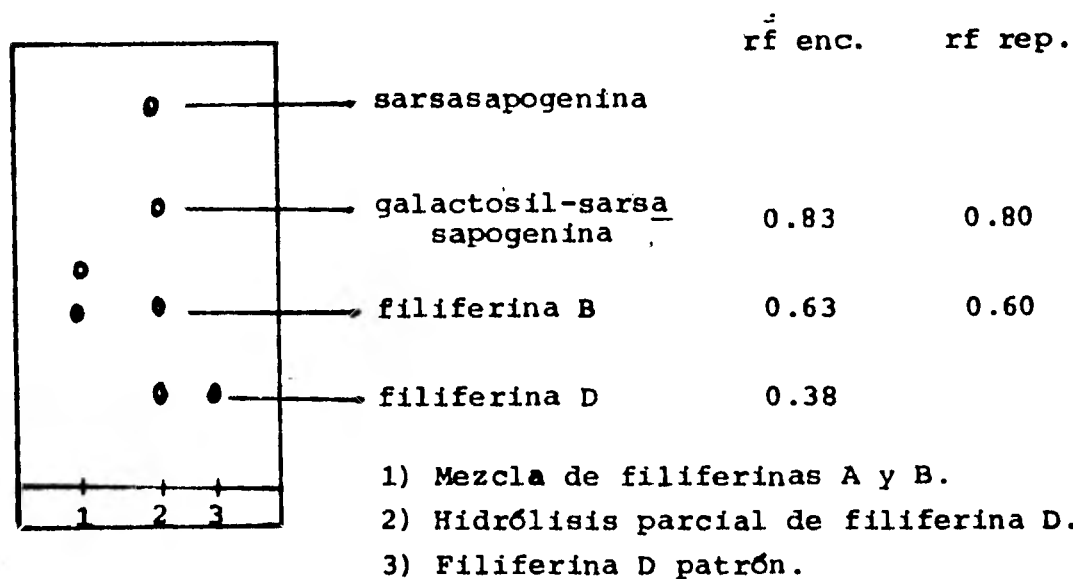
Encontrado: C = 57.52% H = 8.37% O = 33.64%

El análisis elemental corresponde a la fórmula $\text{C}_{51}\text{H}_{84}\text{O}_{23}$ de esto se puede deducir que debido a el número de átomos de carbonos y de oxígenos presentes en este compuesto, se encuentran unidas 4 hexosas a la sarsasapogenina. Como se tienen identificadas a las hexosas por cromatografía en papel estas pueden ser galactosa o glucosa.

Hidrolisis Parcial de FILIFERINA D:

Se pesaron 100 mg de filiferina D pura, a la cual se le agregaron 25 ml de agua destilada, más 0.3 de HCl, esta saponina se disolvió completamente y se colocó a reflujo

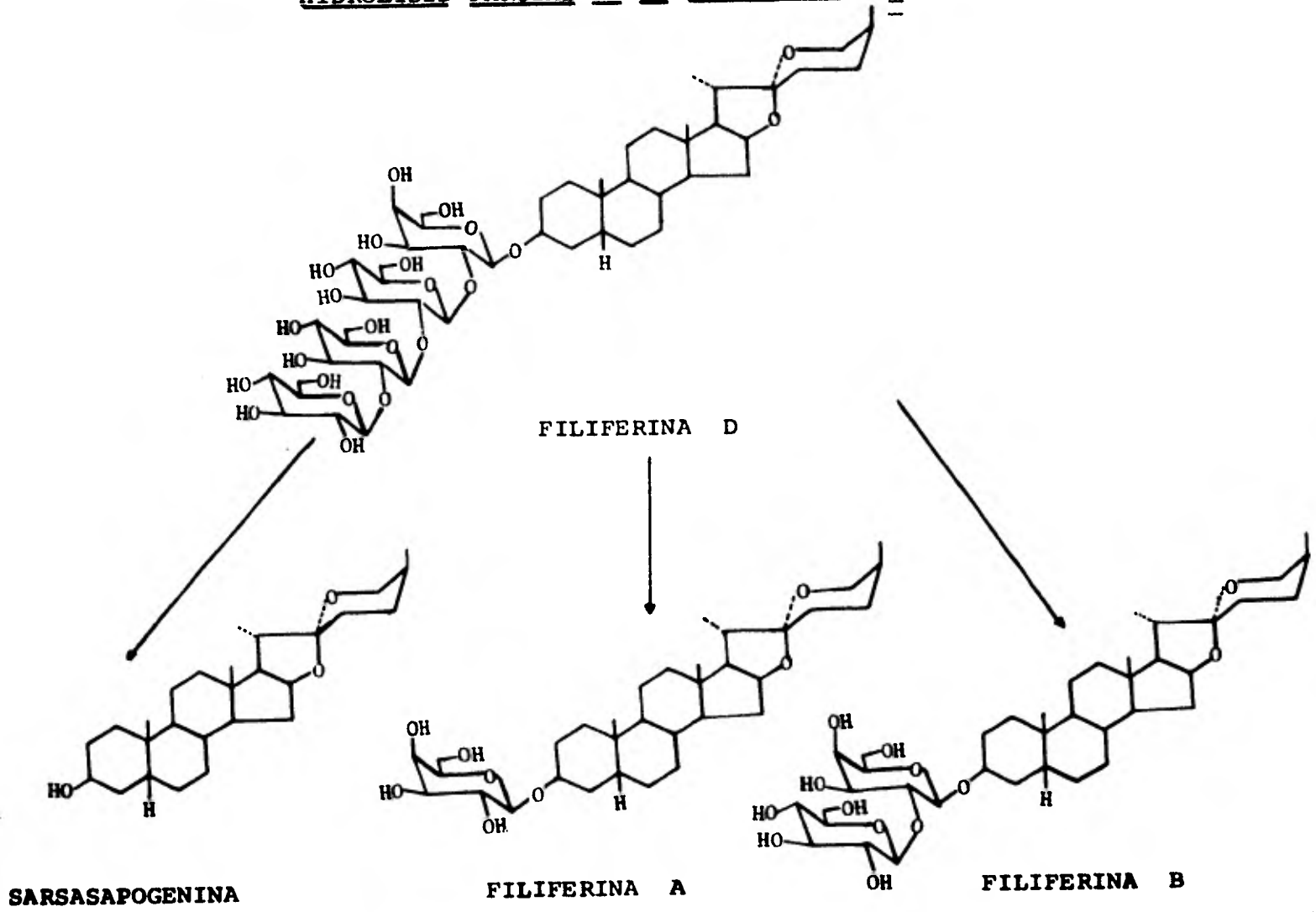
(tomando este instante como tiempo = 0). A los 15 min. la solución se pone turbia pero no se observan cambios en la cromatografía en placa fina. A los 45 min se observan una pequeña cantidad de sólidos en el seno de la reacción. La solución fue extraída varias veces con cloroformo en un embudo de separación, se concentra la fase clorofórmica y con un capilar se toma una muestra, la cual se cromatografía en placa fina comparandolas con los r_f de las filiferinas A y B, y con los r_f reportados por Hostetman¹⁵. Los eluyentes de la placa fueron: cloroformo/metanol/agua 65:35:10 V/V (capa inferior).



Como se identificó en la hidrólisis parcial de la filiferina C, a la filiferina B podemos deducir que dos de las cuatro hexosas presentes en este compuesto, es la galactosa y la glucosa con la misma estereoquímica que la filiferina B.

HIDROLISIS PARCIAL DE LA FILIFERINA

D



SARSASAPOGENINA

FILIFERINA A

FILIFERINA B

DISCUSION DE RMN¹³C.

Las señales del desplazamiento químico de RMN¹³C para las filiferinas C y D, fueron medidas en solución de DMSO y con tetrametilsilano como estandar interno.

En la tabla 1 las asignaciones de las señales de cada carbono de la sarsasapogenina en las filiferinas A, B, C y D, fueron asignadas por comparación con las que reporta - Eggert y Djerasi para la sarsasapogenina libre ²⁵.

Datos reportados por Lemieux²⁶ indica que las señales en campo alto hasta 56 ppm, son asignables a la sarsasapogenina, además de 5 señales que se encuentran a campo bajo y que son las siguientes: 108.8; 80.4; 73.2; 64.3 y 62.0 (ppm). En la filiferina C estas señales aparecen a 111.8; 80.5; 73.4; 63.4 y 61.3 (ppm). En la filiferina D a 111.8; 80.6; 73.4; 63.4 y 61.3. Estas señales identificadas por comparación, comprueba que la aglicona presente en todas las filiferinas es la SARSASAPOGENINA.

