



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores CUAUTITLAN

**OBTENCION DE DIOSGENINA A PARTIR DE LAS SAPONINAS
DEL BARBASCO MEDIANTE UN PROCEDIMIENTO
BIOTECNOLOGICO**

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

OSCAR RUBEN GARCIA CORREA



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 está 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.

INDICE

Indice de tablas, figuras, fotografías y cromatogramas.	II
Resumen	1
I. Antecedentes.	
I.1. Aspectos económicos de la producción de barbasco, diosgenina y esteroides.	3
I.1a. Estudio de mercado para la diosgenina y sus derivados.	5
I.2. Generalidades e importancia de los esteroides.	24
I.3. Generalidades de los procesos biotecnológicos.	32
I.4. Introducción a la biotecnología de los esteroides.	34
I.5. Generalidades y descripción del barbasco.	38
I.6. Antecedentes experimentales.	41
II. Objetivos.	43
III. Materiales.	44
IV. Métodos.	
IV.1. Descripción de medios de cultivo.	48
IV.2. Descripción de los microorganismos.	48
IV.3. Preparación de suspensión de esporas.	49
IV.4. Determinación del volumen para inóculo.	49
IV.5. Descripción de los sistemas de fermentación.	50
IV.6. Preparación del fermentador.	51
IV.7. Calibración e inoculación del fermentador.	51
IV.8. Obtención de sólidos.	52
IV.9. Extracción de sólidos.	52
IV.10 Extracción de sobrenadantes.	53

IV.11. Condiciones de la cromatografía en capa fina.	56
IV.12. Condiciones de la cromatografía de gases.	56
IV.13. Cálculo del contenido de diosgenina en por ciento según C.de G.	57
IV.14. Purificación en columna.	59
IV.15. Cristalización y recristalización.	60
IV.16. Hidrólisis ácida.	61
V. Resultados.	
V.1. Selección de la cepa de trabajo.	64
V.2. Fermentación en 10 l.	74
V.3. Elección del pH.	75
V.4. Condiciones de aereación.	75
V.5. Condiciones de agitación.	76
V.6. Efecto de la esterilidad previa.	76
V.7. Extracción de sobrenadantes.	84
V.8. Extracción de sólidos.	85
V.9. Purificación por cromatografía en columna	88
V.10. Cristalización (cálculo de rendimientos).	97
VI. Discusión.	101
VII. Conclusiones.	106
VIII. Bibliografía.	108

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Capacidad instalada de la industria de esteroides	6
Tabla 2. Consumo de harina de barbasco.	7
Tabla 3. Productores de esteroides hasta 1978	9
Tabla 4. Participación de la diosgenina mexicana en la producción mundial de hormonas.	12
Tabla 5. Importación mundial de hormonas.	14
Tabla 6. Importación de hormonas esteroides en México.	16
Tabla 7. Producción de diosgenina en México.	18
Tabla 8. Países productores de materias primas para la síntesis de hormonas esteroides.	21
Tabla 9. Exportaciones de hormonas esteroides de México.	22
Tabla IV.11.1. Gradiente de polaridad para la cromatografía en columna.	59
Tabla V.1.1. Comparación cualitativa de las cepas probadas.	66
Tabla V.6.1. Efecto de la esterilidad previa.	77
Tabla V.10.1. Diferencias entre los procedimientos de hidrólisis ácida y enzimática.	100

INDICE DE FIGURAS

		Pag.
Figura 1	Ciclopentano perhidro fenantreno	24
Figura 2	Colestanol	24
Figura 3	Conformación estructural del co- lestanol	26
Figura 4	Conformación de sustituyentes en C-5	27
Figura 5	Conformación de sustituyentes en C-3	27
Figura 6	Estructura de la diosgenina	29
Figura 7	Rutas de conversión de esteroi- des	37
Figura 8	Estructura de las saponinas	40
Figura 9	Jarra de fermentación New Bruns- wick	54
Figura 10	Panel de fermentación New Bruns- wick M-19	55
Figura 11	Diagrama de procedimiento (dia- grama de bloques)	63

INDICE DE FOTOGRAFIAS (Cromatografía en capa fina) y CROMATOGRAMAS (Cromatografía de gases)

Fotografía V.1.1.	Producto del <u>A. terreus</u> ATCC- 1012	67
Fotografía V.1.2.	Producto del <u>A. terreus</u> NRRL- 265	67
Fotografía V.1.3.	Producto del <u>Aureobasidium sp</u> (H-18)	67
Fotografía V.8.1.	Producto de fermentación F-6	86
Fotografía V.8.2.	Producto de fermentación F-7	86
Fotografía V.8.3.	Producto de fermentación F-8	86
Fotografía V.8.4.	Producto de fermentación F-9	87
Fotografía V.8.5.	Producto de fermentación F-10	87
Fotografía V.8.6.	Residuos de la hidrólisis ácida	87

Cromatograma V.1.4.	Estandar de diosgenina y colestano	68
Cromatograma V.1.5.	Producto del <u>A. terreus</u> ATCC-1012	69
Cromatograma V.1.6.	Identidad del producto obtenido del <u>A. terreus</u> ATCC-1012	70
Cromatograma V.1.7.	Producto del <u>A. terreus</u> NRRL-265	71
Cromatograma V.1.8.	Producto del <u>Aureobasidium</u> sp	72
Cromatograma V.1.9.	Identidad del producto obtenido del <u>Aureobasidium</u> sp	73
Cromatograma V.6.1.	Fermentación F-7 (no estéril)	78
Cromatograma V.6.2.	Fermentación F-8 (no estéril)	81
Cromatograma V.6.3.	Fermentación F-9 (estéril)	82
Cromatograma V.6.4.	Fermentación F-10 (estéril)	83
Cromatograma V.9.1.	Composición de un residuo de fermentación (F-6) antes de purificación por columna	90
Cromatograma V.9.2.	Composición de un residuo de fermentación (F-6) purificado	91
Cromatograma V.9.3.	Composición de un residuo de hidrólisis ácida antes de purificación por columna	92
Cromatograma V.9.4.	Composición de un residuo de hidrólisis ácida purificado	93
Cromatograma V.9.5. (a.b.c.)	Perfil de evolución de cromatografía en columna de residuos de hidrólisis ácida	94

RESUMEN

En la actualidad una de las ciencias que ha cobrado más importancia debido principalmente a las posibilidades de aplicación y desarrollo científico, social y económico, es la biotecnología gracias a la cual se han podido aprovechar a diversos microorganismos para obtener productos útiles al hombre y su ambiente. Dentro de las aplicaciones -- más importantes que ha tenido la biotecnología, han sido -- las biotransformaciones de esteroides, que han hecho posible la reducción de los costos de varios procesos para la síntesis de hormonas de este tipo.

Una de las principales materias primas para la síntesis de hormonas esteroides es la diosgenina que se encuentra de forma natural en ciertos vegetales asociada a diversos azúcares formando las llamadas saponinas; esta asociación química, se caracteriza por tener una unión glucosídica, susceptible de ser hidrolizada por las enzimas producidas por varias especies de hongos, por lo que se ha propuesto la posibilidad de desarrollar un proceso a nivel de laboratorio que pruebe la factibilidad de aplicar un proceso biotecnológico para la obtención de diosgenina.

Se presentan los resultados obtenidos al utilizar una cepa que mostró tener mayores rendimientos en la producción de diosgenina, los cuales indican la posibilidad de llevar a cabo esta hidrólisis; sin embargo, es necesario optimizar y estudiar más detalladamente algunos factores como las condiciones de la materia prima, que es el barbasco; los facto

res relacionados con la eficiencia y estabilidad genética del microorganismo y los métodos de purificación a partir del medio de fermentación.

I. ANTECEDENTES

I.1. Aspectos económicos de la producción de barbasco, diosgenina y esteroides.

El barbasco es un producto natural renovable del que se extrae la principal materia prima para la síntesis de hormonas esteroides que es la diosgenina.

México ocupó hasta 1974, el primer lugar en la producción de materias primas para la síntesis de esteroides a nivel mundial (1). La producción de estas materias primas se basa en la extracción de diosgenina a partir del barbasco, cuya explotación y comercialización esta controlada en la actualidad por la empresa paraestatal Proquivemex, S.A., la cual organiza la producción de diversas zonas barbasqueras del país, cerca de las cuales existe un "beneficio" en el que el barbasco es procesado hasta convertirse en harina de barbasco, la cual es distribuida así, a las diversas empresas productoras de esteroides, las que extraen de dicha harina a la diosgenina y que usan para la síntesis de algunos compuestos intermedios y/o finales con actividad farmacológica.

El estudio del aspecto económico de la explotación y comercialización del barbasco y diosgenina deja ver algunos problemas, principalmente en lo que se refiere a políticas y organización (4), lo que ha llevado a una situación crítica a la industria mexicana de esteroides, habiendo perdido en la actualidad, gran parte del mercado internacional, ya que los problemas internos han traído como consecuencia la disminución de la producción, no llegando a satisfacer la demanda del mer

cado internacional, el cual ante dichas circunstancias, ha tenido que recurrir a la búsqueda de fuentes alternativas para la obtención de esteroides primarios en sustitución de la diosgenina.

En 1978, el mundo utilizaba anualmente de 1000 a 2000 toneladas de materias primas para la producción de esteroides, con un valor en el mercado mundial de alrededor de 300 millones de dólares (6). En México la cantidad de harina de barbasco necesaria para satisfacer la demanda de las industrias oscila entre las 5000 y 9000 toneladas al año; habiendo sido para el año de 1983 de aproximadamente 5,500 toneladas (7).

El precio por kilogramo de harina de barbasco que paga Proquivemex, S.A. al beneficio es de \$135.80; mientras que el beneficio le paga al "arrancador" solo \$17.50 por Kg. de camote recolectado; este incremento en el precio, se debe al -- procesamiento que recibe el camote en el beneficio, y que consiste en el molido, fermentación y secado del camote para obtener la harina, efectuándose este proceso con la finalidad - de aumentar la concentración relativa (p/p) de diosgenina por Kg. de harina, pues Proquivemex, S.A. paga más al beneficio - mientras mayor porcentaje de diosgenina tenga la harina (8).

I.1a. Estudio de mercado para la diosgenina y sus derivados.

Este estudio tiene como objetivo, justificar cualquier proyecto que pretenda incrementar la oferta de diosgenina a nivel nacional en base a los datos que se presentan.

Hasta 1978 existían en México 6 empresas que industrializaban el barbasco para obtener diosgenina con una capacidad instalada de 21,875 toneladas anuales (tabla 1).

De este punto es necesario comentar las variaciones observadas a lo largo del periodo estudiado (1978-1983), sobretudo en lo que se refiere a las relaciones de capacidad útil y capacidad ociosa. Con el consumo de harina de barbasco (tabla 2) se puede ver, que para los años de 1979 y 1980, ocurre una drástica disminución en el consumo de harina de barbasco, lo cual para explicarse, requiere de una descripción del contexto político y económico que ha rodeado al desarrollo de la industria de esteroides en México desde su inicio, la que brevemente se podría resumir de la siguiente manera:

A raíz del descubrimiento de los efectos benéficos de ciertos esteroides como la hidrocortisona, sobre el tratamiento de enfermedades como la artritis reumática, se promovió la búsqueda de fuentes que pudieran servir para satisfacer la creciente demanda de dichos productos.

TABLA 1. CAPACIDAD INSTALADA DE LA INDUSTRIA DE ESTEROIDES

Empresa	Capacidad instalada toneladas anuales	%
Beisa	1,450	6.82
Diosynth	2,325	10.62
Proquina	6,250	28.59
Searle	3,600	16.45
Syntex	2,750	12.58
Steromex	2,500	11.42
Proquivemex	3,000	13.72
T o t a l	21,875	100.00

Fuente: (2)

CUADRO 2. CONSUMO DE HARINA DE BARBASCO

Año	Cap. Inst.	Consumo de harina Tons.	Cap. Útil Tons. %	Cap. ociosa Tons. %
1978	21,875	5,706	26.08	71.92
1979	21,875	1,885	8.61	91.31
1980	21,875	1,390	6.35	93.65
1981	21,875	2,873	12.95	87.05
1982	21,875	4,316	19.73	80.27
1983	21,875	6,000	27.43	72.57

Fuente: (2)

Se comenzó por la extracción a partir de glándulas animales, y el desarrollo de procesos de síntesis total, pero dichos procesos resultaron ineficientes y poco rentables cuando se encontró que ciertos vegetales los contenían en cantidades mucho mayores, resultando que dichas especies vegetales se encontraban distribuidas ampliamente en diversas zonas del territorio nacional; se inició entonces, un periodo de investigaciones que concluyó en la creación de los laboratorios Syntex, S.A. de origen estadounidense, los cuales gozaron de gran apoyo por parte del gobierno mexicano, protegiéndoles contra otras compañías por medios fiscales, con lo que lograron crecer rápidamente y llegar a monopolizar prácticamente el mercado nacional e internacional de esteroides (hormonas), dándole a México entre los años de 1945 a 1955 la primacía mundial en dicho mercado; sin embargo, en 1965 la empresa cambia de dueño perdiendo la posición privilegiada que gozaba, -- abriendo así las puertas para el advenimiento de nuevas empresas competidoras que serían filiales de otras empresas transnacionales (Tabla 3), siendo en un principio 9.

La aparición de estas empresas dió como consecuencia una competencia muy fuerte entre ellas, en virtud de la cual, sobreexplotaron el barbasco durante más de 25 años, llegando a originar problemas en relación a la calidad del barbasco recolectado y a las condiciones que imponían

TABLA 3. PRODUCTORES DE ESTEROIDES HASTA 1978

Filial en México	Matriz	Origen
Steromex, S.A.	Ciba-Geigy	E.E.U.U.
Beisa, S.A.	Shering Co.	E.E.U.U.
Syntex, S.A.	Syntex	E.E.U.U.
Proquina, S.A.	Shering AG.	Alemania
Diosynth, S.A.	Organón	Holanda
Searle de México, S.A. de C.V.	Searle	E.E.U.U.

Fuente: (5)

a los campesinos. El barbasco empezó a ser recolectado antes de tiempo manifestando una disminución de los rendimientos de diosgenina; y por otra parte, las condiciones del campesino empeoraban cada vez más. Ante estas circunstancias, la producción de esteroides empezó a decaer, disminuyendo la participación de México en el mercado internacional.

Ante esta situación, el gobierno mexicano, en 1975, formula la creación de la empresa Proquivemex, S.A. con el objeto de que sea quien administre todas las transacciones relacionadas con el barbasco, sobre todo lo referido a explotación y precios al campesino; así como el impulso a la industria química farmacéutica nacional, con el desarrollo de investigaciones tendientes a domesticar al barbasco y alcanzar las bases tecnológicas necesarias a fin de integrar una industria nacional de esteroides autosuficiente; sin embargo, dichos objetivos no han sido alcanzados debido a múltiples factores, tales como las maniobras de las empresas transnacionales para soportar las presiones ejercidas por Proquivemex, contándose entre estas maniobras el almacenamiento de grandes cantidades de harina de barbasco, y después, el fomento a la investigación orientada hacia la búsqueda de fuentes substitutas del barbasco. Por otro lado, Proquivemex no contaba con la infraestructura tecnológica para el desarrollo de pro-

cesos que llevaran a la elaboración de productos finales y no solamente intermedios, por lo cual no fué capaz de competir contra dichas empresas, ocasionando el colapso de este mercado.

Comportamiento de la demanda.

La demanda de la diosgenina solo puede ser estudiada indirectamente, a través de la demanda de barbasco a partir del cual es obtenida. En este punto se puede recurrir a los datos de la Tabla 2. donde se establece la capacidad útil aplicada por año por las industrias productoras de esteroides en México.

La demanda a nivel internacional se puede deducir del análisis de los datos sobre el grado de participación como materia prima en la producción de hormonas esteroides en relación a fuentes alternas. Tabla 4.

Los datos anteriores pueden tomarse como un indicador de la demanda creciente de los distintos productos intermedios, los cuales se relacionan directamente con los productos finales, cuya demanda podría incrementarse si se encuentran nuevas aplicaciones para los productos ya existentes o nuevos derivados con efectos diferentes.

La demanda de diosgenina se puede seguir indirecta-

TABLA 4. PARTICIPACION DE LA DIOSGENINA MEXICANA EN LA PRODUCCION MUNDIAL DE HORMONAS.