En la tabla 1 se puede observar que el desplazamiento químico del átomo de carbono 3 en la sarsasapogenina libre es de 67.1 ppm, esta señal se encuentra desplazada a campo bajo en las filiferinas; en la filiferina A se desplaza a 73.2 ppm., en la filiferina B a 73.9 ppm., y en las filiferinas C y D a 73.4 ppm. Estos datos indican que el C-3 de la sarsasapogenina es el punto de unión con los azúcares, y que es el átomo de carbono que se encuentra más desplazado a campo bajo.

TABLA 1

SARSASAPOGENINA

SEÑAL	S	A	B	C	D
C-1	30.1	29.9	30.0	29.9	30.0
C-2	27.9	29.9	30.0	29.4	29.9
C-3	67.1	73.2	73.9	73.4	73.4
C-4	33.7	34.5	34.5	34.5	34.5
C-5	36.6	36.8	35.9	36.6	36.6
C-6	26.7	29.9	30.0	27.4	27.3
C-7	26.7	29.9	30.0	26.3	26.2
C-8	35.4	36.8	35.9	35.5	36.0
C-9	40.4	39.6	40.2	40.0	40.1
C-10	35.4	34.9	35.0	35.0	34.9
C-11	21.0	20.5	20.5	20.4	20.4
C-12	40.0	39.6	40.2	39.7	39.6
C-13	40.7	39.6	40.2	40.6	40.6
C-14	56.6	55.8	55.8	55.7	55.7
C-15	31.8	31.4	31.5	31.4	31.4
C-16	81.1	80.4	80.4	80.5	80.6
C-17	62.3	62.0	62.0	61.3	61.3
C-18	16.5	16.1	16.1	17.0	17.0
C-19	24.0	23.5	23.5	23.4	23.5
C-20	42.1	41.6	41.6	41.8	41.8
C-21	14.4	14.3	14.3	15.6	15.6
C-22	109.8	108.7	108.8	111.8	111.8
C-23	26.7	29.9	30.0	30.2	30.1
C-24	25.9	23.4	23.5	25.9	25.9
C-25	26.1	26.5	26.5	26.1	26.1
C-26	65.0	64.3	64.3	63.5	63.4
C-27	16.1	15.9	15.9	16.0	16.0

RMN¹³C de Sarsasapogenina libre (S); (A) sarsasapogenina de filiferina A; (B) sarsasapogenina de filiferina B, así respectivamente. Corridos en DMSO en un aparato Varian FT-80. Las señales fueron asignadas por comparación²⁵ y están dadas en ppm.

En la tabla 2 se encuentran los desplazamientos de RMN^{13}C de los azúcares que se encuentran unidos a la filiferina B y también se encuentran las señales del Me- β -xilopiranosido y estos son comparados con los de la filiferina C. Las uniones interglicosídicas de la filiferina B, fué determinada por espectroscopía de RMN^{13}C por comparación con el modelo de Lemieux ²⁵.

En las tablas 2 y 3 el desplazamiento del átomo de carbono 1 de la galactosa en la filiferina C es de 99.9 ppm. y en la filiferina D es de 100.7 ppm., mientras que el C-1 en la galactosa libre ³³ es de 93.2 ppm. Este desplazamiento a campo bajo indica que el punto de unión del azúcar con la sarsapogenina con el azúcar es en el C-1 de la galactosa con el C-3 de la sarsapogenina. La aparición de las señales de los átomos de carbono anoméricos a campos relativamente altos puede ser explicado en términos de efecto de sustitución por otras uniones glicosídicas en la posición C-2, esto es reportado por Konishi ¹⁵.

En las tablas 2 y 3 el carbono anomérico de la galactosa que está desplazado a campo bajo, indica que el C-2 de la galactosa es el punto de unión con la glucosa ya que se encuentra desplazado cerca de 9 ppm por efecto β . El C-2 de la galactosa libre ³³ se encuentra a 70.2 ppm. y en las filiferinas se encuentran desplazadas a campo bajo. En la filiferina A se encuentra a 80.4 ppm.; en la filiferina B a 79.1 ppm; filiferina C a 80.1 ppm y en la filiferina D es de 79.2 ppm.

Los desplazamiento químicos obtenidos de RMN¹³C de las filiferinas, comprueban a los anteriores, en donde se identificó a la filiferina B a partir de las hidrolisis parciales de las filiferinas C y D. En la filiferina C la pentosa que faltaba de identificar es la xilosa y las hexosas que faltaban identificar en la filiferina D es la glucosa.

Con toda la recopilación de datos anteriores y los de RMN¹³C, las estructuras de las filiferinas C y D son establecidas como:

C) (β -D-Xilosa) 1 \rightarrow 2 (β -D-Glucosa) 1 \rightarrow 2 (β -D-galactosa) 1 \rightarrow 3
(sarsasapogenina)

D) (β -D-Glucosa) 1 \rightarrow 2 (β -D-Glucosa) 1 \rightarrow 2 (β -D-Glucosa) 1 \rightarrow 2 (β -D-Galactosa) 1 \rightarrow 3 (sarsasapogenina).

TABLA 2

FILIFERINA C

	Residuo β -D-Galactopiranosil						Residuo β -D-Glucopiranosil					
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
(1)	100.8	79.1	74.7	67.8	75.0	61.2	103.8	73.9	76.9	70.1	76.2	60.2
(2)	99.9	80.1	74.6	67.9	74.8	61.3	103.2	76.9	76.7	70.4	73.6	60.4
	Residuo β -D-Xilopiranosil											
(1) Filiferina <u>B</u>							105.1	72.9	75.9	69.6	65.8	--
	Metil- β -D-Xilopiranosido											
(2) Filiferina <u>C</u>							104.7	73.2	76.5	69.6	65.6	

La estructura propuesta para la filiferina C es:

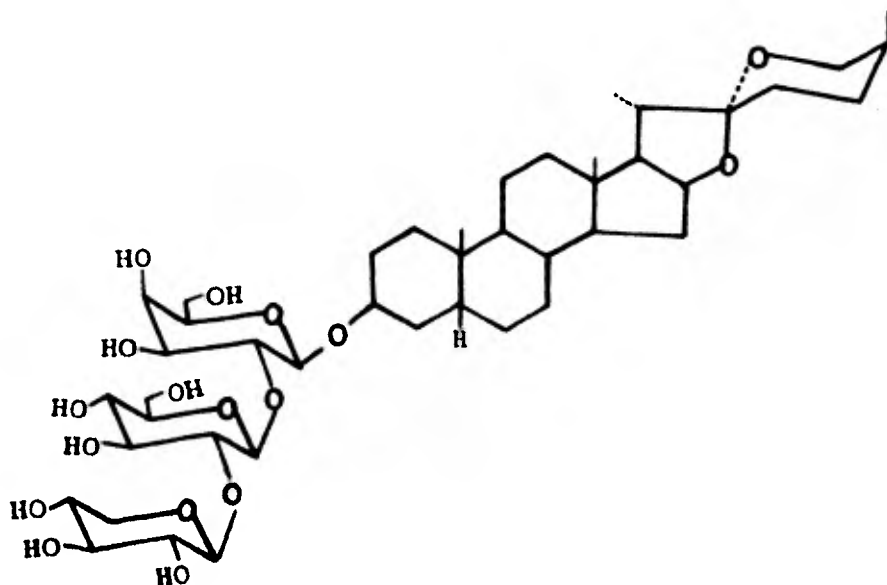


TABLA 3

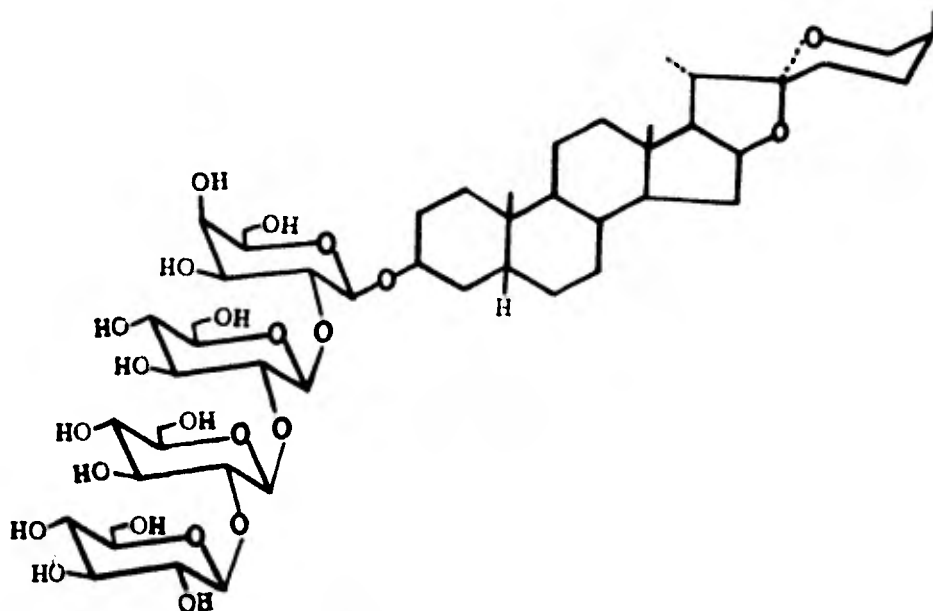
FILIFERINA D

	Residuo β -D-Galactopiranosil						Residuo β -D-Glucopiranosil					
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
(1)	100.8	79.1	74.7	67.8	75.0	61.2	103.8	73.3	76.9	70.1	76.2	60.2
(2)	100.7	80.5	74.7	67.9	74.6	61.4	103.7	76.9	74.1	70.4	76.7	60.3
							103.3	76.8	73.8	"	"	"
							103.2	76.3	73.6	"	"	"

(1) Filiferina B

(2) Filiferina D

La estructura propuesta para la Filiferina D:



IV. CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

Del estudio de saponinas, realizado en semillas de Yucca filífera a diferentes grados de madurez se pueden inferir las siguientes conclusiones:

Se obtuvieron las siguientes saponinas: Las filiferinas A y B, que fueron identificadas por patrones puros de estas. Además de otras 2 saponinas nuevas, las cuales se les denominó como Filiferinas - C y D.

Las estructuras de estas 2 nuevas móleculas fueron determinadas por hidrólisis parciales, - cromatografía en papel y por sus datos espectroscópicos de RMN¹³C, que fueron comparados directamente con los de las filiferinas A y B.

Estas saponinas provenientes de Yucca filífera son móleculas con esqueleto esteroidal, ya - que la sapogenina común fue la SARSASAPOGENINA.

Como constituyentes de la Yucca se -- identificaron también Sacarosa e Inositol, azúcares que también están presentes en muchas plantas.

V. PARTE EXPERIMENTAL

** Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos. Las cromatografías en columna se efectuaron en sílica-gel 60 Merck (70-230 Mesh ASTM). La identificación y pureza de los productos, el desarrollo de las reacciones se siguió por cromatoplaque de sílica gel Merck F-254, usando como revelador sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N.

Los espectros de IR fueron corridos en soluciones de CHCl_3 ó en pastilla de KBr.

Los espectros de RMN^{13}C se efectuaron en el espectrómetro FT-80 (20.1 MHz). Los desplazamientos químicos están dados en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Los análisis elementales fueron efectuados por el Dr. Franz Pascher, en Bonn, República Federal de Alemania.

Las rotaciones ópticas se efectuaron en un polarímetro Perkin-Elmer Mod. 241 .

V. PARTE EXPERIMENTAL

SEMILLA TIERNA

Los frutos tiernos de Yucca filifera, fueron recolectados en junio de 1980 a 20 km de la ciudad de Saltillo, Coahuila.

Se inició el estudio con 23.6 g de semillas tiernas todas de color blanco, estas se molieron para someterlas a 2 tipos de extracciones.

Extracción Hexánica

La semilla fue extraída primeramente con hexano durante un día a temperatura ambiente, esta operación se repitió 4 veces; los extractos se reunieron y se concentraron a vacío obteniéndose así 1.6 g de consistencia aceitosa y de color amarillo limón.

Separación del Extracto:

El extracto hexánico se fraccionó mediante una cromatografía, en una columna que contenía 48 g de sílice. La cromatografía se inició eluyendo con hexano al 100%, siguiendo con mezclas hexano-benceno a las que se fue aumentando gradualmente la proporción de benceno hasta terminar con benceno 100%.

De las fracciones eluidas con hexano-benceno 1:1 se separaron sólidos blancos de aspecto ceroso, a los cuales se les realizó una cromatografía de gases comparada con patrón de colesterol puro. A la muestra problema se le agregó colesterol puro, observándose el crecimiento del pico que corresponde al del colesterol. De esta manera quedó identificado cualitativamente el colesterol.

Extracción Metanólica

La semilla previamente desengrasada con hexano se extrajo con metanol a temperatura ambiente (9 veces), los extractos se reunieron y se concentraron a vacío, obteniendo 14 g de extracto que presenta sólidos en pequeña proporción, los cuales al tratar de filtrarse pasan el filtro. Este extracto es tratado de 2 maneras, como se indica en el esquema general, dividiéndolo en dos fracciones:

Separación de Saponinas

7 g del extracto metanólico se cromatografían en una relación 1:30 (extracto/slice), la columna se eluye inicialmente con una mezcla de cloroformo-metanol (1:3) hasta 100% de metanol.

De las fracciones eluidas con cloroformo-metanol 1:3 se obtuvieron 128 mg de sólidos blancos con pf 285 - 292°C, que son una mezcla de filiferinas A y B, identificadas

por comparación de patrones de filiferinas A y B en cromatografía en placa fina.

De las fracciones eluidas con cloroformo-metanol 3:7 se obtuvo 75 mg de sólidos blancos pf 215-225°C, que son - mezcla de filiferinas B, C y D.

De las fracciones eluidas con cloroformo-metanol 1:4 se obtuvieron 44.6 mg de sacarosa con pf 180°C, identificada por comparación de su espectro de I.R. con el reportado para sacarosa en The Sadtler Standar Spectra # 8659.

- I.R. ν máx.: 3400 cm^{-1} (OH); 2900 cm^{-1} (C-H); 1560-400 cm^{-1} .

Reacción de Hidrólisis

A los 7 g restantes del extracto, se le adicionaron 20 ml. de agua destilada y 50 ml de HCl al 18%. La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo durante 4 hrs., al término de este período se formó en el seno de la reacción un sólido de color café, éste se filtró y se neutralizó con solución de NaHCO_3 al 10%, y se lavaron con agua destilada. El sólido - se disolvió en cloroformo, la solución se secó con Na_2SO_4 anhidro y se indujo la cristalización con acetona, obteniéndose así 0.56 g de cristales blancos, correspondiendo a Sarsasapogenina, identificada por comparación directa de su I.R. con una muestra patrón.

- I.R. v máx.: 3400 cm^{-1} (OH); 2900 cm^{-1} (C-H);
 $1350-850\text{ cm}^{-1}$.

SEMILLA SEMI-TIERNA

Los frutos semi-tiernos de Yucca filífera fueron recolectados entre Actopan e Ixmiquilpan en el estado de Hidalgo en la carretera México-Laredo en Julio de 1980.

Las semillas pesaron 183.2 g, ahora las semillas blancas se encuentran mezcladas con negras, estas se secaron en estufa a 90°C y se molieron.

Extracción Hexánica

Las semillas se extrajeron 5 veces con hexano, este extracto es de consistencia aceitosa y de color amarillo café, el peso total fue de 16.7 g.

El extracto se cromatografió en columna de sílice en una relación 1:30 de extracto/sílice, se eluyó inicialmente con hexano 100% y posteriormente con mezclas de hexano-benceno, en polaridad creciente hasta 100% de benceno.

En las fracciones eluidas hexano-benceno 1:1 se obtuvieron sólidos amorfos de aspecto ceroso. Se le realizó un cromatograma de gases de estos sólidos, pero no se detectó la presencia del colesterol.

Extracción Metanólica

Las semillas ya desengrasadas con hexano se extrajeron 9 veces con metanol a reflujo, obteniéndose así un extracto de color miel, el cual cristalizó, se separan los sólidos del extracto por medio de filtración, estos son purificados por medio de cristalizaciones sucesivas con metanol/acetona obteniendo así 22.4 g de filiferinas A y B identificadas por comparación con una muestra patrón en cromatografía en placa fina.

El filtrado se concentró al vacío, obteniéndose 57 g de extracto metanólico.

Separación de Saponinas

Los 57 g del extracto metanólico fueron fraccionados mediante cromatografía en columna de sílice con una relación 1:30 de extracto-sílice; se eluyó inicialmente la columna con cloroformo-metanol 1:1 hasta 100% de metanol.

De las fracciones eluidas con cloroformo-metanol 1:1 se obtuvieron 14 g de mezcla de filiferinas A y B.

De las fracciones eluidas con cloroformo-metanol 2:3 se obtuvieron 9.4 g de filiferinas B, C y D.

De las fracciones eluidas CHCl_3 -MeOH 1:4, se obtuvieron 0.35 g de sacarosa con pf 180°C , se le realizó un I.R. y este se comparó con el I.R. de sacarosa patrón.

Separación de Filiferinas C y D

lg de la mezcla, se fraccionó mediante cromatografía en columna de sílice en una relación 1:180 de mezcla-sílice, ésta se eluyó totalmente con cloroformo-metanol al 25% - sin cambio de polaridad, tomando fracciones de 20 ml., cromatografiándose estas en placa fina.

Las muestras analíticas de cada saponina se obtuvieron por recristalizaciones sucesivas con metanol/acetona.

F I L I F E R I N A C

Las características físicas y espectroscópicas de esta saponina son las siguientes:

pf = 238-239°C $\{\alpha\}_D^{20} = -41.93$ (DMSO)

- I.R. v máx.: 3400 cm^{-1} (OH); 2960-2840 cm^{-1} (C-H); 1450-1000 cm^{-1} .

- RMN¹³C: 111.8; 105.1; 103.2; 99.9; 80.5; 80.1; 77.0; 76.8; 75.9; 74.8; 74.6; 73.6; 73.4; 72.9; 70.4; 69.6; - 67.9; 65.8; 63.4; 61.4; 61.3; 60.4; 55.7; 41.8; 40.6; 40.0; - 39.7; 36.6; 35.5; 35.0; 34.5; 31.4; 30.2; 29.9; 29.4; 27.4; - 26.3; 25.9; 23.4; 20.4; 17.0; 16.0; 15.6; 26.1. (44 señales).

- Analisis Elemental para C₄₄H₇₂O₁₇.

Calculado: C = 60.53% H = 8.32% O = 31.16%

Encontrado: C = 59.44% H = 8.52% O = 31.10%

F I L I F E R I N A D

Las características físicas y espectroscópicas de esta saponina son las siguientes:

$$\text{pf} = 209-211^{\circ}\text{C} \quad \{\alpha\}_{\text{D}}^{20} = -29.78^{\circ} \quad (\text{DMSO})$$

- I.R. ν máx.: 3400 cm^{-1} (OH); $2960-2840 \text{ cm}^{-1}$ (C-H);

- RMN¹³C: 111.8; 103.7; 103.3; 103.2; 100.7; - 80.6; 80.5; 76.9; 76.8; 76.7(3); 76.4; 74.7; 74.6; 74.1; 73.8 73.6; 73.4; 70.4(3); 67.9; 63.4; 61.4; 61.3; 60.3(3); 55.7; - 41.8; 40.6; 40.1; 39.6; 36.6; 36.0; 34.9; 34.5; 31.4; 30.1, - 30.0; 29.9; 27.3; 26.2; 26.1; 25.9; 23.5; 20.4; 17.0; 16.0; - 15.6. (51 señales). (DMSO)

- Análisis Elemental para $\text{C}_{51}\text{H}_{84}\text{O}_{23}$

Calculado: C = 57.50% H = 7.94% O = 34.54%

Encontrado: C = 57.52% H = 8.37% O = 33.64%

HIDROLISIS TOTAL

La mezcla de filiferinas C y D, se sometió a - hidrólisis total. Se pesaron 305 mg de la mezcla y se le agre garon 20 ml de HCl al 18% y se colocó a reflujo a la tempera- tura del baño de vapor durante 6 hrs.; se formó en el seno de la reacción, un sólido el cual se filtro y lavó con agua des- tilada. El sólido se disolvió en cloroformo y se secó con -- Na_2SO_4 anhidro y se recristalizó con acetona obteniendose --

cristales puros con $pf = 196-198^{\circ}C$, identificando así a Sar sasapogenina por medio de su I.R.

El filtrado que contenía los azúcares fue som tido a una cromatografía en papel.

CROMATOGRAFIA EN PAPEL

Se cortó el papel Whatman # 1, en una pieza de 48.5 cm de largo por 16 cm de ancho (un lado angosto terminado en punta), se aplicaron las siguientes muestras:

- 1) Hidrolisis de C y D
- 2) Patrón de glucosa
- 3) Hidrólisis total de A y B
- 4) Patrón de galactosa
- 5) Hidrolisis parcial de B

El sistema de disolventes utilizado fué butanol-ac. acético-agua 4:1:5 V/V. Para esto fueron mezcladas los disolventes y agitados enérgicamente en un embudo de separación. La fase superior fue utilizada como fase móvil y la fase inferior como fase estacionaria.

La tira de papel se coloca en la cámara ya saturada con el disolvente, el papel se coloca en forma descendente el desarrollo del cromatograma se llevó a cabo durante 15 hr. después de este tiempo el papel se secó a temperatura ambiente. Posteriormente se atomizó con una solución reveladora (que contenía 100 mg de ác. oxálico, más 0.9 ml de anilina en 100 ml de agua destilada), se colocó el papel en un horno calentado a --

110°C durante 7 min. Observándose las siguientes manchas:

- 1) galactosa, glucosa y una pentosa
- 2) galactosa y glucosa
- 3) glucosa

Hidrólisis parciales

a) Mezcla de FILIFERINAS A y B

Se realizó un ensayo previo con filiferinas A y B. Se pesaron 200 mg de las filiferinas y se agregaron 25 ml de agua destilada, más 1.7 ml de $H_2SO_4^{33}$; se colocó a reflujo, a las 2 hrs se tomo una muestra, y se comparó con la mezcla de filiferinas patrón en una cromatografía de placa fina y se identificó lo siguiente:

Sarsasapogenina, galactosil-sarsasapogenina y filiferinas A y B.

b) Hidrólisis parcial de Filiferina C.

Se pesaron 76.5 mg de filiferinas C pura a la que se le agregó 25 ml de agua destilada más 0.2 ml de HCl, está saponina se disolvió completamente. La solución con un pH=3 se colocó a reflujo, (considerando entonces tiempo=0). A los 15 min. se puso turbia la solución, a los 30 min. se formaron sólidos en pequeña cantidad; estos se decantaron y toda la solución fue extraída con cloroformo en un embudo de separación: en la parte superior, que es agua que contiene a los azúcares libres y en la parte inferior se encuentran las saponinas y --

sapogenina disueltas en cloroformo. Se concentró el extracto clorofórmico y se le realizó una cromatografía en placa fina comparandolas con las filiferinas A y B.

La mezcla de reacción contiene:

Sarsasapogenina, galactosil-sarsasapogenina, y filiferinas B y C.

La sapogenina y las saponinas mencionadas antes fueron identificadas por cromatografía en placa fina comparandolas con mezclas de filiferinas A y B, además con el rf reportado por Hostettman¹⁵. Los eluyentes de las placas fueron: -- cloroformo/metanol/agua 65:35:10 V/V (capa inferior), dando los siguientes rf galactosil-sarsasapogenina (rf 0.82); filiferina A (rf 0.63); filiferina B (rf 0.58) y filiferina C (rf 0.45).