Año	Prod. Mundial de hormonas (Tons.)	Participación de la diosgenina mexicana en la prod. mundial	
		absoluta	relativa †
1978	2,080	256.8	12.3
1979	2,300	84.8	3.7
1980	2,631	62.6	2.4
1981	3,011	127.5	4.2
1982	3,445	194.2	5.6
1983	3,942	270.1	6.9

Fuente: (2)

mente por medio del análisis de la producción mundial de esteroides que utilizan a la diosgenina o compuestos similares como materias primas. La producción mundial de esteroides ha crecido más o menos a un ritmo sostenido con una tasa de crecimiento de alrededor del 14% anual a partir de 1979, lo que refleja la potencialidad del mercado para estimular la producción de materias tales como la diosgenina. Tabla 4.

El análisis de las cifras de producción de diosgenina hacen ver claramente el efecto tan brusco que originó el problema administrativo de Proquivemex, encontrándose un mínimo de producción para el año de 1980, que coincide con el nivel de participación de la diosgenina en la producción mundial de esteroides. Como ya se mencionó, esto fué una de las causas que originaron la desconfianza del mercado internacional, en cuanto a la capacidad de México para satisfacer la demanda y dió lugar a las acciones encaminadas a la búsqueda de fuentes alternativas de estos productos, que significó en gran medida la pérdida del mercado que tenía dominado México y que ahora se presenta muy difícil de recuperar.

Los volúmenes de importación de los principales países importadores de esteroides representan una panorámica del mercado internacional, el cual es cada día mayor y habla directamente de la demanda de esteroides y por

TABLA 5. IMPORTACION MUNDIAL DE HORMONAS

Año	Total (miles de dolares)
1977	486087
1978	526215
1979	597279
1980	641864
1981	668343

Principales países importadores: Italia, Japón, Francia, E.U., Alemania, España, Inglaterra y Brasil.

Fuente: (30)

lo tanto de materias primas para su síntesis. Tabla 5.

La tasa de crecimiento de la demanda ha variado en cuanto al valor, entre un 10 hasta un 4% anual, manteniendo un ritmo irregular, pero que puede predecirse en ascenso - constante durante el mediano plazo, en vista de la naturaleza de los productos esteroides que son de amplia aplicación y que deberán seguirse produciendo cada vez en mayores cantidades, conforme aumente la población mundial, especialmente en latinoamérica y el tercer mundo.

El estudio del curso de las importaciones nacionales de hormonas esteroides también puede ser un indicador de las condiciones en que se desenvuelve el mercado a nivel nacional. Tabla 6.

En el año de 1978 se tiene el máximo volumen de importaciones con 5.8 toneladas, siendo este año excepcional en comparación del año anterior y los siguientes, en los cuales se puede apreciar una evolución irregular pero que tiene de modo general a la disminución del volumen; esta excepción es debida probablemente a un efecto de la mala administración, que condujo a incrementar el volumen de materias primas importadas, pues no eran suficientes las producidas en ese entonces para satisfacer la demanda de las industrias productoras de esteroides en el país; lo anterior se puede apreciar más claramente a partir de los datos de valor por tonelada en los que para el año de 1978, se presenta el menor valor por tonelada, que obviamente corresponde a productos de menor valor agregado como lo son las materias primas y no productos finales.

TABLA 6. IMPORTACIONES DE HORMONAS ESTEROIDES EN MEXICO

Año	Vol. Tons.	% Año base	Valor (dls.)	% Año base	Valor/Ton.(dls.)
1977	1.1	100.0	697,160.00	100.0	633,681.80
1978	5.8	527.3	598,800.00	85.9	103,241.40
1979	0.5	45.5	374,320.00	53.7	748,640.00
1980	1.2	109.1	797,080.00	114.3	664,233.30
1981	1.8	163.6	986,680.00	141.5	548,155.50
1982	1.0	90.9	868,460.00	124.6	868,460.00
1983	0.9	81.8	692,650.00	99.4	769,611.10

Por otro lado, en cuanto a los años de 1979 a 1983, los volúmenes y valores de las importaciones no fluctúan grandemente, tratándose en este caso de productos de mayor valor agregado, lo cual deja ver que el problema de la industria mexicana de esteroides para elaborar productos - finales o activos, no ha sido posible resolverlo, persistiendo esto hasta la actualidad.

Comportamiento de la oferta.

La producción mundial de hormonas esteroides, utilizando a la diosgenina mexicana, tuvo su auge entre los años cincuentas y principios de los setenta, en virtud de que abastecía una parte sustancial de la demanda mundial, llegando a cubrir hasta el 90% de esta demanda; sin embargo, la producción de diosgenina y algunos derivados decayó en forma considerable por los ya mencionados problemas, para suministrar en 1976, únicamente el 8% de la demanda mundial.

La oferta de diosgenina se puede estudiar a nivel nacional directamente por la producción registrada durante los años de estudio, y que puede ser calculada a partir de la cantidad de barbasco procesado en estos años, considerando un contenido de diosgenina de 4.5% por kilogramo de harina de barbasco, las cifras se muestran en la tabla

TABLA 7. PRODUCCION DE DIOSGENINA EN MEXICO

Año	Producción Tons.
1978	256.8
1979	84.8
1980	62.6
1981	127.5
1982	194.2
1983	270.1

Fuente: (2)

Continuando con las observaciones de la Tabla 7, se puede ver que a partir de 1981, hasta el año de 1983 - existe una recuperación constante que logra superar, incluso, a la producción de 1978, lo que hace pensar que dicha recuperación puede continuar en tanto las condiciones de administración y del mercado sean favorables o al menos constantes, sobre todo sabiendo que aún no se ha utilizado el 100% de la capacidad instalada. (Tabla 2).

Por lo anterior, parece que con solo aprovechar adecuadamente la capacidad instalada y administrar eficientemente los recursos que se poseen, podría recuperarse la capacidad de oferta que requiere la demanda mundial; sin embargo, la sola producción de diosgenina es algo que no se debe buscar, pues esto solo es un signo de la dependencia tecnológica que sufre el país; pues debe buscarse el desarrollo tecnológico necesario para elaborar productos intermedios o finales con mayor valor agregado que sean capaces de incrementar la entrada de divisas al país, con cuyos beneficios podrían financiarse muchos proyectos encaminados a esa independencia tecnológica, siendo precisamente el campo de los esteroides dentro del sector que incluye a la industria químico farmacéutica uno de los que requieren mayor apoyo, dada la importancia y potencialidad económica que representan tanto a

nivel nacional como a nivel internacional.

Los proyectos encaminados a incrementar la oferta de diosgenina a nivel nacional e internacional deben considerar la participación en el mercado de otros productos similares obtenidos de diversas fuentes y que están en función de la materia prima y de las características económicas del país que las tiene, por ejemplo se pueden mencionar los productos similares en plantas silvestres como el barbasco en México, en otros países: barbasco en campos de cultivo (Guatemala, India, China y E.E.U.U.); de fuentes animales (Francia y Holanda), de petroquímicos (R.F.A. y Suiza) y de desechos como los de la soya (E.E.U.U.) Tabla 8.

La diosgenina como tal, no se importa ni se exporta; sin embargo, parecería posible tomar como un indicador de la oferta existente los volúmenes de exportación de hormonas registrados, pero se debe tener cuidado con estos números ya que parece haber una confusión en cuanto a los términos utilizados ya que muchas veces lo exportado no son hormonas sino productos intermedios que salen del país para su transformación final. Tabla 9.

Dentro de la oferta, se dice entonces, que indirectamente se puede estudiar la producción de diosgenina a través de los productos exportados, pero teniendo en cuenta

TABLA 8. PAISES PRODUCTORES DE MATERIAS PRIMAS PARA LA SINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES

País	Producto
México	Diosgenina
E.U.A.	Estigmasterol y síntesis total
Guatemala	Disogenina
Francia	Acidos biliares y síntesis total
Holanda	Colesterol, ácidos biliares y síntesis total
Africa	Hecogenina
India	Diosgenina
URSS	Solasodina
China	Diosgenina

Fuente: (31)

TABLA 9. EXPORTACIONES DE HORMONAS ESTEROIDES DE MEXICO

Año	Vol. Tons.	% al año base	Valor en miles de pesos
1977	129.6	100.0	487,190.8
1978	47.0	36.3	164,663.1
1979	25.0	19.3	106,414.9
1980	235.0	181.3	167,651.7
1981	295.0	227.6	313,482.5
1982	27.0	20.8	597,702.7
1983	31.0	23.9	1'007,655.3

Fuente: (31)

las aclaraciones anteriores, se analiza el curso de las exportaciones de hormonas y derivados esteroides. Tabla 9.

De manera general, se puede observar el perfil de evolución en los volúmenes exportados con un "baja, sube, baja", que solo coincide en parte con los datos de producción de diosgenina, lo cual parece indicar que ya se están produciendo realmente hormonas para satisfacer la demanda interna, de lo cual no se dispone de datos.

I.2 Generalidades e importancia de los esteroides.(10).

Este extenso grupo de compuestos tiene alguna relación estructural con los terpenos. La diversidad de su actividad fisiológica lo hace uno de los grupos más estudiados entre los productos biológicos. Sus miembros tienen una estructura básica al ciclopentano-perhidrofenantreno, constituido por tres anillos de ciclohexano unidos y dispuestos de forma no lineal, correspondiendo a la disposición del fenantreno y un anillo terminal de ciclopentano.

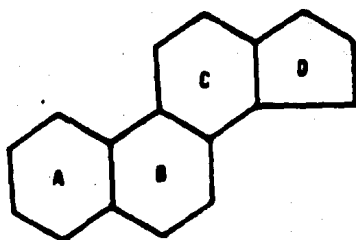


Figura 1. ciclopentanoperhidrofenantreno

Se pueden considerar ciertas características generales de este grupo, con referencia a un miembro típico: el colestanol.

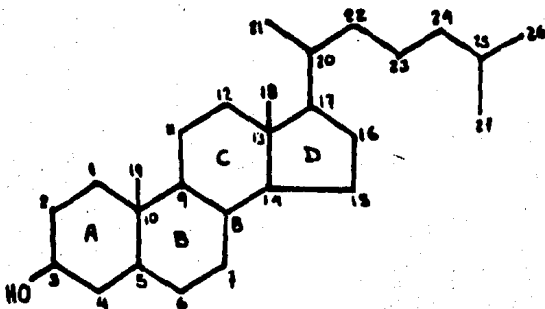


Figura 2. Colestanol

Se observa que cada anillo está completamente saturado. Cuando existen dobles enlaces en estas fórmulas se indican específicamente. Con respecto a esta fórmula se pueden señalar ciertas características de aplicación general. La existencia de un sustituyente oxigenado en el carbono 3, es una característica común en casi todos los esteroides naturales. Sobre los átomos de carbono 10 y 13 hay grupos metilo "angulares" señalados con los números 18 y 19. Es ésta también una característica general. Sin embargo, en los estrógenos, el anillo A es aromático y en estas condiciones el átomo de carbono 10 no lleva grupo metilo. Puede haber un sustituyente alifático en el átomo de carbono 17. Este sustituyente sirve como base para la clasificación de los esteroides, agrupándose de acuerdo con el número de átomos de carbono de esta cadena lateral. - Así, en los esteroides hay 8, 9 o 10 átomos de carbono, 5 en los ácidos biliares, 2 en los esteroides corticales de la adrenalina y la progesterona y ninguno de los estrógenos y andrógenos naturales.

Conformación y consideraciones estéricas. La representación conformacional del colestano⁴ indica que la molécula es rígida. Las letras pequeñas de la fórmula (a) y (e) se refieren a sustituciones axiales o ecuatoriales, respectivamente. No se han representado en la figura todos los átomos de hidrógeno; algunos de ellos se indican por líneas continuas o punteadas. La conformación en silla del ciclohexano es más estable que la de bote. En el colestanol los anillos B y C es

*figura 3.

tán dispuestos rígidamente en la conformación en silla, por las uniones trans a los anillos A y D. El anillo A es libre de asumir la forma de bote, pero la inestabilidad asociada con la forma de bote del mismo ciclohexano se potencia por una fuerte interacción entre los grupos metilo e hidroxilo de las posiciones C-10 y C-3.

En el colestanol hay nueve centros de asimetría en la molécula, estando éstos en los átomos de carbono 3, 5, 8, 9, 10, 13, 14, 17 y 20. En la representación estructural del esteroide, los sustituyentes que están orientados en β (de - - frente) se indican por una línea continua; los que están orientados en α (detrás) se representan por una línea punteada. Así los grupos metilo angulares en los átomos de carbono 10 y 13 están orientados en β , como lo está también el hidroxilo en 3, el hidrógeno en 8 y la cadena lateral en 17.

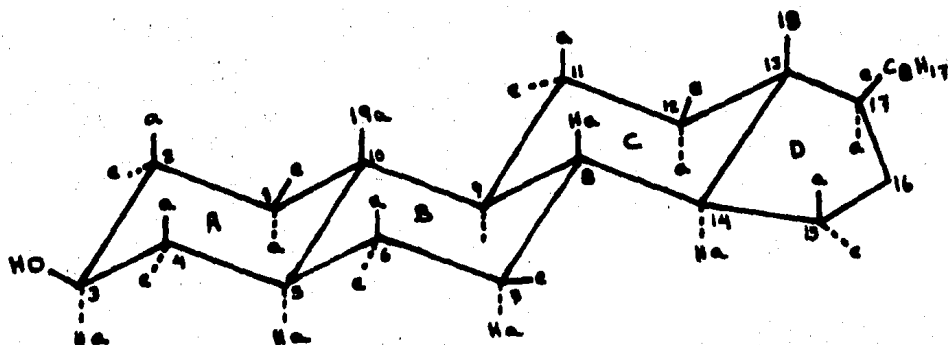
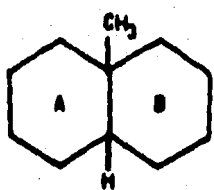


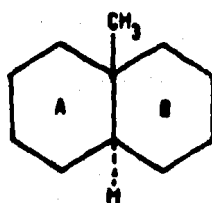
Figura 3. Conformación estructural del colestanol

Las dos posiciones de asimetría justifican que un átomo de hidrógeno del C-5 puede estar, bien al mismo lado del plano de la molécula que el grupo metilo del C-10 o en el lado opuesto. En el primer caso, los anillos A y B estarán en posición cis, uno con respecto al otro, y la molécula se dice entonces que tiene una configuración "normal". Si el hidrógeno y el metilo se encuentran en lados opuestos los anillos A y B son trans, uno con respecto al otro, y la molécula se dice que tiene la configuración "alo".

Figura 4.



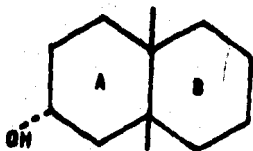
A/B cis normal



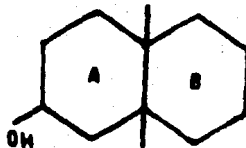
A/B trans alo

El grupo hidroxilo del carbono 3 puede orientarse de forma similar en α o en β .

Figura 5.



alfa-OH



beta-OH

Sapogeninas. Las sapogeninas son esteroides de 27 átomos de carbono con una cadena lateral de tipo espirocetal, que se encuentran en las plantas en forma de glucósidos llamados saponinas, las cuales tienen ciertas características fisicoquímicas: son solubles en agua y etanol pero no en éter, algunas de ellas pueden formar complejos con otros esteroides 3- β -hidroxilados. Las soluciones acuosas forman espuma fácilmente debido a que éstas reducen la tensión superficial del agua. Las saponinas pueden provocar la hemólisis.(11).

Las saponinas pueden ser hidrolizadas por ácidos o enzimas dejando las sapogeninas libres. Dado que la mayoría de estas últimas son considerablemente estables, rara vez se encuentran las dificultades originadas en la producción de derivados, tan comunes en el caso de los aglicones cardíacos.(11)

La mayoría de los estirostanos pertenecen a la serie 5α si bien una minoría importante poseen la configuración 5β y también son comunes los compuestos insaturados en 5, especialmente la diosgenina, que es, en este caso, nuestro punto de estudio.