c) Hidrolisis parcial de FILIFERINA D

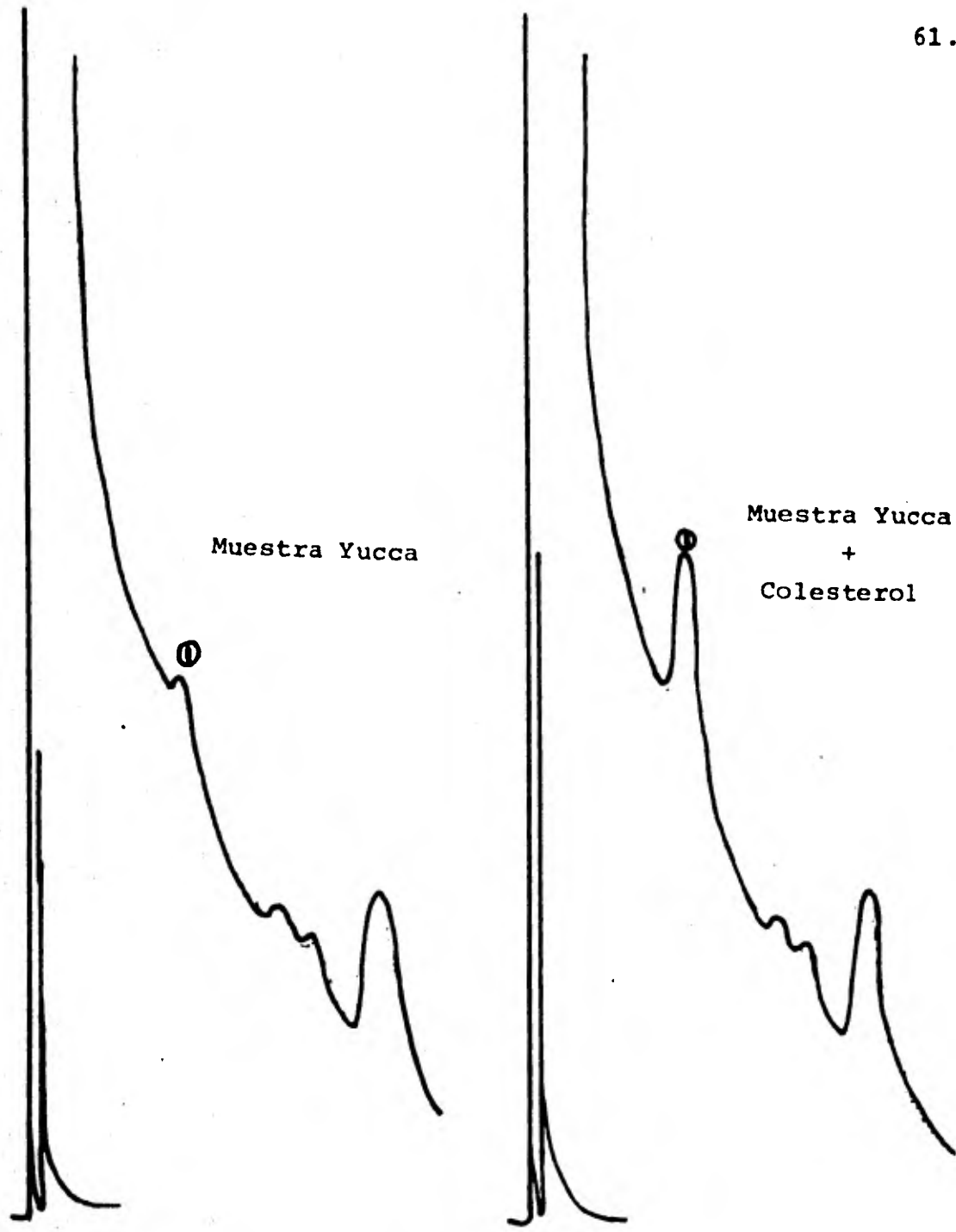
Se pesaron 100 mg de la filiferina D y se le agregó 25 ml de agua destilada, más 0.3 ml de HCl, esta saponina se disolvió completamente y se colocó a reflujo a la temperatura del baño de vapor (tiempo = 0). A los 15 min la solución se puso turbia, a los 30 min la solución sigue turbia pero no hay todavía sólidos, a los 45 min se observan unos sólidos blancos en pequeña cantidad. La solución es extraída varias veces con cloroformo en un embudo de separación. La extracción clorofórmica se concentró a vacío y se sometió a cromatografía en placa

fina comparandolas con filiferinas A y B identificandose así:

Sarsasapogenina, Galactosil-sarsasapogenina, y filiferinas B y D.

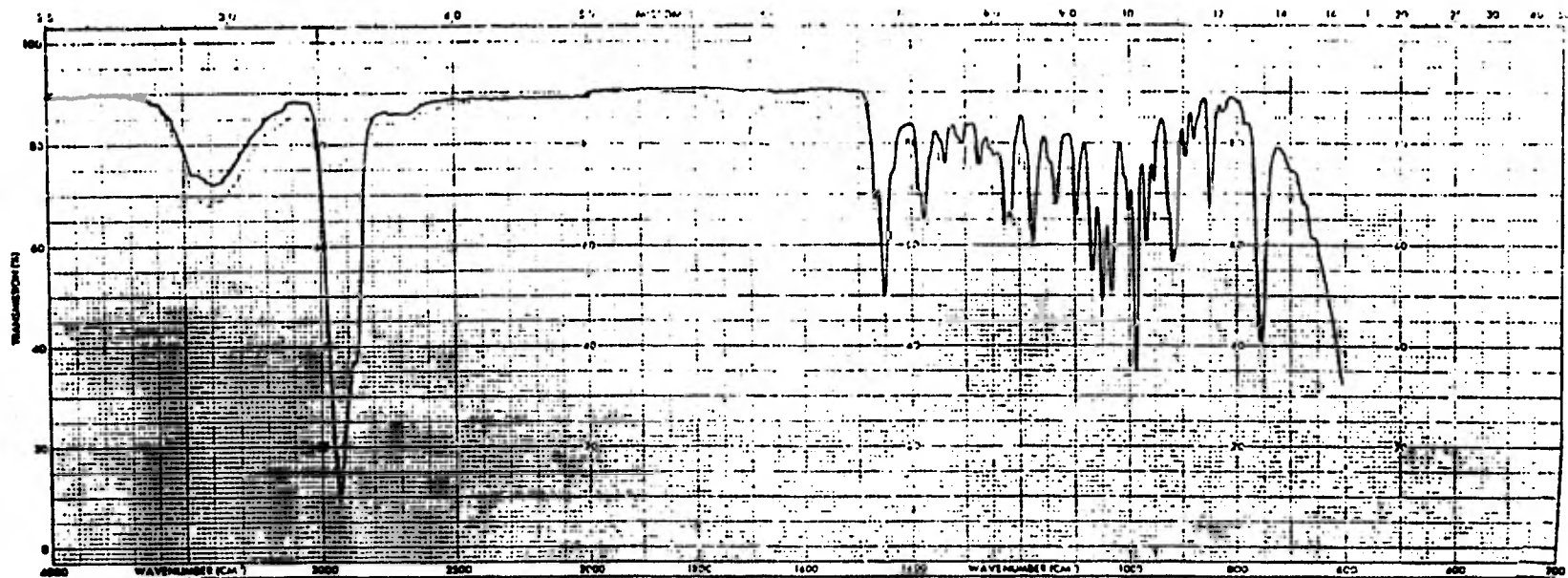
Estas saponinas fueron identificadas por cromatografía en placa fina Comparandolas con mezclas de filiferinas A y B, además con los rf reportados por Hosttetman¹⁵. Los eluyentes de las placas fueron cloroformo/metanol/agua 65:35:10 V/V (capa inferior). Los rf son los siguientes Galactosil-sarsasapogenina (rf 0.83); filiferina B (rf 0.63); filiferina D (rf 0.38).