En las sapogeninas pueden encontrarse grupos hidroxilo en los carbonos 2, 6, 12 y 15. El estirostano o grupo espirocetal no se encuentra en ninguna otra clase de productos naturales. Consiste en un anillo de 5 miembros (E) y otro de 6 (F), ambos heterociclos, de tipo estirostano en C-22. Los nombres sistemáticos en particular, son de la forma 20 α , 22-a, 25-D estirost-5-en 3 β -ol.

Los índices α o β en C-20 se refieren a la configuración del grupo metilo en el anillo E.

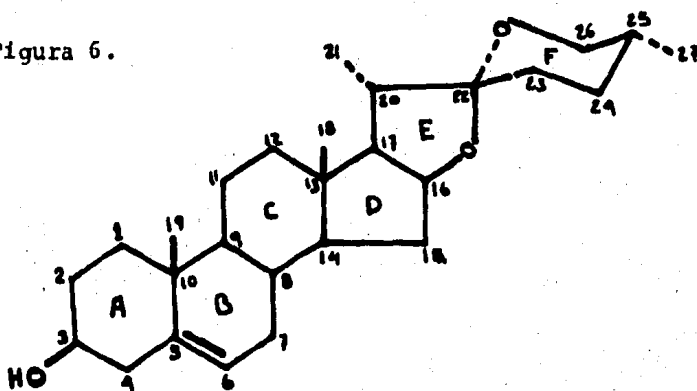
Los símbolos 22-a y 22-b se refieren a la posición del átomo de oxígeno en el anillo F con respecto al C-22.

La determinación 25D o 25L se refiere a la propiedad óptica de desviar la luz polarizada.

Pueden existir ocho isómeros debido a la isomería en - C-20, C-22 y C-25.

Aquellos compuestos cuyo anillo F está abierto se llaman furostanos.

Figura 6.



DIOSGENINA

Diosgenin: 20 α , 22a, 25D-espirost 5-en 3- β -ol (8 y 28)

La importancia química de la diosgenina, como se mencionará más adelante, reside en su predilección para ser utilizada como base de síntesis química y/o microbiológica de compuestos esteroides de grandísima importancia farmacológica.

Los esteroides son vitales en el control y funcionamiento de diversos sistemas bioquímicos dentro del organismo. (10)

Las familias de esteroides de mayor importancia que se pueden mencionar y que juegan un papel importante en el organismo son las siguientes:

- Adrenocorticosteroides
- Hormonas sexuales
- Sales biliares.

Entre los adrenocorticosteroides podemos mencionar a la hidrocortisona, pregnenolona, progesterona y adrenalina, de las cuales dependen sistemas tales como los que controlan el balance de electrolitos, el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas y fenómenos inflamatorios e inmunológicos.

Las hormonas sexuales juegan un papel indispensable para el desarrollo de los caracteres sexuales primarios y secundarios; entre estas hormonas podemos mencionar a la testosterona, estradiol y androsterona las cuales, desde el punto de vista farmacológico, tienen gran importancia ya que son ampliamente utilizadas para tratar deficiencias de estas hormonas o en terapias de sustitución y para la fabricación de anticonceptivos.

Finalmente, las sales biliares que juegan un papel fundamental en la asimilación de lípidos de los alimentos que ingerimos; entre éstas podemos mencionar a los ácidos cólico, taurocólico y glicocólico, que actúan básicamente como tensoactivos facilitando la solubilización de las grasas y cuya adminis-

tración, en casos de insuficiencia biliar o hepática, es indispensable para mantener un equilibrio de estos elementos en el organismo.

I.3. Generalidades de los procesos biotecnológicos.

Biotecnología se puede definir como la utilización de los microorganismos o componentes de ellos (enzimas) para la producción o transformación de productos útiles a los intereses del hombre, pudiendo decirse que la biotecnología tiene en estos momentos, una gran importancia gracias a las perspectivas de desarrollo que ofrece en aspectos tales como el científico, económico y social.

Una de las particularidades de la biotecnología es su carácter multidisciplinario, ya que ella requiere la aplicación de los conocimientos de varias ciencias tales como la microbiología, genética, biología molecular, bioquímica, química orgánica e inorgánica, ingeniería química y civil, etc.; además, su desarrollo requiere también estudios sociales y de economía.

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos son el pilar de esta actividad; existen cuatro clases de microorganismos de interés industrial: levaduras, hongos, bacterias y actinomicetos. Las levaduras y los hongos son los más explotados. Se trata de organismos eucariotes cuyas células, al igual que las vegetales y animales, tienen un núcleo definido por una membrana y portan más de un cromosoma; contienen además, organelos tales como mitocondrias (responsables del principal suministro de energía de la célula). Las bacterias y actinomicetos, por el contrario, son procariotes: carecen de membrana nuclear y mitocondrias, poseen un solo cromosoma, siendo en general mucho menores en tamaño que los eucariotes.

Existe una semejanza aparente entre los hongos y los actinomicetos: unos y otros son filamentosos, crecen como un sistema ramificado de hifas filiformes, pero no como células aisladas. Las levaduras y bacterias, por otro lado, son unicelulares en condiciones normales.

Los productos de interés comercial de estos microorganismos se encuadran en cuatro categorías principales: a) las células microbianas en sí mismas (biomasa); b) las macromoléculas que sintetizan, por ejemplo, enzimas; c) los productos de su metabolismo primario, por ejemplo, aminoácidos, (compuestos esenciales para su crecimiento) y d) los productos de su metabolismo secundario, por ejemplo, antibióticos (compuestos no esenciales para su desarrollo).

Entre las aplicaciones de índole comercial que poseen las células microbianas hay que destacar dos importantes. La primera se refiere al suministro de proteínas para alimentación animal; y la segunda incluye también a las células microbianas para llevar a cabo conversiones biológicas, a través de las cuales, un compuesto se transforma en otro estructuralmente relacionado por la intervención de una o más enzimas aportadas por la célula. En las conversiones biológicas, pueden participar células en crecimiento, células sin crecimiento, esporas, y hasta células desecadas. Los microorganismos, que pueden llevar a cabo casi todo tipo de reacciones químicas, gozan de muchas ventajas frente a los reactivos químicos; por ejemplo, muchas reacciones químicas no biológicas exigen un considerable aporte de energía para calentar o enfriar el tanque donde ocurre la reacción, suelen realizarse en solventes

orgánicos y a veces requieren catalizadores inorgánicos que pueden contaminar el medio. Por último, de muchas reacciones químicas no biológicas resultan productos colaterales indeseables, que deben desecharse en una etapa posterior de purificación. A diferencia de lo anterior, las conversiones biológicas transcurren a temperaturas ambientales, emplean agua como disolvente; otra ventaja, es la especificidad de las conversiones biológicas, ya que por lo común, una enzima cataliza solo una reacción en un lugar determinado de la molécula sustrato.

La conversión biológica de etanol en una solución diluida de ácido acético (vinagre) se realizaba ya en Babilonia 5000 a. de C. Entre las conversiones biológicas de interés sobresaliente para la industria farmacéutica se deben mencionar - las implicadas en la producción de penicilinas semisintéticas y la producción de esteroides donde se ha reemplazado una reacción química que contaminaba por una reacción biológica limpia.

I.4. Introducción a la biotecnología de esteroides.

Los resultados más convincentes que se han obtenido por los métodos de bioconversión corresponden a la síntesis de - hormonas esteroides. (6, 12, 13 y 14)

A principios de los años treinta, E.C. Kendall y T. Reichstein aislaron la cortisona, esteroide secretado por las glándulas suprarrenales. Una década más tarde, Phillip S. Hench y E.C. Kendall demostraron que la administración de cortisona podía aliviar el dolor de los pacientes con artritis reumática. La respuesta inmediata fué una gran demanda de la hormo-

na. Se desarrollaron métodos químicos para su síntesis, - pues el mercado potencial era muy prometedor. La síntesis química requería 37 pasos, algunos de los cuales son críticos, lo que se traducfa en un costo muy elevado del producto: fabricado en esas condiciones, valía alrededor de 200 dls. por gramo. Una de las mayores dificultades que presentaba la sin tesis química de cortisona es la introducción de un oxígeno - en la posición 11 del esteroide. Se trata de un paso crucial para la actividad fisiológica de la molécula. En 1952 D.H. Peterson y H.C. Murray descubrieron que una cepa del hongo - Rhizopus arrhizus hidroxilaba progesterona, introduciendo un átomo de oxígeno en la posición 11. la progesterona es un intermediario en el proceso de síntesis de cortisona; y por medio de la utilización de la hidroxilación microbiana, la síntesis de cortisona se redujo de 37 a 11 pasos, abaratándose - en consecuencia, los costos. El precio de la cortisona pasó a ser de 6 dls por gramo.

El descubrimiento de la hidroxilación microbiana de la progesterona trajo consigo importantes repercusiones económicas. El proceso fermentativo podía llevarse a cabo a 37°C, con agua como solvente y a presión atmosférica. La reacción efectuada en estas condiciones es mucho más barata que la que se realizaba en condiciones extremas de presión y temperatura y con disolventes distintos del agua, como exigía la primitiva síntesis de cortisona.

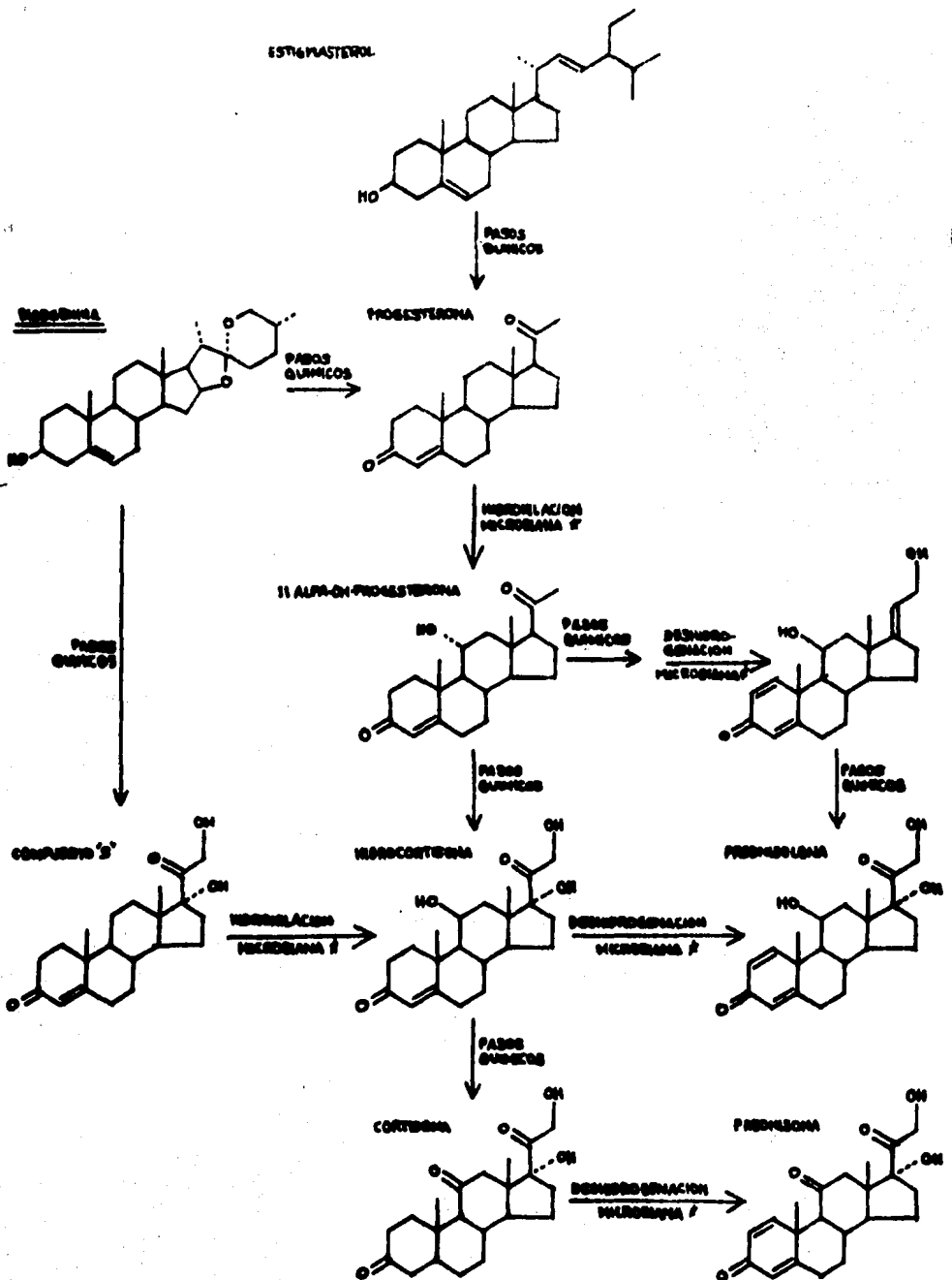
A partir de entonces, se han encontrado otras funciones a desempeñar por los microorganismos en la síntesis industrial de esteroides como cortisona, hidrocortisona, prednisona y -

dexametasona, el andrógeno testosterona, el estrógeno estradiol (estos dos últimos utilizados como anticonceptivos) y la espirolactona (diurético). Para la fabricación de todos ellos se parte de esteroides, que son alcoholes complejos. Las fuentes principales de dichos esteroides son los residuos de aceite de soya, ricos en estigmasterol y sitosterol, y las raíces de la planta mexicana de barbasco que contienen diosgenina.

En la producción de esteroides a partir de esteroides vegetales, el primer paso consiste en la degradación de la cadena lateral de la molécula del esteroide la que en algunas compañías farmacéuticas se realiza utilizando una micobacteria, lo que abarata una etapa que antes se hacía por métodos no biológicos. Las micobacterias recurren a los esteroides como fuente de carbono y energía; las cepas mutantes que carecen de ciertas enzimas no pueden completar la reacción, pero se aprovechan tales mutantes para degradaciones parciales que rinden importantes metabolitos intermediarios. También existen otras bacterias que modifican el núcleo esteroideo, dando lugar a una gran variedad de derivados. Ver figura 7.

En 1980, el gramo de cortisona valía en los Estados Unidos 46 centavos de dólar lo que implica una reducción de 400% sobre el precio original. El constante descubrimiento de nuevas aplicaciones para los esteroides (contracepción, tratamiento de insuficiencias hormonales, enfermedades de la piel, inflamaciones y alergias) unido a una producción más eficaz de los mismos, ha generado una amplia demanda de dichos fármacos. En este sentido, el volumen total mundial de ventas de los cuatro principales esteroides (cortisona, aldosterona,

Figura 7. RUTAS DE CONVERSION DE ESTEROIDES.



prednisona y prednisolona) estuvo alrededor de los 300 millones de dólares en 1978, siendo entonces los productos más importantes que se obtienen de los procesos de bioconversión.

I.5. Generalidades y descripción del barbasco. (29)

Existen diversos vegetales que contienen naturalmente a la diosgenina, entre los que podemos mencionar: magueyes (género Agave), Izotes (género Yuca) y otras pertenecientes a las familias liliáceas, Amarilidáceas y Dioscoreáceas. (15)

Aunque la diosgenina se encuentra presente como glucósidos en los vegetales mencionados, es el barbasco el que por sus características biológicas, ofrece mayores ventajas para ser utilizado como principal fuente de obtención de diosgenina, ya que es el que la contiene en mayores proporciones y su cultivo (silvestre) y manejo es relativamente fácil y económico. (15).

El barbasco como nombre genérico, comprende una gran variedad de especies; sin embargo, este trabajo se refiere a una especie en particular que es la Dioscorea composita.

Las dioscoreas son hierbas o arbustos con tallos herbáceos trepadores, que parten de grandes raíces tuberosas o rizomas nudosos (camotes). Tienen hojas anchas, frecuentemente acorazonadas y reticulopalmadas, variando desde simples hasta compuestas. Presentan flores pequeñas, dioicas, regulares, con un perianto que hace las veces de cáliz, con seis lóbulos, seis estambres y un ovario de tres cavidades. Generalmente, el fruto es una cápsula triangular, membranosa o alada que -

contiene semillas aladas.

La parte que se utiliza para la extracción de saponinas es el rizoma desecado, ya que las demás partes de la planta - solo contienen cantidades mínimas de saponinas.

Las raíces del barbasco tienen un diámetro de alrededor de 20 cm. y crecen paralelas al suelo; su cosecha puede llevarse a cabo cada dos años sin necesidad de nuevas plantaciones. (15,16)

El barbasco crece en una amplia región de la República - Mexicana, particularmente en los estados de Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Guerrero y estado de México; sin embargo, - se le puede cultivar en cualquier parte con clima húmedo tropical. (17).

La planta esta compuesta en general, por resinas, almidón, celulosa, oxalato de calcio y saponinas. (18).

Desde hace casi 50 años en que aconteció la llamada "revolución de los esteroides", aumentó la explotación de estas raíces a tal grado que se tuvo que establecer una ley que prohíbe la exportación de esta planta desde 1951; con el fin de racionalizar su explotación y aprovecharla particularmente - desde el punto de vista económico.

Gracias a los estudios de varios investigadores, como - Marker (19), Kawasaki (20), Espejo (21) y otros, se ha determinado la naturaleza y características de las saponinas del barbasco, estableciendo que la planta tiene una compleja mezcla de saponinas siendo las más abundantes las siguientes:

Dioscina: Diosgenin: (2,4-bis- α -L-rhamnopiranosil)- β -D-glucopiranosido.

Trillina: Diosgenin:3- β -D-glucopiranosido.

Prosapogenina A: Diosgenin:3-O-(α -L-rhamnopiranosil 1-2)- β -D-glucopiranosido.

Prosapogenina B: Diosgenin:3-O-(α -L-rhamnopiranosil 1-4)- β -D-glucopiranosido.

Además, también se encuentran algunos glicósidos de furostanol en los cuales, éste está unido a dos restos de glucosa en las posiciones 3 y 26 del esteroide.

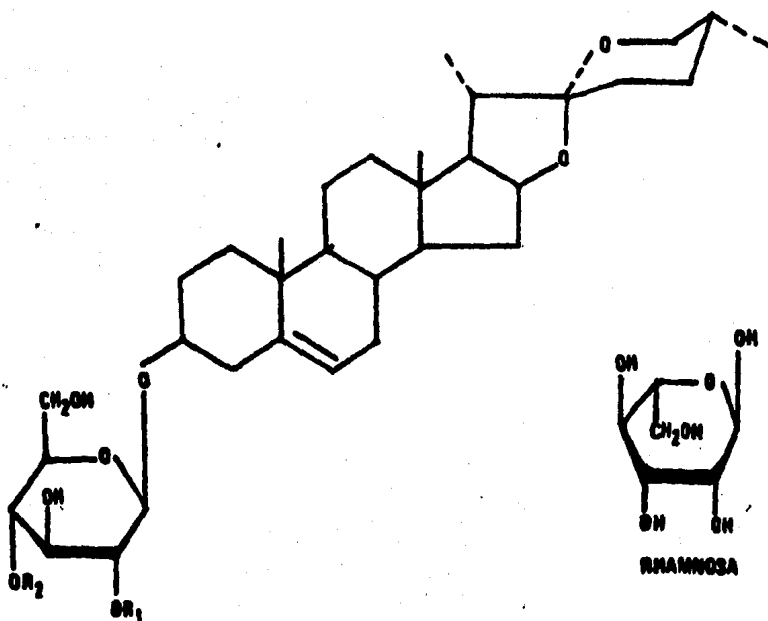


Figura 8 .

Dioscina: $R_1=R_2=\alpha$ -L-rhamnosa.

Trillina: $R_1=R_2=H$.

Prosapogenina A: $R_1=\alpha$ -L-rhamnosa, $R_2=H$.

Prosapogenina B: $R_1=H$, $R_2=\alpha$ -L-rhamnosa.

I.6. Antecedentes experimentales.

Como se mencionó anteriormente, la diosgenina se encuentra de modo general en los vegetales mencionados, asociada químicamente a azúcares mediante un enlace beta-glucosídico; sin embargo, para poder utilizarla como materia prima, es necesario que se encuentre como aglicón (sin el azúcar) para lo cual, se ha llevado tradicionalmente una hidrólisis ácida utilizando ácidos minerales y altas temperaturas; esto implica ciertos inconvenientes tales como la utilización de ácidos escasos y caros, condiciones extremas de reacción que traen consigo un desgaste excesivo de los reactores, un gran gasto energético y contaminación ambiental debido a los residuos que son desechados.

A raíz de los experimentos llevados a cabo en el laboratorio para estudiar la actividad de las enzimas producidas por hongos que se desarrollan en sustratos celulósicos, y en base al conocimiento de que los complejos enzimáticos del sistema de celulasa tienen actividad de beta-glucosidasas, se pensó en la posibilidad de probar su acción sobre los enlaces beta-glucosídicos de las saponinas del barbasco.

Se escogió entre varias cepas, una en particular, debido a su capacidad de hidrolizar algunas de las saponinas del barbasco (22).

Teniendo como antecedentes el trabajo realizado por Krider et.al. (23) en el cual se reportan, por primera vez, enzimas extracelulares de hongos del género Aspergillus, y Penicillium, crecidos en un medio que contenía saponinas extraídas de algunas especies de Agave para su hidrólisis; y por otra parte, el

trabajo realizado por Rothrock et. al. (24), se decidió probar comparativamente la capacidad de algunos hongos similares a los reportados, con el hongo aislado en el laboratorio. Así mismo, tratar de desarrollar un procedimiento que incluyera los pasos necesarios para la obtención de diosgenina a partir de las saponinas del barbasco mediante una hidrólisis micro-biológica en un proceso fermentativo.

OBJETIVOS

- 1.- Obtención de diosgenina a partir de las saponinas del barbasco (Dioscorea composita) mediante un procedimiento biotecnológico.
- 2.- Aplicación de las técnicas fermentativas y utilización del potencial bioquímico de microorganismos en sustitución del procedimiento químico para la obtención de diosgenina.
- 3.- Desarrollo de un procedimiento en el laboratorio, susceptible de ser aplicado a nivel industrial para la obtención de diosgenina.
- 4.- Evaluación comparativa entre el proceso biotecnológico y el proceso químico en cuanto a rendimiento, calidad y factibilidad de desarrollo industrial.

III. MATERIAL, EQUIPO, SOLVENTES, REACTIVOS Y SUSTANCIAS.

<u>EQUIPO.</u>	MARCA
ROTAVAPOR	BUCHLER INSTRUMENTS
BOMBA DE VACIO M-FE-1500	FELISA
HORNO M-FF-293	FELISA
PISTOLA DE AIRE M-HG-301	MASTER APLIANCE
CROMATOGRAFO DE GASES M-3700	VARIAN
REGISTRADOR DEL C.G. M-9176	VARIAN
CENTRIFUGA SORVAL RC-5	DUPONT INSTRUMENTS
OLLA DE PRESION	ALL AMERICAN
AUTOCLAVE	CENTRO DE INSTRUMENTOS UNAM
RELOJ DE LAPSOS	GENERAL ELECTRIC
BALANZA DIGITAL M-1219-MP	SARTORIUS
BALANZA DE DOS PLATOS	OHAUS
LICUADORA	OSSTERIZER
BAÑO DE VAPOR	CENTRO DE INSTRUMENTOS UNAM
DETERMINADOR DE PUNTOS DE FUSION MELT-TEMP.	LABORATORY DEVICES
FOTOCOLORIMETRO ESPECTRONIC 20	BAUSCH & LOMB
PLNCHA DE AGITACION T-1000	THERMOLINE
POTENCIOMETRO DE pH M-LS	SARGENT WELCH

CAMPANA DE FLUJO LAMINAR	VECO
PANEL DE FERMENTACION M-19-1400	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO.
JARRA DE FERMENTACION 14 l.	NEW BRUNSWICK.
MANTILLAS ELECTRICAS	GLAS-COL APARATUS CO.
REOSTATO M-R510	OSYMA

MATERIAL.

CROMATOPLACAS SG-60 5x20x0.25 cm.	MERCK
MATRACES FERNBACH	PYREX
CAJAS PETRI DESECHABLES	CRIVE
ASA PLATINO-IRIDIO	PROVEEDOR CIENTIFICO
CAMARAS PARA CROMATOPLACAS	WHATTMAN
MORTERO CON MANO	PYREX
VASOS DE PRECIPITADOS 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.	PYREX
PROBETAS 10, 50, 100, 500 y 1000 ml.	PYREX
MATRACES ERLLENMEYER 125, 250, 500, 1000 y 2000 ml.	PYREX
TERMOMETROS	
PIPETAS 1, 5, y 10 ml.	IVA Y PYREX
PIPETAS PASTEUR	SCIENTIFIC PRODUCTS
EMBUDOS DE VIDRIO	PYREX
MECHEROS BUNSEHN	PROVEEDOR CIENTIFICO
EMBUDOS BUCHNER	PIMSA
PISETAS	NALGENE
TUBOS DE ENSAYE	PYREX

MATRACES KITASATO 125, 250, 500 y 1000 ml.	PYREX
EXTRACTOR SOXHLET	PYREX
CARTUCHOS P/SOXHLET	WHATTMAN
MATRAZ DE TRES BOCAS	KIMAX
EMBUDOS DE SEPARACION 60, 250, 500 y 1000 ml.	PYREX
JERINGAS DESECHABLES	B-D PLASTIPAK
MATRACES AFORADOS 100 y 500 ml.	PYREX
COLUMNA PARA CROMATOGRAFIA 3 X 45 cm.	PYREX
VIALES 15 X 45 mm.	KIMBLE
VIALES C/TAPA 21 X 70 mm.	KIMBLE
GRADILLAS	PROVEEDOR CIENTIFICO
ESPATULAS ACERO INOX.	SCIENTIFIC PRODUCTS.
MATRACES DE BOLA 250 y 500 ml.	PYREX
PAPEL FILTRO	WHATTMAN
CINTA TESTIGO DE ESTERILIDAD	TUCK
ALGODON Y GASA.	

SOLVENTES, REACTIVOS Y SUSTANCIAS

CLOROFORMO	J.T. BAKER Y MERCK
ACETATO DE ETILO	" "
BENCENO	" "
METANOL	" "
PIRIDINA	" "
N-HEXANO	" "
ETANOL	" "

ACETONA	J.T. BAKER
HIDROXIDO DE SODIO	"
FENOL	"
SULFATO DE SODIO ANHIDRO	"
GEL DE SILICE 60-200 MALLAS	"
VAINILLINA	"
ACIDO SULFURICO	"
AGAR PAPA GLUCOSA	MERCK
ARENA DE MAR P.A.	MERCK
TWEEN 80 G.R.	SIGMA
ANTIESPUMANTE SAG-471	UNION CARBIDE
COLESTANO STD.	
DIOSGENINA STD.	PROQUIVEMEX S.A.
HARINA DE BARBASCO	PROQUIVEMEX S.A.

IV. METODOS

IV. 1. Descripción de medios de cultivo.

Se utilizan dos medios de cultivo: el primero, para la conservación de la cepa; y el segundo, para la fermentación:

Medio #1. Conservación y propagación:

Agar-papa-glucosa (PDA) Merck

Medio #2. Fermentación:

Harina de barbasco 2.0% P/V

Tween 80 G.R. 0.2% V/V

Agua destilada

pH despues de esterilización 4.6-5.2

Los medios se esterilizan en autoclave a 121°C (18 lbs) durante 20 minutos.

IV. 2. Descripción de los microorganismos.

Se estudiaron tres cepas de hongos. La primera de ellas es un Aspergillus terreus NRRL 265 el cual, es un hongo de colonias redondas, elevadas, grandes, con crecimiento micelial aéreo y esporulación abundante muy volátil, de color amarillo característico.

El segundo hongo es un Aspergillus terreus ATCC 1012; el cual, es un hongo de colonias redondas, elevadas, grandes, de crecimiento micelial aéreo y esporulación abundante característica de color verde muy volátil.

El tercer hongo fué aislado de bagacillo de caña: se trata de un levaduriforme, de colonias, redondas, elevadas y pequeñas; cuando crece a las 48 h. sus colonias son blancas y

cremosas; al esporular (72 h.) toma un color anaranjado característico que se intensifica al paso del tiempo, presenta gran adherencia al agar. Se le clasificó como un Aureobasidium sp. nombrándosele en el laboratorio "H-18".

Todos los hongos son cultivados inicialmente en el medio #1, se siembran con la ayuda de un asa estéril esparciéndolos por toda la superficie del agar; se dejan crecer a 29°C durante 72 h. y posteriormente se les pone a temperatura ambiente para que esporules durante 72 a 96 h.

IV. 3. Preparación de la suspensión de esporas.

Una vez pasadas las 72 h., se toman de 30 a 40 cajas del microorganismo, a las cuales se les agregan de 2 a 3 ml. de agua destilada estéril a cada una; mediante el asa previamente esterilizada se fricciona la superficie de los cultivos a fin de desprender las esporas y suspenderlas en agua, después se succiona suavemente con una jeringa desechable de un ml. y se vacían en un matraz erlenmeyer de 250 ml estéril, recolectándose en total alrededor de 50 ml. a los cuales, posteriormente se les determinará la concentración de esporas por densidad óptica en el fotocolorímetro.

IV.4. Determinación del volumen para inóculo.

De la suspensión de esporas obtenida anteriormente se toma con ayuda de una pipeta estéril, un ml. de la suspensión, el cual se vacía en un tubo de ensaye y se le agregan 9 ml. de agua destilada para obtener una dilución 1:10. Se lee su absorbancia a 540 nm. en el fotocolorímetro contra

un blanco de agua destilada; si sobrepasara el rango aceptable de concentración, se hace otra dilución 1:10.

Se aplica la siguiente fórmula para determinar el volumen en ml. de suspensión de esporas para inocular:

$$\text{ml. de inóculo} = \frac{(\text{D.O. deseada/ml}) (\text{V.T.})}{(\text{D.O. obtenida}) (\text{F. de dil.})}$$

Donde V.T.= volumen total de medio de fermentación.

D.O. deseada= densidad óptica recomendada, en general por resultados empíricos para la inoculación de un fermentador; su valor se encuentra entre 0.04 y 0.08 U. de D.O. por ml. de medio.

IV. 5. Descripción de los sistemas de fermentación.

Se desarrollan principalmente dos sistemas de fermentación: A nivel pequeño, en ensayos generales, se emplean los matracas Fernbach de 2.8 lts., los cuales son agitados sobre una plataforma de agitación dentro de un cuarto de temperatura constante de 29°C, esto durante la primera etapa de experimentación.

Para el primer escalamiento se emplea una jarra de 10 lts. de volumen de trabajo (capacidad total 14 lts.) operada sobre un panel que tiene la capacidad de registrar, controlar y monitorear el pH, el oxígeno disuelto (O.D.), la temperatura, el flujo de aire y la agitación.

IV.6 Preparación del fermentador.

La jarra de fermentación se prepara de la siguiente manera: Se pesan 200 g de harina de barbasco molido previamente en una licuadora durante 10 o 15 segundos en seco.

A la jarra se le adicionan 4 litros de agua destilada con 20 ml de Tween 80 disueltos previamente; se vacfa el barbasco y se completa el volumen a 10 litros con agua destilada. Después de esto, se instalan los electrodos de pH y oxígeno, se arreglan las conexiones para antiespumante, ácido, álcali, toma de muestra, trampa de aire y entrada de aire con filtro. Es tando el conjunto listo con los matraces reservorios de ácido, álcali y antiespumante, se mete al autoclave a esterilizar.

IV.7. Calibración e inoculación del fermentador.

Después de la esterilización, se deja enfriar el fermentador; entonces se coloca en el panel, al cual se conectan las líneas de aire, agua (refrigerante) y se contactan las terminales de los electrodos de pH y oxígeno. Se fija la temperatura a 29°C; una vez alcanzada, se calibra el registrador de oxígeno disuelto a 0% (cuando aún no hay aereación ni agitación, pero ya es estable la temperatura de operación). Posteriormente se fija la agitación a 350 rpm y se ajusta el flujo de aire a 0.5 VVM; después de 20 a 25 minutos se calibra el registrador de oxígeno disuelto a 100%. Se toma una muestra de manera estéril y se pone sobre una placa del medio No. 1 para verificar la esterilidad inicial del medio; con el mismo flujo de esa muestra se toma otra para determinar el pH en un poten-

ciómetro externo y entonces calibrar el potenciómetro del panel instrumentado; ya calibrado el potenciómetro, se procede a calibrar el pH al valor deseado con el ácido o el álcali que pueden ser agregados automáticamente. Una vez establecidos todos los parámetros, se procede a la inoculación, la cual se lleva a cabo con la ayuda de un mechero y limpieza previa de la zona del tapón de inoculación en la tapa de la jarra, con una solución de benzal, adicionando con una pipeta estéril la cantidad de suspensión de esporas determinada según los cálculos descritos anteriormente.