VI. ESPECTROS



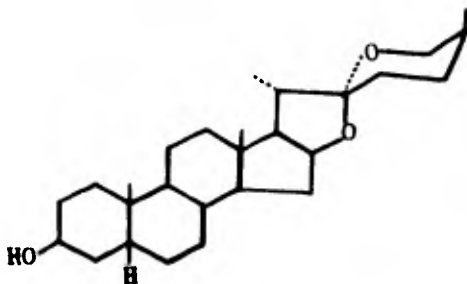
CROMATOGRAMA # 1

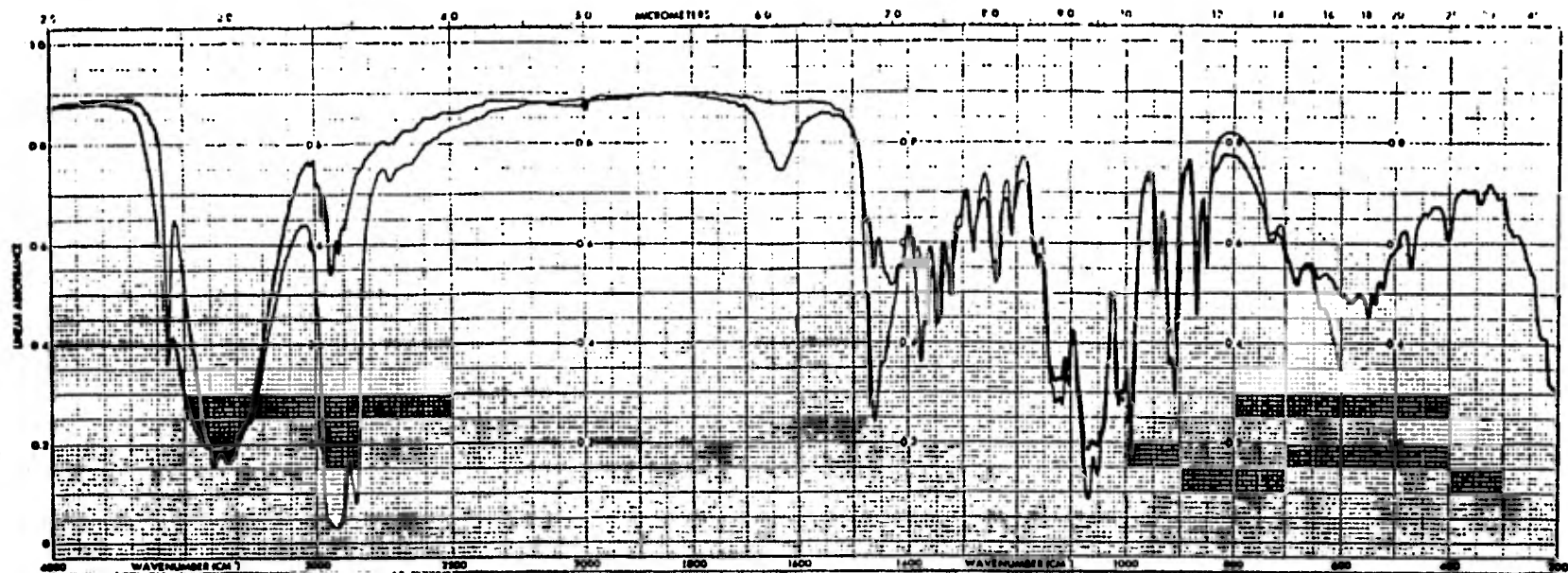
COLESTEROL



ESPECTRO # 2

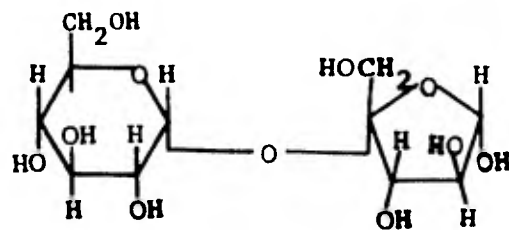
SARSASAPOGENINA

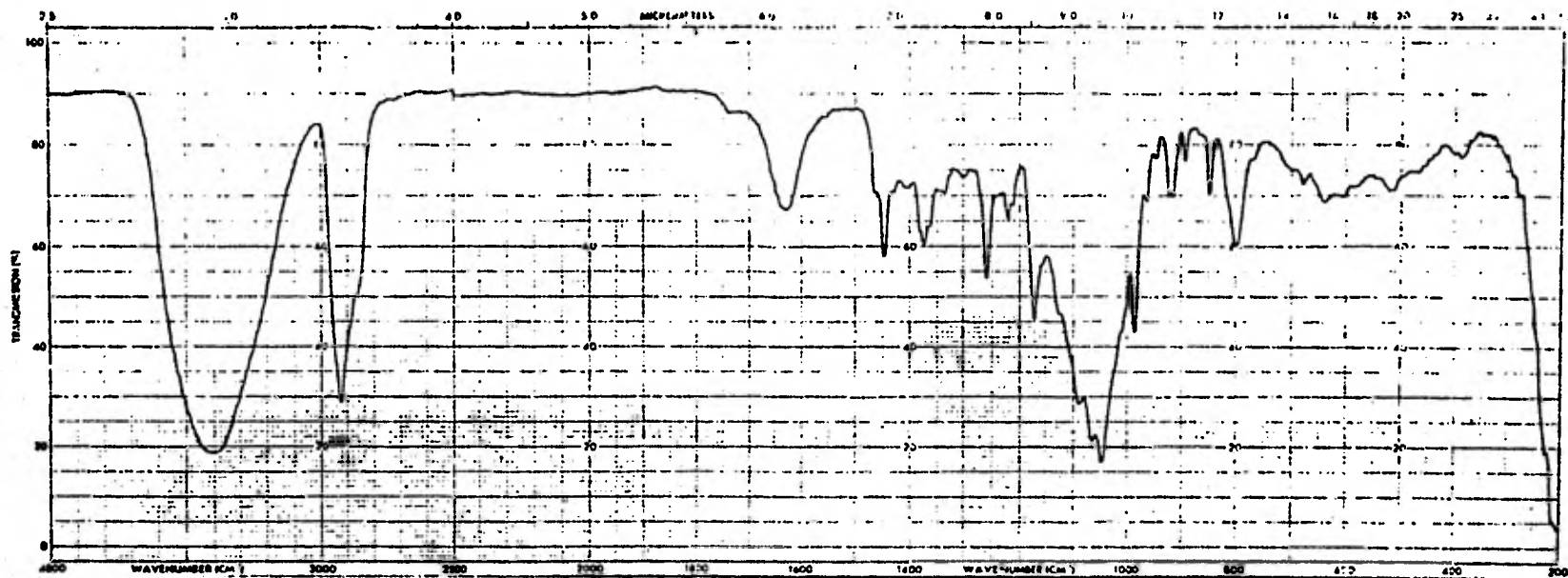




ESPECTRO # 3

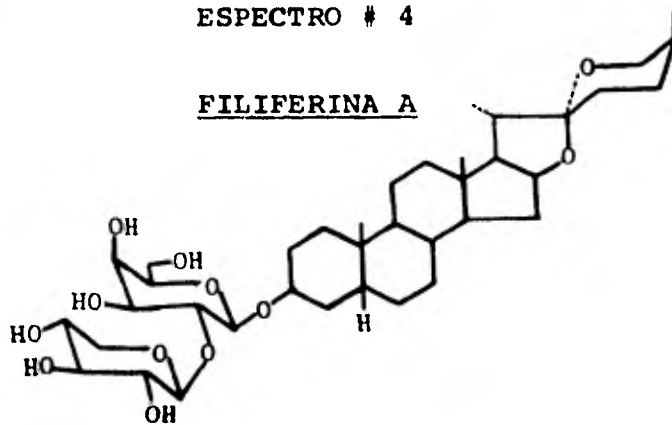
SACAROSA

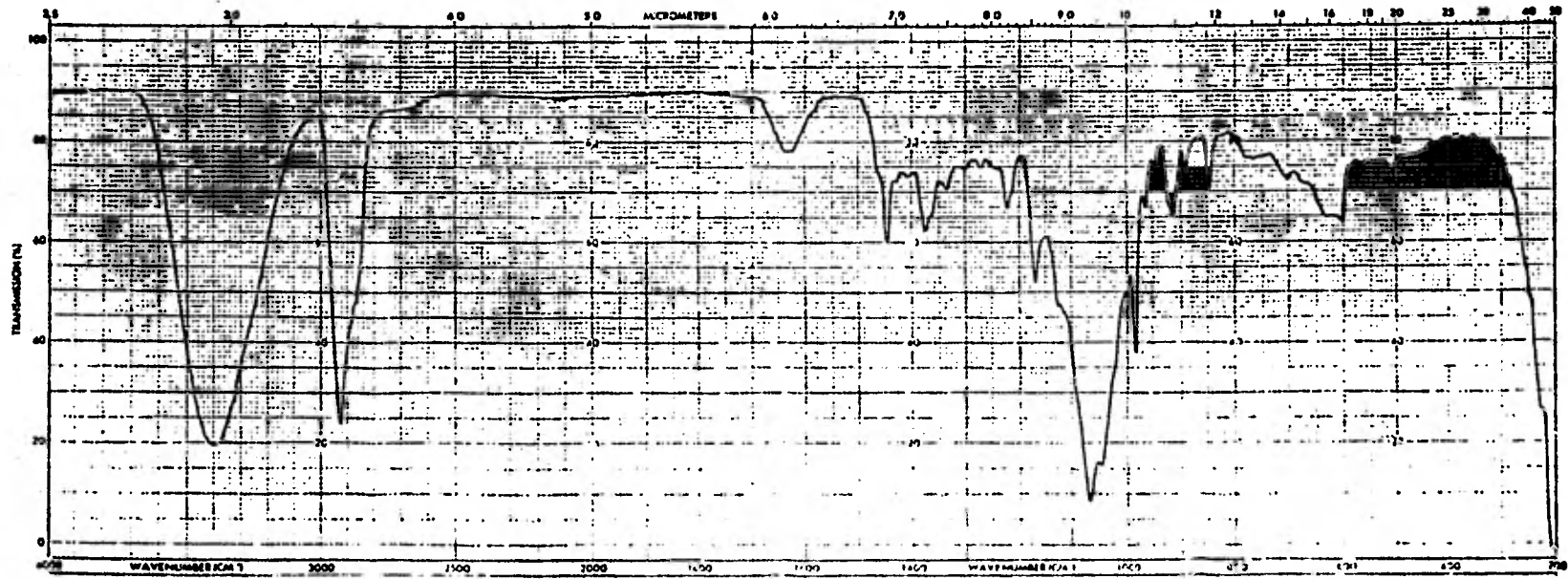




ESPECTRO # 4

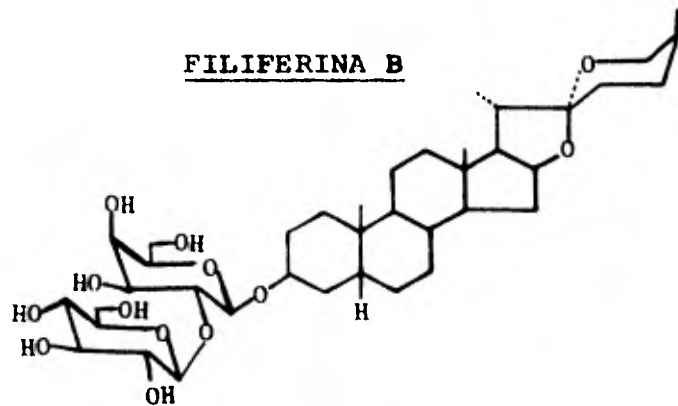
FILIFERINA A

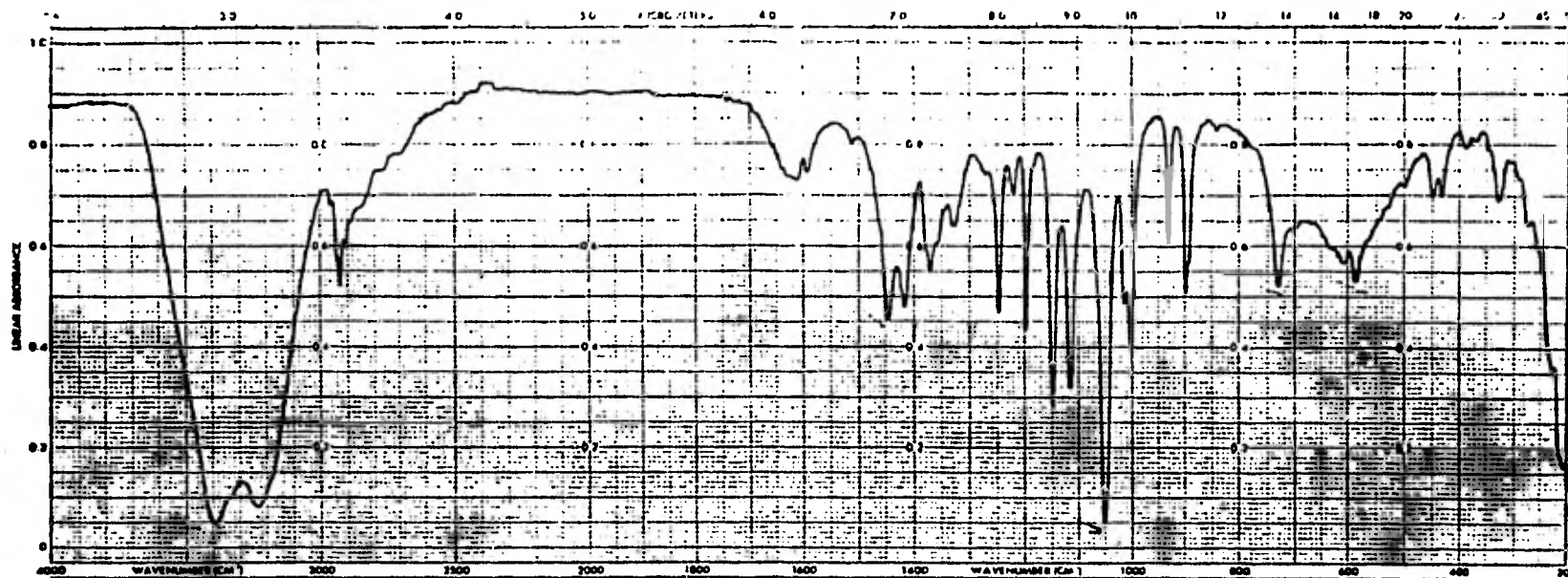




ESPECTRO # 5

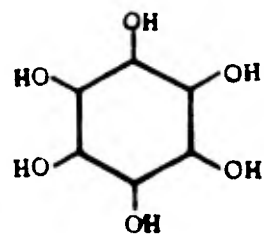
FILIFERINA B

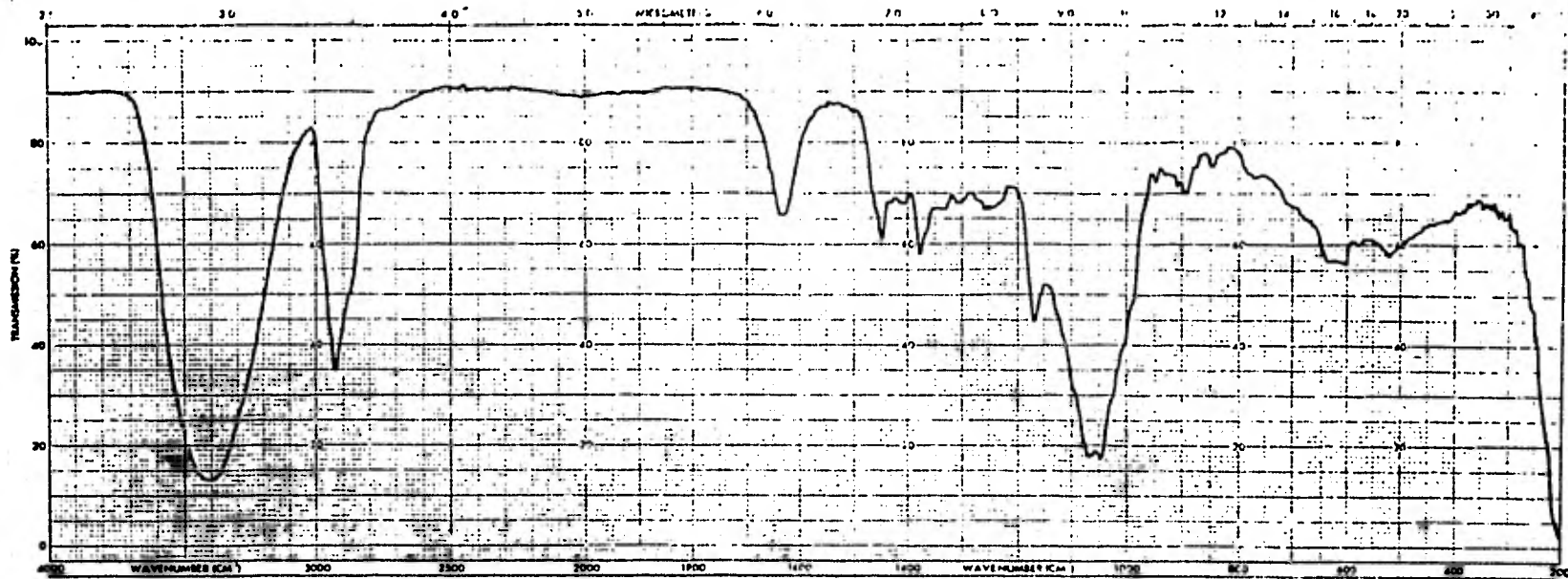




ESPECTRO # 6

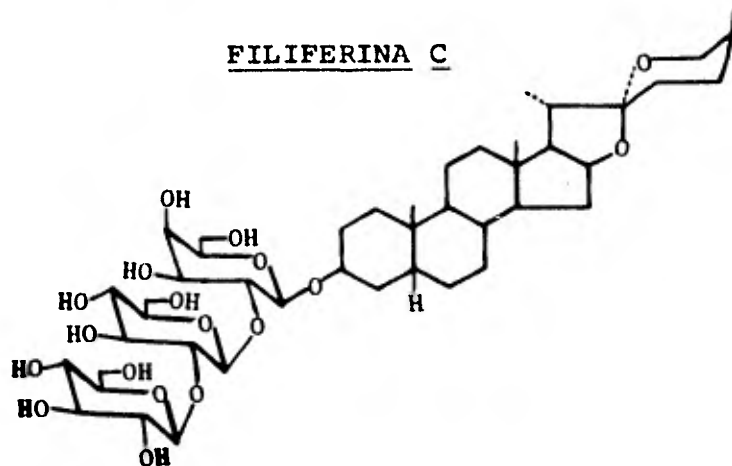
INOSITOL

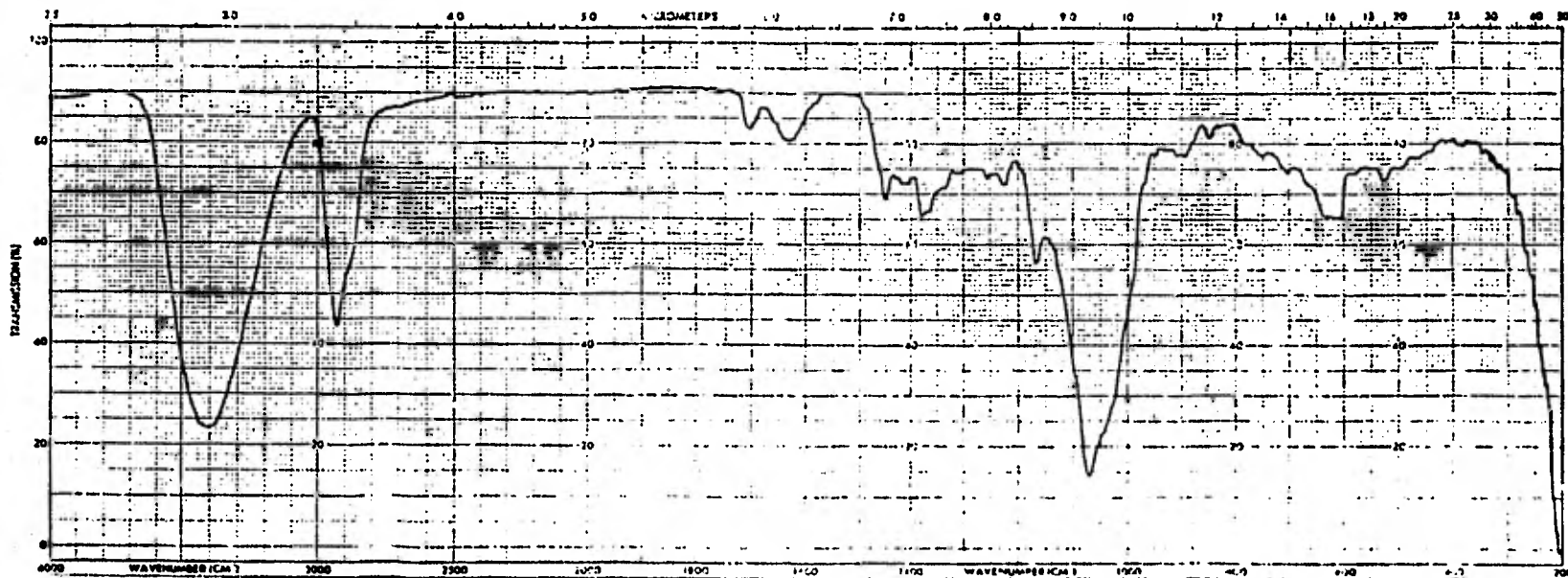




ESPECTRO # 7

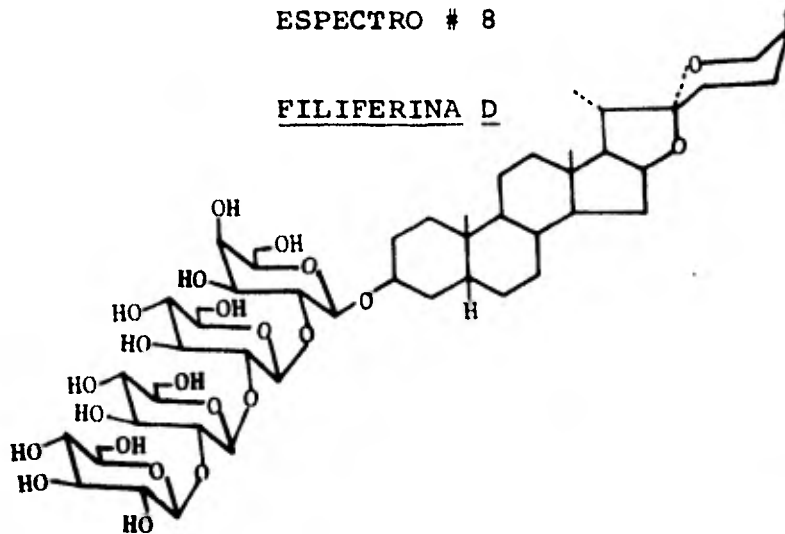
FILIFERINA C





ESPECTRO # 8

FILIFERINA D



VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Matuda E. y Piña L., Cactaceas Suculentas Mexicanas. - Tomo XXII No. 3, Julio-Septiembre (1977).
2. Martinez Maximino, Plantas Utiles de México, p 236. Ed. Botas (1936).
3. Marker R. and Rorhmann E.; J. Am. Chem. Soc., 61 846 (1939).
4. Marker R., Wagner R., Ulshafer P., and Ruof C.; J. Am. - Chem. Soc., 65 1199 (1943).
5. Wall M. and Fenske C.; Econ. Bot., 15 131 (1961).
6. Bastida Urrutia L., Polinización de Yucca filifera por la Tegeticula mexicana, (tesis) Fac. de Ciencias UNAM (1962).
7. Romo de Vivar A., Arreguín B., Camacho R., Ortega A., Guerrero C., Castillo M.; Rev. Latinoamer. Quím., 5 240 (1974).
8. Klaine W., Chemistry of Steroids Ed. C.E.C.S.A. (1970).
9. Pavia Lampman.; Practics of Chemistry Organic. Ed Mc. - Graw-Hill Book Company (1975).
10. Fieser F. and Fieser M.; Steroids, Ed. Reinhold Publishing Corp., New York (1959).
11. Florkin B.; Comprehensive Biochemistry, Section II, Vol 10 Sterols, Bile acids and Steroids. Ed Elsevier (1963).
12. Roberts J. Caseiro M; Principic Basic Organic p 310 (1969). Fondo Educativo Interamericano (1974).

13. Dominguez X.; Metodos de Investigación Fitoquímica. -
Ed. Limusa, México (1973).
14. Nakanishi K., et. al., Natural Products Chem. Vol 1, Cap.
Steroids. Ed Academic Press Inc., Tokio Japan (1974).
15. Hosttetmann K., Hostteman-Kaldas M., and Nakanishi K., -
Helvetica Chimica Acta, 61 1990 (1978).
16. Wall M., Krider M., Rothman E. and Eddy C.; J. Biol. Chem.
Vol. 198 533 (1952).
17. Jacobsohn G and Frey M.; Arch. Biochem 127 655 (1968).
18. Ibid., J. Am Chem. Soc. 87 3224 (1965).
19. Bennett R. and Heftamn E.; Phytochemistry 4 577 (1965).
20. Cornforth J., Cornforth R., Donniger C., Frochielli C.,
and Caspi E.; J. AM. Chem. Soc. 87 3224 (1965).