Se toman los registros de temperatura, pH y oxígeno disuelto durante los días que dura la fermentación.

IV.8. Obtención de sólidos.

Una vez terminado el tiempo de fermentación, se centrifuga el caldo a 7,500 rpm durante 35 minutos, separando los solidos del sobrenadante por decantación. Estos solidos son puestos en una charola de aluminio que se coloca sobre una superficie caliente (50 - 60°C) para secarlos a peso constante (esto se puede hacer en un horno de lecho fijo para granulados). Una vez secos los solidos, se reduce su tamaño de partícula utilizando un mortero y se pesan para calcular el balance de materia a través de la fermentación.

IV.9. Extracción de sólidos.

Los solidos recuperados, se colocan en cantidades conocidas de 20 a 30 gramos en cada cartucho soxhlet para su extrac-

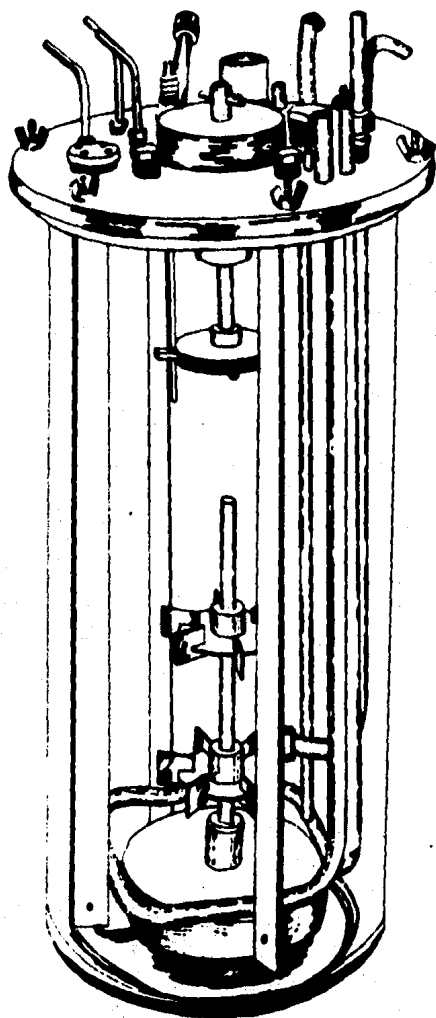
ción, la cual se lleva a cabo utilizando 200 ml de n-hexano como solvente calentando con una mantilla eléctrica controlada por un reóstato durante 12 horas. Al fin de la extracción, el solvente es evaporado en un rotavapor, obteniéndose un residuo aceitoso amarillo con sólidos cristalinos de color blanco; estos residuos son secados con benceno o piridina quedando listos para su purificación en columna. Antes de esta última se corre una cromatografía en capa fina para verificar la presencia de diosgenina y de otros compuestos; así como una cromatografía de gases para verificar las proporciones de productos en la mezcla obtenida.

IV.10. Extracción de sobrenadantes.

Después de centrifugar y separar los sobrenadantes, éstos son extraídos en volúmenes de 500 ml con el mismo volumen de acetato de etilo en un embudo de separación repitiéndose la extracción dos veces por volumen de sobrenadante. La fase orgánica se separa y filtra a través de sulfato de sodio anhidro recolectándose en un matraz de bola de 250 ml, el contenido es evaporado en el rotavapor y esto se repite cuantas veces sea necesario para extraer un litro de sobrenadante. Al final de lo anterior se obtiene un residuo aceitoso al cual se le corre también cromatografía de capa fina y cromatografía de gases.

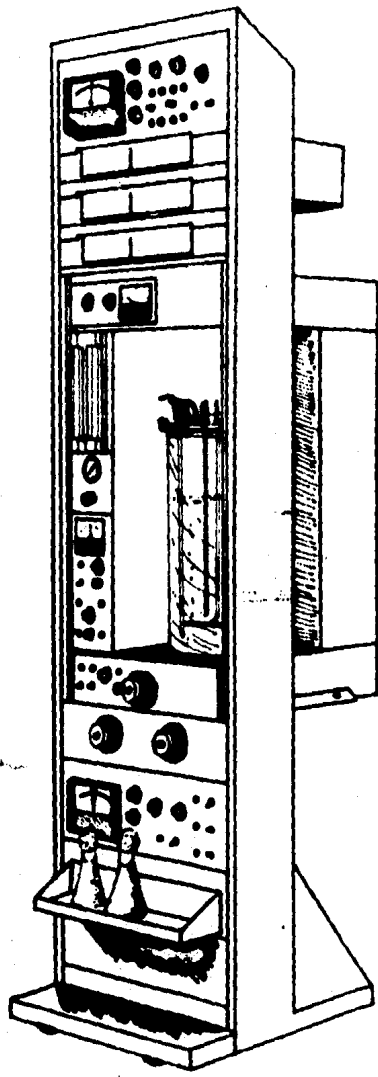
Los residuos aceitosos se pesan para calcular el rendimiento bruto de extractos.

Figura 9



Jarra de 14 litros (10 lt volumen de trabajo)

Figura 10



Panel New Brunswick M-19-I

IV. 11. Condiciones de la cromatografía en capa fina.

Para la cromatografía de capa fina se utilizan las cromatoplasas Merck en dos sistemas de solventes que pueden ser usados indistintamente: el sistema a) se compone con cloroformo y acetato de etilo 1:1; y el sistema b) por cloroformo y acetona 8:2; corriéndose las placas dentro de las cámaras Whatman. Las placas son reveladas con un rocío de una solución etanólica de ácido sulfúrico al 10% activado con calor.

IV. 12. Condiciones de la cromatografía de gases.

La cromatografía de gases se aprovechó como un valioso auxiliar gracias a su rapidez y resolución para la determinación de diosgenina, así como para la estimación de la composición de los productos obtenidos. (25)

Las condiciones generales de operación en todas las cromatografías son las siguientes, a menos que se indique otra cosa en el cromatograma: Se utiliza una columna de vidrio de 2 mm. de diámetro interno por 6 pies de longitud, empacada con una fase líquida OV-17 al 3% sobre un soporte cromosorb-Q de 80 a 100 mallas (columna alternativa OV-1 al 3% ó una SP-2500).

El cromatógrafo se opera bajo las siguientes condiciones: Temperatura del inyector de 290°C, columna a 245 ó 260°C; el detector de iones (FID) a 290°C; atenuación 16; sensibilidad de 10^{-10} amp/mv. El registrador a una velocidad de carta de 0.2 cm/min. El gas acarreador (nitrógeno) a un flujo de 50 cm³/min.

IV. 13. Cálculo del contenido en por ciento según la cromatografía de gases.

Este cálculo se basa en el hecho de que en un cromatograma, el área de los picos es directamente proporcional a la concentración de los componentes en la solución analizada.

Normalmente se calcula el por ciento de un compuesto, en referencia al área producida por un estándar de concentración conocida, obteniéndose con ello el llamado "factor de respuesta" del detector del cromatógrafo al compuesto referido; sin embargo, cuando se tratan mezclas de compuestos desconocidos en una solución, y se carece por tanto, de los estándares correspondientes, se recurre al método del cálculo de % del componente X que toma en cuenta solamente el área de los picos medida a la mitad de la altura, con la suposición de que el factor de respuesta para cada componente es más o menos igual. (25)

Para el cálculo de las áreas en este método, se mantienen constantes la atenuación y sensibilidad del electrómetro del cromatógrafo; mientras que en el método que considera el factor de respuesta, pueden variarse dichas condiciones y corregirse posteriormente al aplicar la ecuación del cálculo de % del compuesto x que involucra las condiciones como la atenuación aplicada al compuesto, la sensibilidad, la velocidad de la carta, la suma de las áreas corregidas de los picos que a su vez se determinan midiendo la altura de los picos y la amplitud en la base del pico a la mitad de la altura.

Para determinar el porcentaje de diosgenina en los cromatogramas, se midió el área de los picos tomando como base del pico, la amplitud a la mitad de la altura. Con la sensibilidad, la atenuación y la velocidad de la carta constantes, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de diosgenina} = \frac{\text{Acđ} \times 100}{\Sigma \text{Act}}$$

Donde Acđ = al área del pico de diosgenina, tomando como base del pico, la amplitud a la mitad de la altura ($A=b \times h/2$).

y ΣAct = a la suma de las áreas de todos los picos que aparecen en el cromatograma, igualmente medidas.

Es necesario aclarar, que este método es aproximado dado que se desconoce la naturaleza de la mayoría de los componentes de las muestras, por lo que no se tienen estándares y por lo cual no se puede calcular el factor de respuesta para cada uno de ellos. Esto es en base a la naturaleza de las muestras obtenidas de las fermentaciones de las que solo se tiene idea de dos de los componentes.

IV.14. Purificación en columna.

La purificación de los residuos aceitosos tanto de la fermentación como los de la hidrólisis ácida se llevan a cabo de la siguiente manera: se empaca una columna de vidrio para cromatografía de 3 por 45 cm con una suspensión de 100 g de gel de sílice en 300 ml de n-hexano aplicando aire a presión y vibración mecánica para lograr el mejor empaquete posible. Se deja bajar el nivel de solvente hasta un mm. antes del nivel del empaque sin dejar que este se llegue a secar.

Se colocan entre 4 y 5 g del residuo aceitoso pesados exactamente, disueltos previamente en la mínima cantidad necesaria de benceno, sobre la superficie del empaque se comienza a eluir con un gradiente de polaridad según se indica en el Cuadro IV.11.1. a un flujo de 5 ml por min.; tomando fracciones de 10 ml exactos c/u en tubos de ensaye.

De cada 5 fracciones se toman 2 μ l y se inyectan en el cromatógrafo de gases, para comprobar la evolución de la diosgenina en las diferentes fracciones y obtener un perfil de elución; así mismo, se corren placas de cromatografía en capa fina de cada tres fracciones.

CUADRO IV.11.1. GRADIENTE DE POLARIDAD PARA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

	Sistema de solventes	% (v/v)	Volumen eluido
Empaque	n-hexano	100	vol. de exclusión
Elución 1	Benceno/AcOEt	95/5	300 ml
Elución 2	Benceno/AcOEt	90/10	300 ml
Elución 3	Benceno/AcOEt	85/15	300 ml
Elución 4	Benceno/AcOEt	80/20	Hasta completar elución

IV. 15. Cristalización y recristalización.

El conjunto de fracciones que mostraron la mayor concentración y pureza de diosgenina, se juntan en un matraz de bola de 250 ml. y se evapora a sequedad en el rotavapor, quedando los cristales de diosgenina ligeramente amarillos. Estos cristales se lavan con la mínima cantidad de n-hexano frío; una vez lavados, se evaporan nuevamente a sequedad en el rotavapor.

La recristalización se efectúa para obtener lo más pura posible a la diosgenina y se lleva a cabo de la siguiente manera: Los cristales obtenidos del paso anterior, se disuelven en alrededor de 50 ml de acetona, calentando si es necesario, y se pone a evaporar en el baño de vapor hasta que queden -- aproximadamente 10 o 20 ml. y entonces, se agregan 30 o 40 ml. de metanol; se sigue calentando en el baño hasta eliminar totalmente a la acetona y quede solo el metanol caliente, en ese momento se saca del baño de vapor y se deja enfriar a temperatura ambiente, comenzando en ese momento a cristalizar; entonces, se mete el vaso que contiene los cristales de diosgenina a enfriar a un recipiente que contenga hielo picado o hielo seco para completar la recristalización. Una vez terminada esta, se filtra el producto en un embudo buchner y se seca por vacío; se corren cromatografías de gases y capa fina y se le determina el punto de fusión. Finalmente se calcula el rendimiento del procedimiento.

IV. 16. Hidrólisis ácida.

La hidrólisis ácida es el procedimiento original, mediante el cual se ha extraído la diosgenina a partir del barbasco desde que se descubrió que éste la contenía. Esta técnica se ha modificado muchas veces, pero todas tienen como común denominador, el empleo de ácidos minerales fuertes como el H_2SO_4 o el HCl concentrados y altas temperaturas.

La técnica utilizada es la siguiente (27):

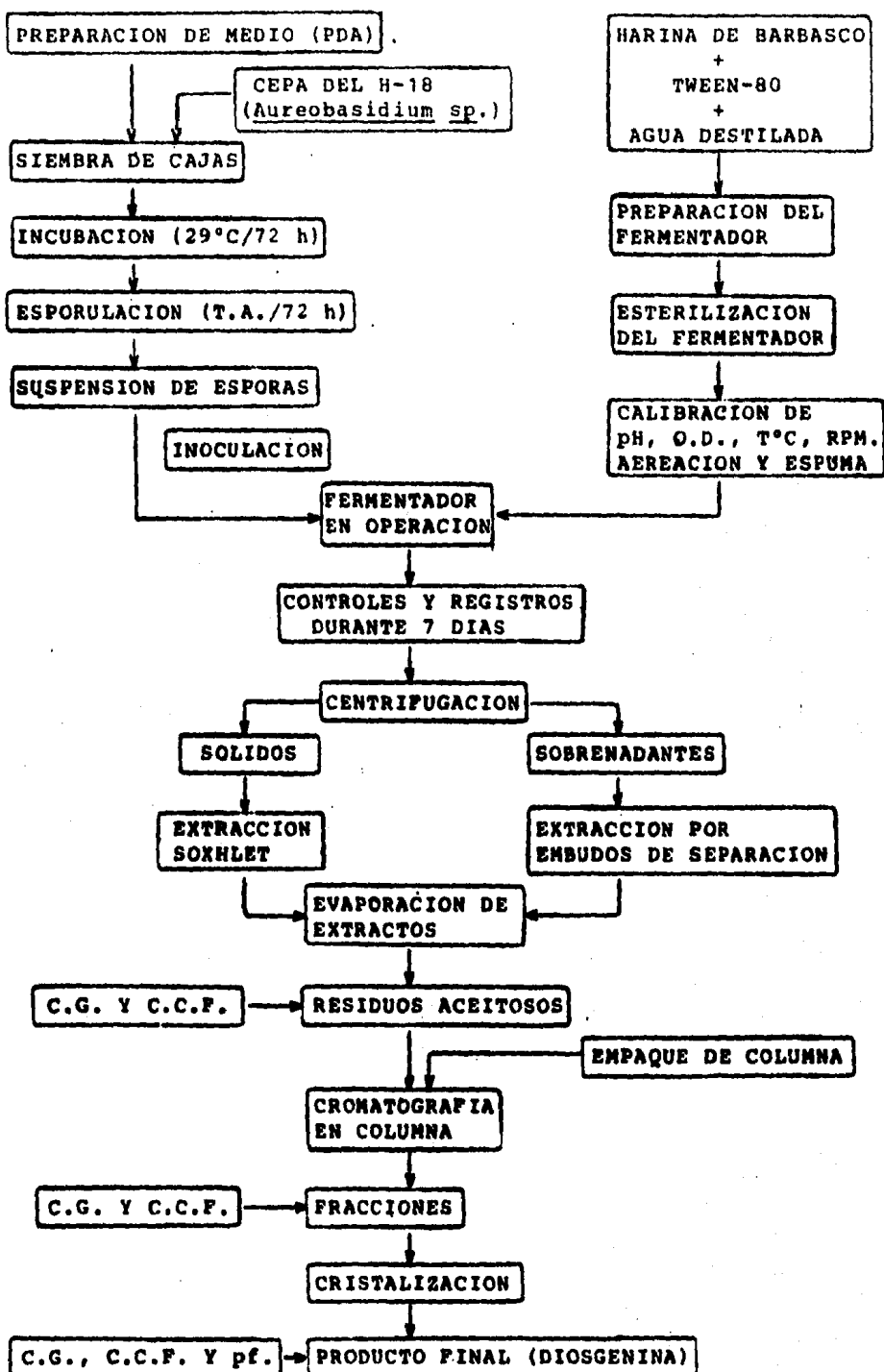
De una muestra de barbasco de alrededor de 200 g. bien molidos, se toman 20 g. pesados exactamente, y se colocan en un matrás de bola de 500 ml. de 3 bocas adaptado con un refrigerante de reflujo y un termómetro; se agregan 120 ml. de HCl 3 N y se calienta en una mantilla eléctrica controlada por un reóstato puesto sobre un agitador magnético. Se pone a reflujo durante 4 hs. con agitación suave a una temperatura constante de 90°C.