21. Richards J. and Hendrickson J.; The biosynthesis of Steroids
Terpenes and Acetogenins. Ed W.A. Benjamin (1964).
22. Ishii H., Seo S., Tori K., Tozyo T. and Yoshimura Y.; -
Tetrahedron Letters 14 1227 (1977).
23. Tori K., Ishii H., Wolkowski Z., Sangaré M., and Lukacs G.
Tetrahedron Letters 13 1077 (1977).
24. Yamasaki K., Kohda H., Kobayashi T., Kasai R., and Tanaka
Tetrahedron Letters 14 1005 (1976).
25. Eggert H. and Djerassi C.; Tetrahedron Letters 42 3635 (1975)
26. Romo de Vivar A., Lemieux R., Ratcliffe R., Arregín B., and
Castillo M., Carbohydrate Research 55 113 (1977).

27. Piña l., Cact. Suc. Méx, Tomo XIX, No. 1 enero-marzo (1974)
28. Romo de Vivar A., Estudio de Yuccas. Inst. de Quím. (1974) .
29. Tschesche R. and Wulff G., Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, 30 462 (1973) .
30. The Sadtler Research Laboratories 1962 Philadelphia. espectro 8659 para Sacarosa.
31. Lenhinger H. Biochemistry Ed. Salvat (1979) .
32. The Sadtler Research Laboratories. Standar Infrared Grating Spectra. Espectro 1060 para Inositol.
33. Banerji N. ; J. Indian Chem. Soc., 57 (1980) p 417
34. Practical Chromatography C. Brimley and C. Barret 118 , Ed. Chapman & Hall (1954) .
35. Practical Chromatography, C. Raadsvel & Klomp 120 (1959) .