Una vez terminadas las 4 hs. se deja enfriar la mezcla de reacción, entre 70 y 75°C y se neutraliza con NaOH o con $Ca(OH)_2$ hasta pH=7 al papel indicador. Se filtra por embudo buchner, decantando la arena para pesarla posteriormente; se comprime la torta y se seca lo más posible al vacío; posteriormente, se pasa a un crisol tarado a peso constante y se mete a un horno a 110°C hasta que esté a peso constante, se anota el peso y se mete a un cartucho soxhlet para extraerse durante 2 hs. con benceno.

Al solvente recuperado de la extracción se le corre una cromatografía de capa fina, así como una cromatografía de gases, para comprobar contenido y proporciones de componentes

del residuo.

A los residuos obtenidos de la hidrólisis ácida, se les trata de la misma manera que a los residuos obtenidos de la fermentación, en cuanto a purificación y recristalización -- (secciones IV.14. y IV.15.).

Figura 11. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTOS

V. RESULTADOS

V.1. Selección de la cepa de trabajo.

Se propuso como objetivo en esta etapa del trabajo, evaluar comparativamente un microorganismo reportado por Rothrock, et.al. (24) y la cepa aislada de bagacillo de caña, (Aureobasidium sp) cuyas enzimas presentaban actividad sobre las saponinas del barbasco, con el fin de elegir a la cepa que mejores resultados presentara.

El microorganismo reportado es un Aspergillus terreus de colección privada (Merck Co.) por lo que se resolvió trabajar con las cepas disponibles de dicho microorganismo; y que son como ya se mencionó anteriormente, los Aspergillus terreus ATCC 1012 y NRRL 265.

El experimento contempló las siguientes condiciones: Se llevaron a cabo 6 fermentaciones (2 por cada microorganismo) en matraces Fernbach de acuerdo a las condiciones mencionadas en la sección IV.1. a IV.5. y a las utilizadas por Rothrock et.al.

Las condiciones reportadas difieren básicamente en el valor de pH; ya que el medio de fermentación donde desarrollan al A.terreus es ajustado a un valor de 4; mientras que para el Aureobasidium sp. se encontró un crecimiento y actividad óptimo a un pH de 8 (22).

Estos valores fueron ajustados convenientemente con NaOH 1N y H₂SO₄ 1N; además de esto, Rothrock utiliza sales de amonio como fuente de nitrógeno, las cuales sólo se utilizaron con los A. terreus con el fin de reproducir las condiciones reportadas lo mejor posible.

En las cromatografías de capa fina y de gases con las que se verificaron las actividades de las diferentes cepas se encontró que dos de las tres cepas estudiadas causaban la liberación de diosgenina en los sólidos de fermentación:

En el caso del A. terreus ATCC 1012, se encontró un producto de una polaridad muy similar a la de la diosgenina (fotografías V.1.1. y V.1.5.) pero al inyectarse en el cromatógrafo de gases simultáneamente, la muestra del producto obtenido concentrado y el estandar de diosgenina, se obtuvo una separación cuantitativa de los productos demostrando que se trataba de otro compuesto (fotografía V.1.6.).

En las pruebas con el A. terreus NRRL 265 se encontró la liberación de diosgenina, pero en una proporción relativa pequeña (fotografías V.1.2. y V.1.7.) que al compararse con el producto del Aureobasidium sp (fotografías V.1.3. y V.1.8.) resultó ser despreciable.

El producto del Aureobasidium sp. constituyó el resultado más satisfactorio, por lo que se decidió continuar trabajando con esta cepa.

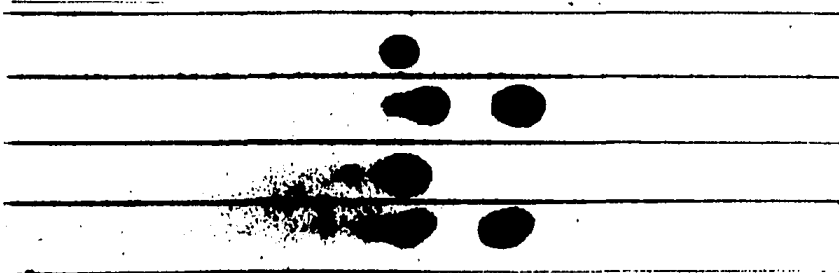
Se hicieron evaluaciones exclusivamente cualitativas en base a observaciones sobre los productos obtenidos, y a las gráficas de cromatografía de gases y cromatografía en capa fina. Los resultados se pueden ver en la tabla V.1.1.

Parámetros de evaluación	Microorganismos		
	<u>A. terreus</u> ATCC 1012	<u>A. terreus</u> NRRL 265	<u>Aureobasidium sp.</u>
Sólidos recuperados	++	++	++
Extracto recuperado crudo	+	+	+++
Presencia de diosgenina según C.G.	+	-	+++

Tabla V.1.1. Comparación cualitativa de las cepas probadas.

En base a los resultados mostrados por los microorganismos se eligió al Aureobasidium sp como cepa de trabajo.

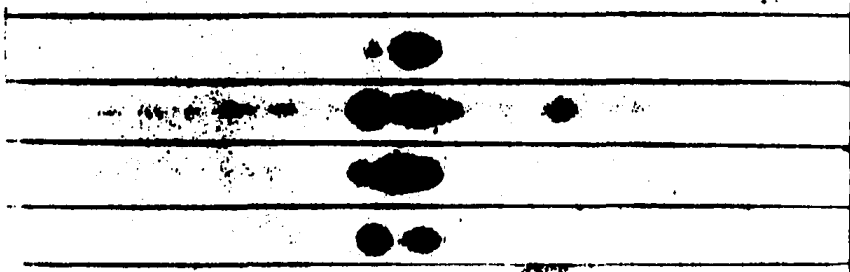
fotografia V.1.1.



Drugg...
 Ser...
 ...
 ...
 ...

Producto del Aspergillus terreus ATCC 1012

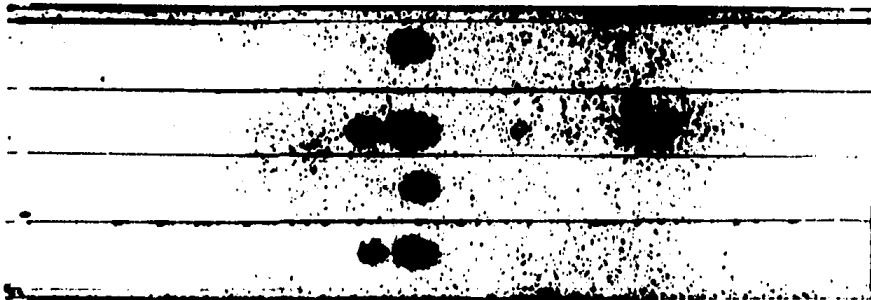
fotografia V.1.2.



Drugg...
 ...
 ...
 ...
 ...

Producto del Aspergillus terreus NRRL 265

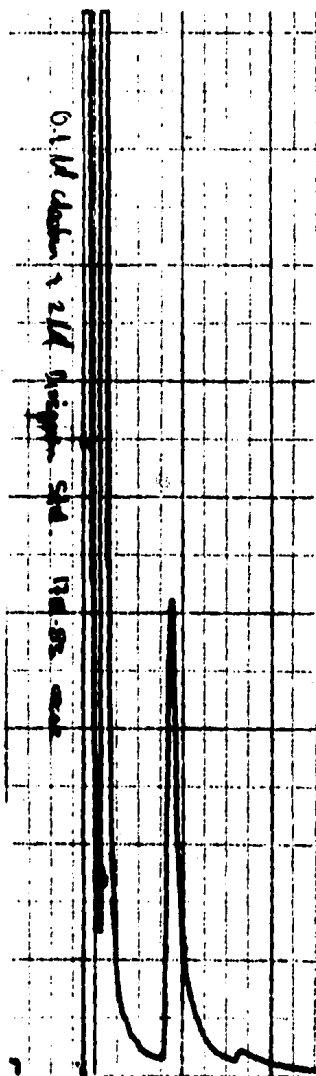
fotografia V.1.3.



Drugg...
 ...
 ...
 ...

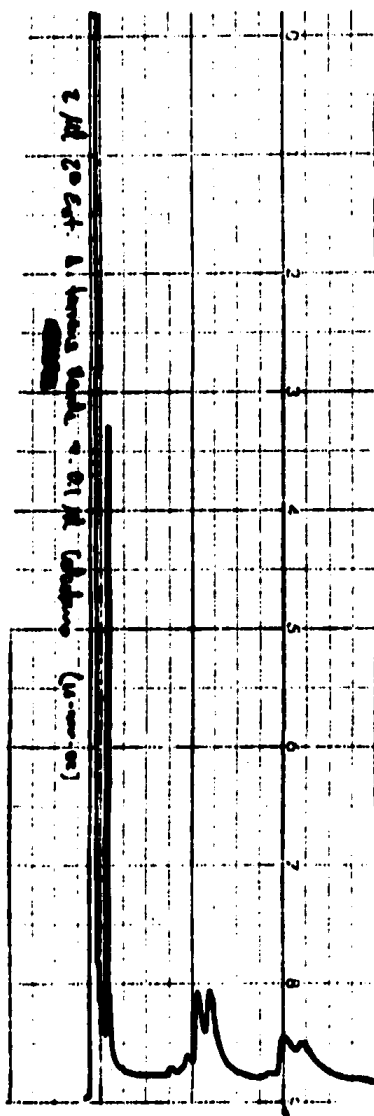
Producto del Aureobasidium sp (H-18)

Cromatograma V.1.4.

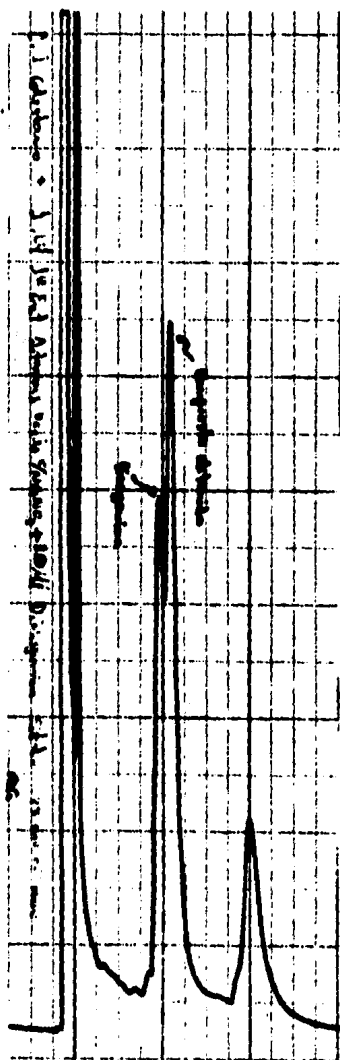


Estandar de Diosgenina + Colestano

Cromatograma V.1.5.

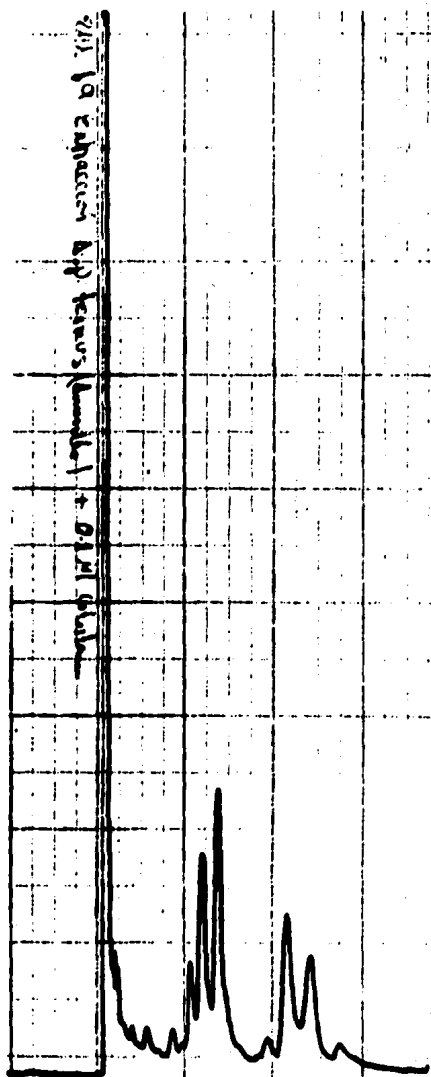
Producto del Aspergillus terreus ATCC 1012

Cromatograma V.1.6.

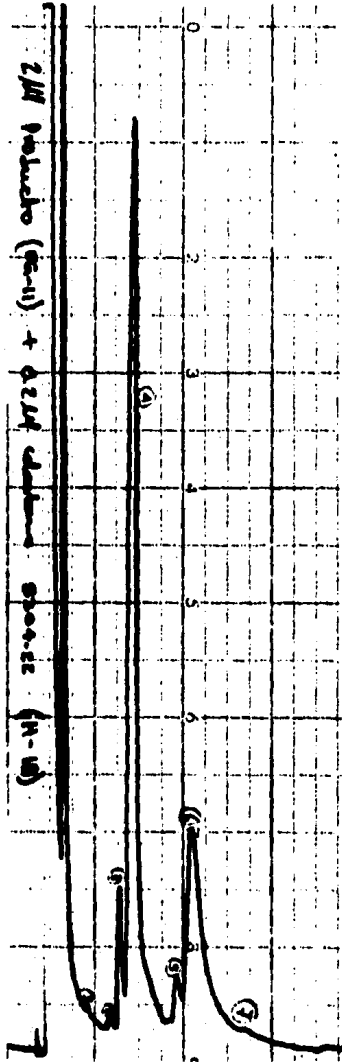


Identidad del producto obtenido del A. terreus ATCC 1012.

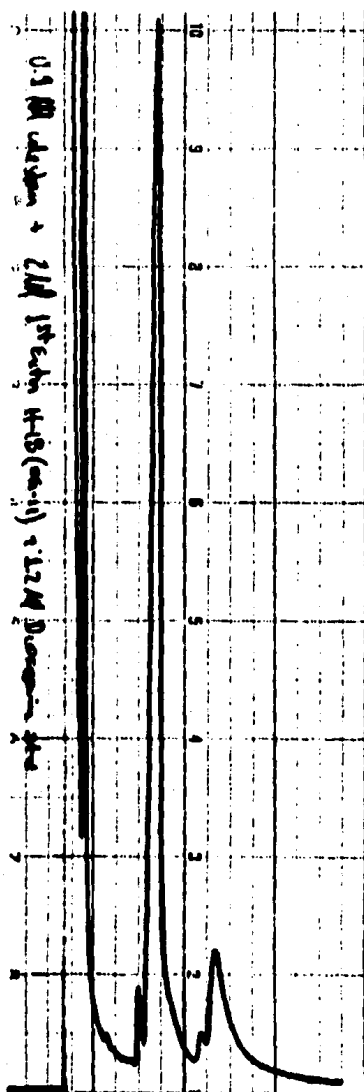
Cromatograma V.1.7.

Producto del *Aspergillus terreus* NRRL 265

Cromatograma V.1.8.

Producto del Aureobasidium sp (H-18)

Cromatograma V.1.9.



Colectano std. + Diosgenina std. + Prod. H-18
 Comprobación de identidad del producto del
Aureobasidium sp (H-18)

V.2. Fermentaciones en 10 lt.

En base al conocimiento adquirido sobre las condiciones de fermentación de la harina de barbasco a nivel de matraz Fernbach con el Aureobasidium sp , se decidió escalar la fermentación a un volumen de 10 lt., con el fin de verificar los rendimientos y el comportamiento del microorganismo, ya que en el matraz Fernbach no pueden ser controlados algunos factores fácilmente como lo son la agitación, la aereación y el pH; mientras que en una jarra de fermentación se facilitan los registros y se controlan mejor dichos parámetros.

Las condiciones conocidas del nivel Fernbach son las siguientes: (22):

Volumen de medio	1.0 l.
Harina de barbasco	20.0 g
Tween-80	0.2 % (V/V)
Inóculo	0.5 U.de D.O./ml
Agitación	160.0 RPM (plataforma rotatoria)
pH inicial	8.0 (sin control durante desarrollo)
Tiempo de fermentación	7 días
Aereación	sistema cerrado (relación volumen de aire/ volumen de medio)

Las condiciones que se establecen a nivel de 10 lt. son las siguientes:

Volumen de medio	10.0 lts.
Harina de barbasco	200.0 g
Tween-80	0.2 %
Inóculo	0.7 U.D.O./ml
Agitación	250 rpm (por turbina)
pH	8 (constante)
tiempo de fermentación	7 días
Aereación	0.5 VVM
Esterilidad	Proceso estéril.

V.3. Elección del pH.

La elección de un pH = 8 obedece a estudios previos - realizados por nuestro grupo de trabajo, en los cuales se determinó el pH de mayor actividad sobre saponinas y mayor producción de diosgenina, encontrándose que este pH era el óptimo; cabe aclarar, que el Aureobasidium sp (H-18) tiene un amplio margen de pH en el cual puede crecer incluyendo este valor. (22)

V.4. Condiciones de aereación.

La aereación se da exclusivamente porque el hongo crece en un medio aerobio; y el hecho de establecer un flujo de - aereación de 0.5 VVM en las fermentaciones es solamente empírico, quedando como punto de optimización posterior este parámetro; sin embargo, la necesidad de aereación a nivel de 10.0

litros se deduce de los experimentos a nivel Fernbach, en los cuales, la relación de superficie de intercambio gaseoso -- (volumen de aire/volumen de medio -inicial-) es mayor que en una jarra de 10.0 lts., por lo que la aereación por burbujeo tiende a mantener esta relación llamada KL_A definida como "coeficiente de transferencia volumétrica de oxígeno", el cual no es calculado en estos trabajos por estar fuera de los objetivos primarios del proyecto.

V.5. Condiciones de agitación.

La agitación en el nivel de 10.0 lts. se estableció a 250 rpm. empíricamente, tomando como base el criterio de "mínima agitación suficiente para evitar la sedimentación de sólidos", ya que el exceso de agitación trae consigo una mayor evaporación de agua, acentuada ésta por el burbujeo de la aereación, lo cual no es conveniente, pues altera las condiciones de concentración de sustrato e inóculo previamente establecidas.

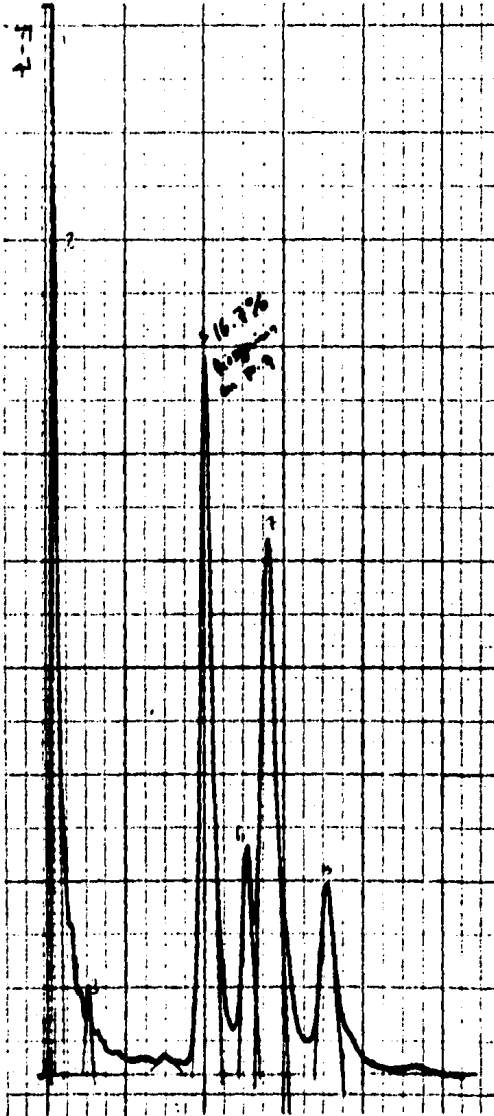
V.6. Efecto de la esterilidad previa.

La importancia de la esterilización se justifica sólo cuando es imprescindible para obtener buenos resultados en un proceso; si no fuera por esto, no valdría la pena pensar en un gasto de esta naturaleza (calderas, líneas de vapor, etc.); sobre todo, si se piensa en la posibilidad de llevar dicho -- proceso a escala industrial.

Tabla V.6.1. Efecto de la esterilidad previa.

Parámetros de evaluación	Fermentaciones No estériles.		Fermentaciones Estériles.	
	F-7	F-8	F-9	F-10
Sólidos recuperados. g inicial 200 g = 100%	168.0 (84%)	168.0 (84%)	137.5 (68.75%)	170.7 (85.35%)
Peso de residuos aceitosos g	9.1	9.1	7.56	9.8
% de diosgenina, según C.G. (aproximado)	16.7	28.1 $\bar{x}=22.4$	45.33	55.0 $\bar{x}=50.2$
Rendimiento %	0.76	1.3	1.71	2.8
Producción de espuma	++++	++++	++	++
Viscosidad aparente	++	++	+++	+++

Cromatograma V.6.1



Fermentación F-7 no estéril; diosgenina = 16.7%

Para verificar la influencia de la esterilidad se llevaron a cabo 4 fermentaciones a nivel de 10 l.; dos estériles y dos no estériles. Las condiciones de no esterilidad consisten en utilizar todos los materiales y reactivos naturalmente; y la adición del inóculo sin precauciones de asepsia. En este caso, se pudieron observar diferencias, tanto durante el proceso como en los rendimientos entre las fermentaciones estériles y las no estériles.

Durante el proceso no estéril, se produjo una gran cantidad de espuma que no era controlada fácilmente con el antiespumante; la consistencia de la suspensión de fermentación difería entre procesos; en sus características organolépticas particularmente en el color, olor y viscosidad aparente. Los sobrenadantes y los sólidos del proceso no estéril, presentaron menor cantidad de extractos que contenían diosgenina; la cual a su vez, se encontraba en menor cantidad en comparación con el proceso estéril, el cual presentaba durante su desarrollo, una apariencia más viscosa, con menos espuma y un olor y color característicos; además de esto, los rendimientos de los extractos eran mayores, y el porcentaje de diosgenina relativo aproximado también era mayor que en el proceso no estéril.

Para hacer las apreciaciones de los contenidos de diosgenina en los extractos aceitosos, se mantuvieron condiciones iguales en el tratamiento de las muestras, para que las comparaciones, aunque no cuantitativas, fueran válidas; se hicieron de la siguiente manera: La extracción en Soxhlet se llevó a cabo con pesos totales conocidos de los sólidos recuperados durante tiempos iguales; los residuos acei-

tosos fueron obtenidos en las mismas condiciones de evaporación; y finalmente fueron aforados a volúmenes iguales para después, a partir de estas diluciones representativas se cada fermentación, inyectar al cromatografo de gases 2 microlitros, con lo que obtuvieron los cromatogramas respectivos, en los que se puede ver el efecto de la esterilidad sobre el rendimiento de la diosgenina en las diferentes fermentaciones.

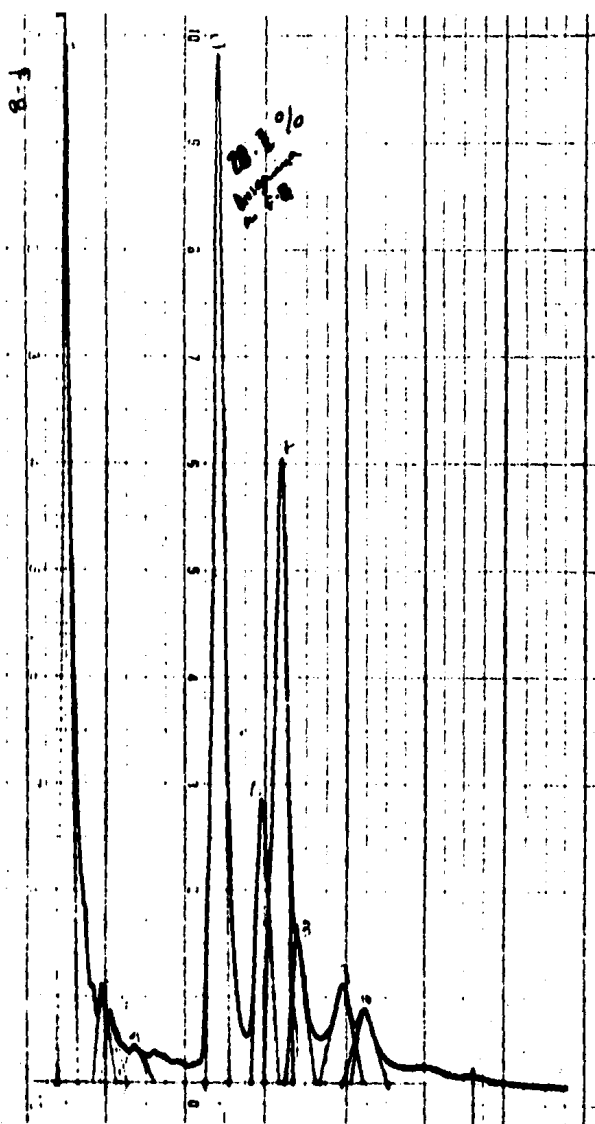
En los cromatogramas comparativos de las fermentaciones no estériles (F-7 y F-8) y estériles (F-9 y F-10) se utilizaron diferentes programas de aumento lineal de temperatura en el cromatografo de gases a fin de obtener la mejor resolución de las muestras, por lo que los picos correspondientes a la diosgenina aparecen a tiempos de retención más largos y diferentes entre sí. Se determinaron las composiciones porcentuales de cada muestra utilizando el procedimiento descrito en la sección IV.12. (cromatogramas V.6.1. al V.6.4.)

Las fermentaciones F-7 y F-8 rinden menores proporciones de diosgenina que las fermentaciones F-9 y F-10 habiéndose efectuado las dos primeras de manera no estéril, y las dos últimas estériles.

La tabla V.6.1. muestra las diferencias observadas entre el proceso estéril y el no estéril.

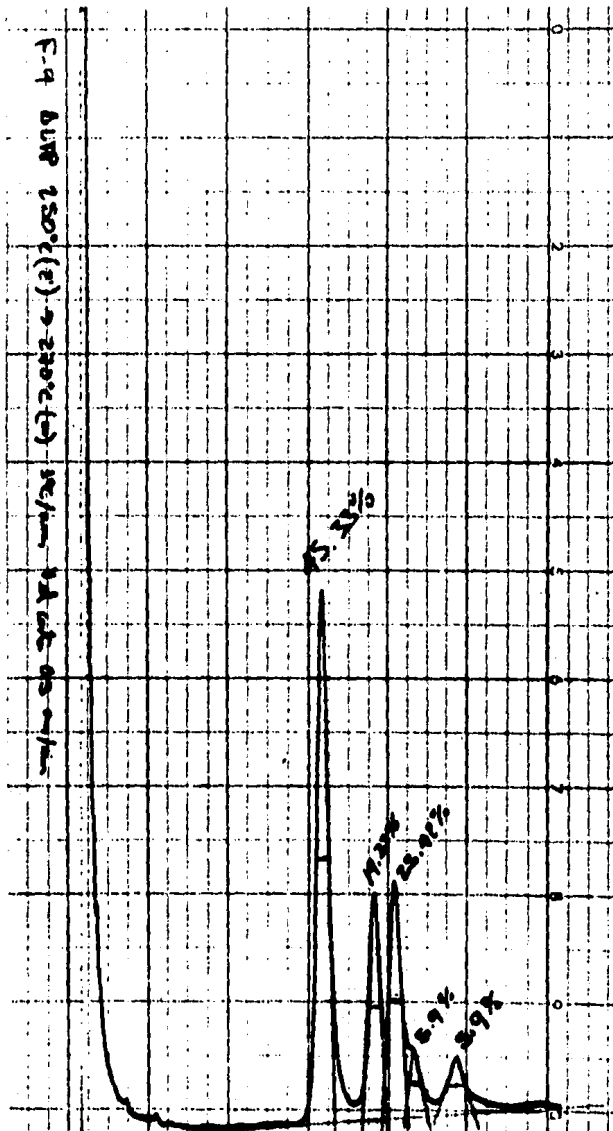
De estos resultados, se hizo evidente la necesidad de esterilizar el fermentador al inicio del proceso.

Cromatograma V.6.2



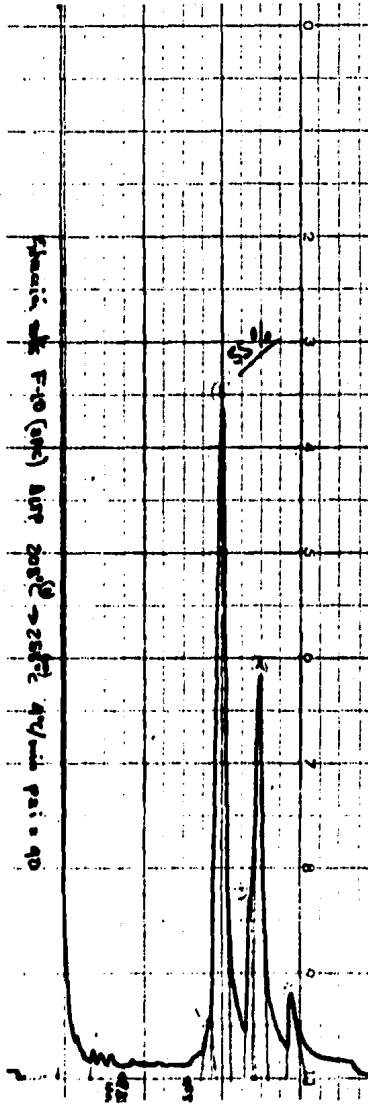
Fermentación F-8 no estéril; diosgenina = 28.1%

Cromatograma V.6.3



Fermentación F-9 estéril; diosgenina = 45.3%

Cromatograma V.6.4 .



Fermentación F-10 estéril; diosgenina = 55%

V.7. Extracción de sobrenadantes.

La extracción de los sobrenadantes tiene como objeto verificar la presencia de diosgenina en los líquidos de la fermentación; aunque de antemano sabemos que la diosgenina es muy poco soluble en agua. (28)

Se llevaron a cabo extracciones de un volumen determinado de cada fermentación siguiendo la técnica de la sección IV.10..

En general se encontró de nada a muy poca diosgenina en los extractos acuosos; cuyos residuos aceitosos en ningún caso pesaron más de 5.0 g por lt. de sobrenadante, por lo que se consideraron estas fracciones acuosas despreciables, tomando en consideración el trabajo y el gasto que implicaban dichas extracciones; por esta razón, se orientan los esfuerzos a la búsqueda y recuperación de la diosgenina en la fracción de sólidos, coincidiendo esto con los resultados de Rothrock (24).

V.8. Extracción de sólidos.

El fundamento de la extracción de sólidos reside en la mayor probabilidad de encontrar a la diosgenina en estas fracciones por ser muy poco soluble en agua. (24, 28).

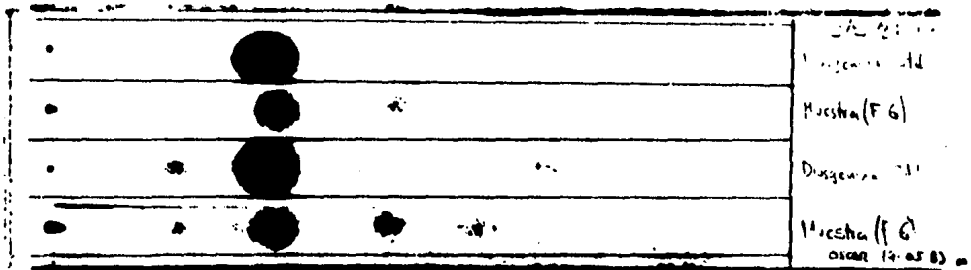
Se intentaron extracciones de los sólidos con varios solventes diferentes al n-hexano, tales como el cloroformo y acetato de etilo, presentando en ambos casos inconvenientes por la calidad de los residuos aceitosos obtenidos con estos solventes, por lo que se deben usar solventes no polares como el n-hexano, n-heptano o éter de petróleo.

Todas las extracciones se llevaron a cabo como se indica en la sección IV.9.

Como se puede ver en las fotografías V.8.1. a la V.8.5. en la extracción de los sólidos, la diosgenina viene acompañada de tres compuestos menos polares que en algunos casos, por el tamaño relativo de las manchas, son tan importantes como la diosgenina.

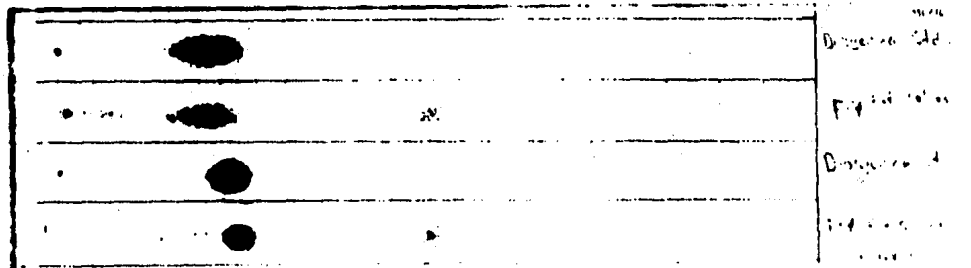
En estos extractos, la diosgenina también viene acompañada de por lo menos dos compuestos más polares pero en menor proporción.

De estos compuestos que acompañan a la diosgenina, sólo se conoce la identidad de uno de los compuestos más polares que ella; se trata de la penogenina, cuya mancha corresponde a la primera a la izquierda de la diosgenina en las fotografías. Esto se deduce de su Rf. que corresponde al mismo que el de la mancha de nuestro estándar, del cual sabemos que contiene penogenina.



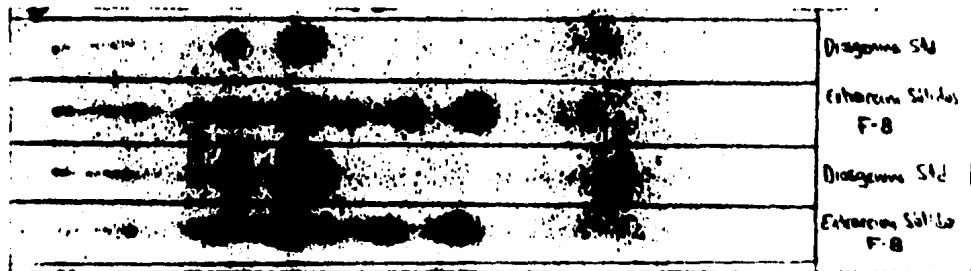
21-2-11
 1. Inyección Sd
 Muestra (F 6)
 Diagenesis Sd
 Muestra (F 6)
 Oscar (19-05-83)

Fotografía V.8.1. Fermentación F-6



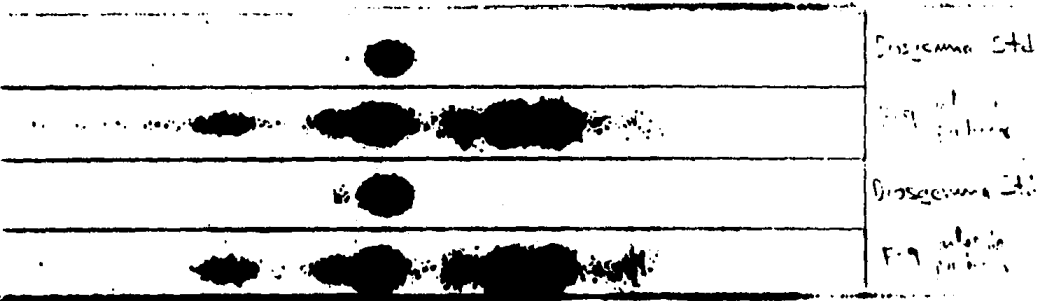
Diagenesis Sd
 F. 6
 Diagenesis Sd
 Sd

Fotografía V.8.2. Fermentación F-7



Diagenesis Sd
 Extracción Sólida
 F-8
 Diagenesis Sd
 Extracción Sólida
 F-8

Fotografía V.8.3. Fermentación F-8



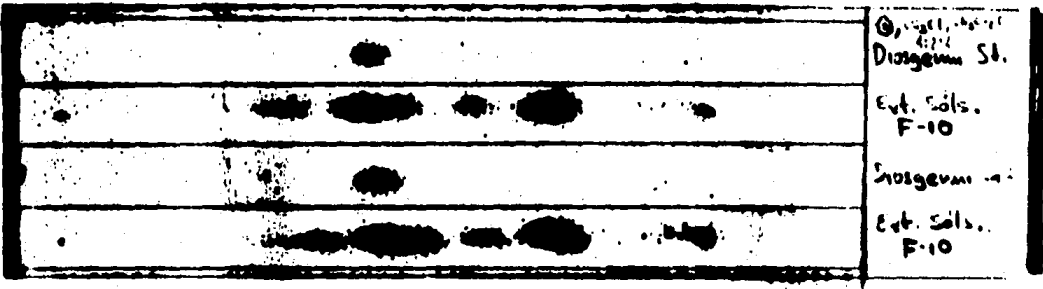
Disyeme Std

F-9

Disyeme Std

F-9

Fotografía V.8.4. Fermentación F-9



Disyeme Std

Ext. Sols.
F-10

Disyeme Std

Ext. Sols.
F-10

Fotografía V.8.5 Fermentación F-10



Residuos H.L.

Disyeme Std

Residuos H.L.

Disyeme Std

Fotografía V.8.6. Residuos de la hidrólisis ácida.

V.9. Purificación por cromatografía en columna.

Debido a la naturaleza de los residuos aceitosos obtenidos de las extracciones de sólidos provenientes de las fermentaciones, en los cuales se observa la imposibilidad de cristalizar la diosgenina directamente, ya que ésta se encuentra -- acompañada de varios compuestos en proporciones relativamente elevadas, además de la presencia de algunos aceites; se decidió desarrollar un sistema de purificación por cromatografía en columna, a fin de liberar a la diosgenina de los compuestos contaminantes y poderla recuperar de la manera más pura posible.

En los residuos provenientes de las fermentaciones, el porcentaje de diosgenina es menor que en los residuos de la hidrólisis ácida; como ejemplo tenemos, que el máximo porcentaje obtenido de diosgenina en un residuo de fermentación se alcanzó en la fermentación F-10 con un 55%; mientras que en los residuos de la hidrólisis ácida se llegó a encontrar hasta en un 90.4%. (ver cromatogramas V.9.3. y V.6.4-b.).

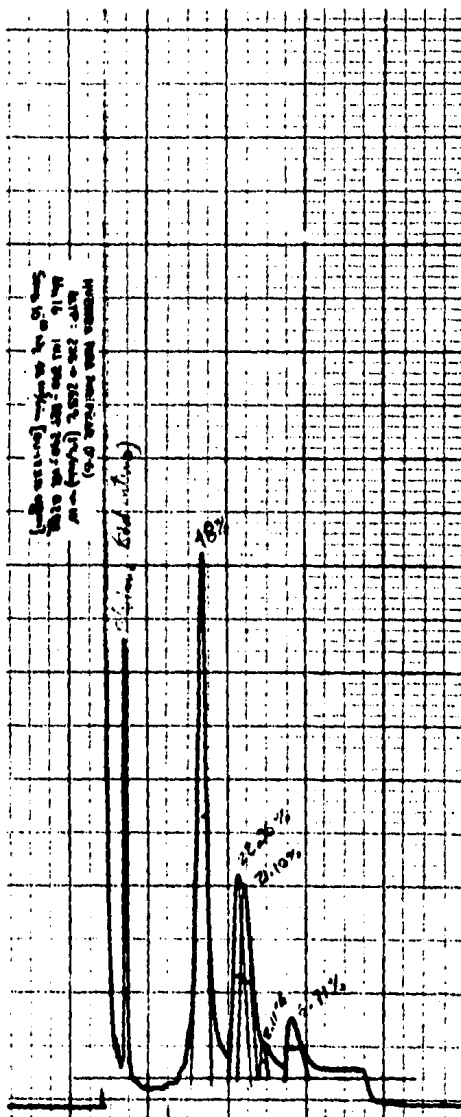
Se ensayaron varios sistemas de solventes, resultando - el sistema descrito en la sección IV.13. el más adecuado para purificar a la diosgenina a partir de los residuos aceitosos; sin embargo, encontramos que la eficiencia de este sistema es variable de acuerdo a las condiciones en que se lleve a cabo, particularmente en lo se refiere a la naturaleza y a la cantidad de la muestra. En este sentido, se pueden ver los resultados obtenidos en la purificación de un residuo "bimble" como - es el de la hidrólisis ácida, y los obtenidos de la purifica-

ción de un residuo "complejo" como el de una fermentación. - (ver cromatogramas V.8.6., V.8.3. y V.8.4.).

La cromatografía en columna de residuos de fermentación que se presenta, se llevó a cabo con los residuos de la fermentación F-6 en los cuales, la diosgenina se encontró en un 48%. Después de pasar por la columna y recristalizarse se logró aumentar su pureza hasta en un 85%. (ver cromatogramas V.9.1. y V.9.2.).

Los mejores resultados del sistema de cromatografía en columna, se observaron al purificar los residuos "simples" de la hidrólisis ácida (H.A.) en los que originalmente se encontraba la diosgenina en un 90.4%. Después de la purificación y la cristalización se logró aumentar su pureza hasta un 99.9%. (Ver cromatogramas V.9.3. y V.9.4.); obteniéndose un perfil de elución muy aceptable en el que se puede apreciar la salida de compuestos menos polares que la diosgenina en las primeras fracciones; luego, la elución gradual de la diosgenina y finalmente, la elución de compuestos más polares que la diosgenina. (Ver cromatogramas V.9.5-a al V.9.5-c.).

Cromatograma V.9.1.



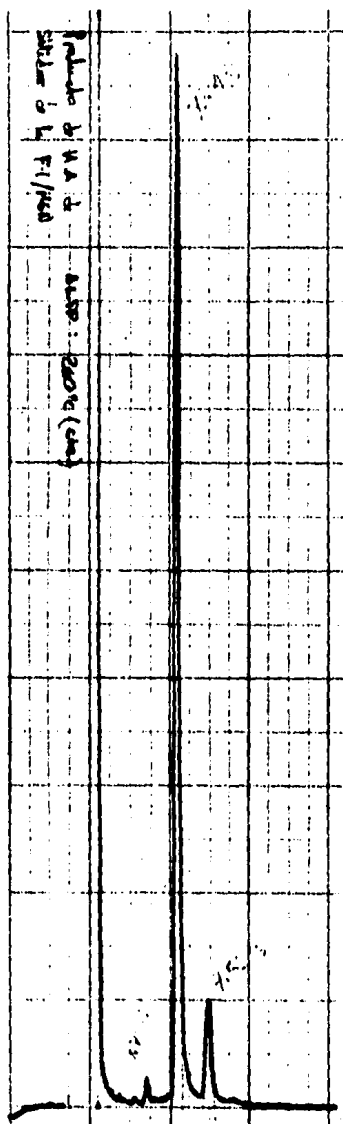
Componentes del residuo de fermentación F-6
 diosgenina = 48%.

Cromatograma V.9.2.



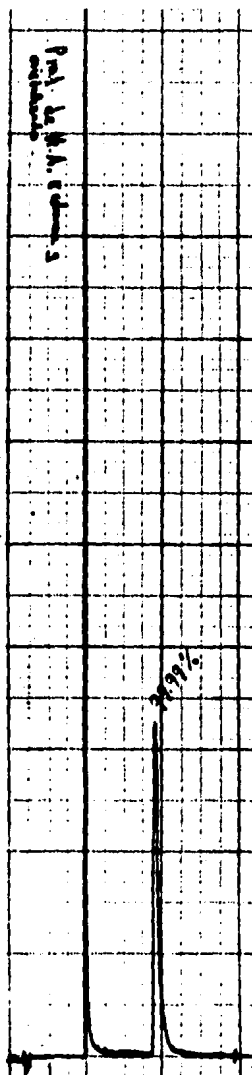
Producto F-6 purificado; diosgenina= 85.3%

Comatograma V.9.3.



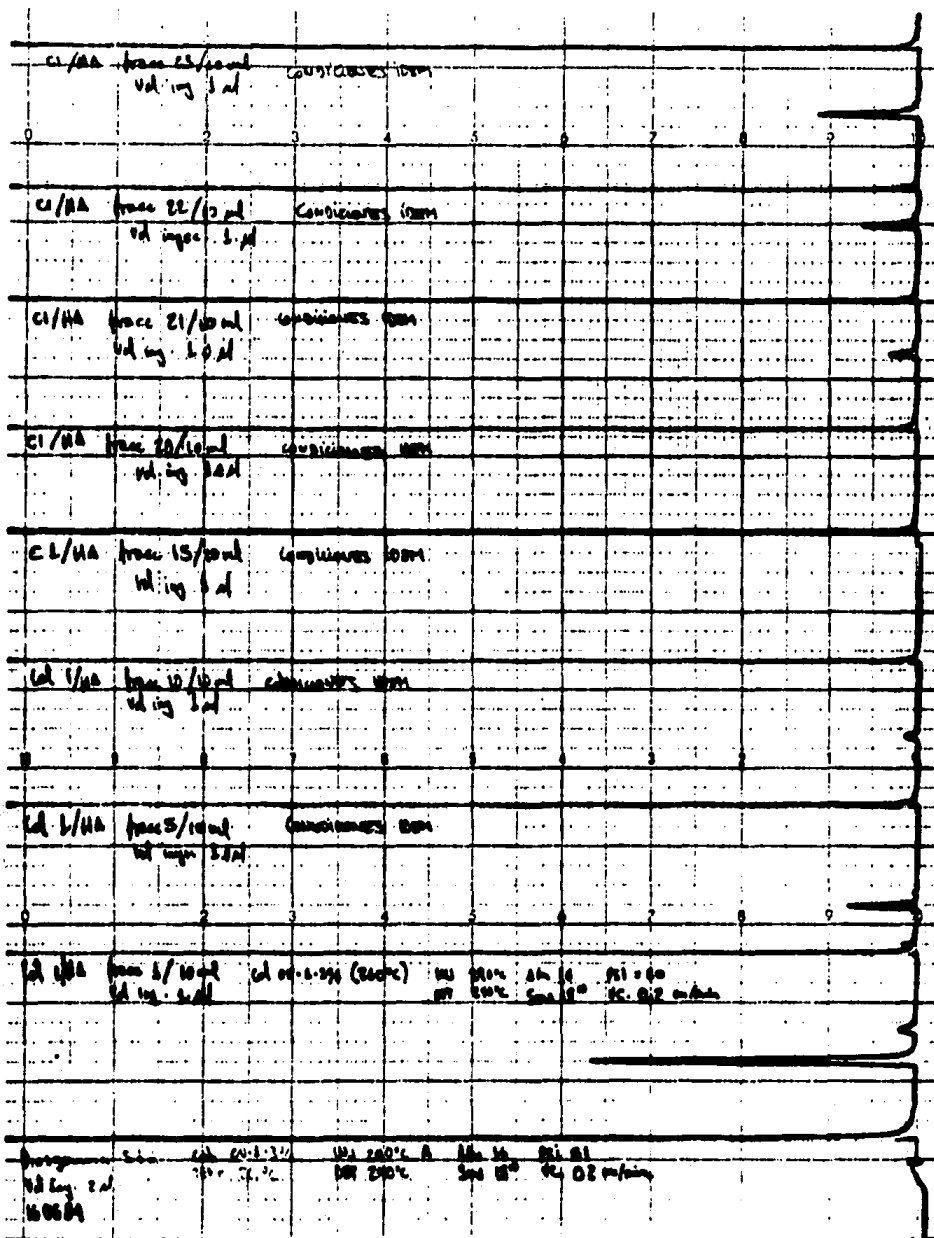
Componentes del residuo de la hidrólisis ácida
(residuo simple)

Cromatograma V.9.4.

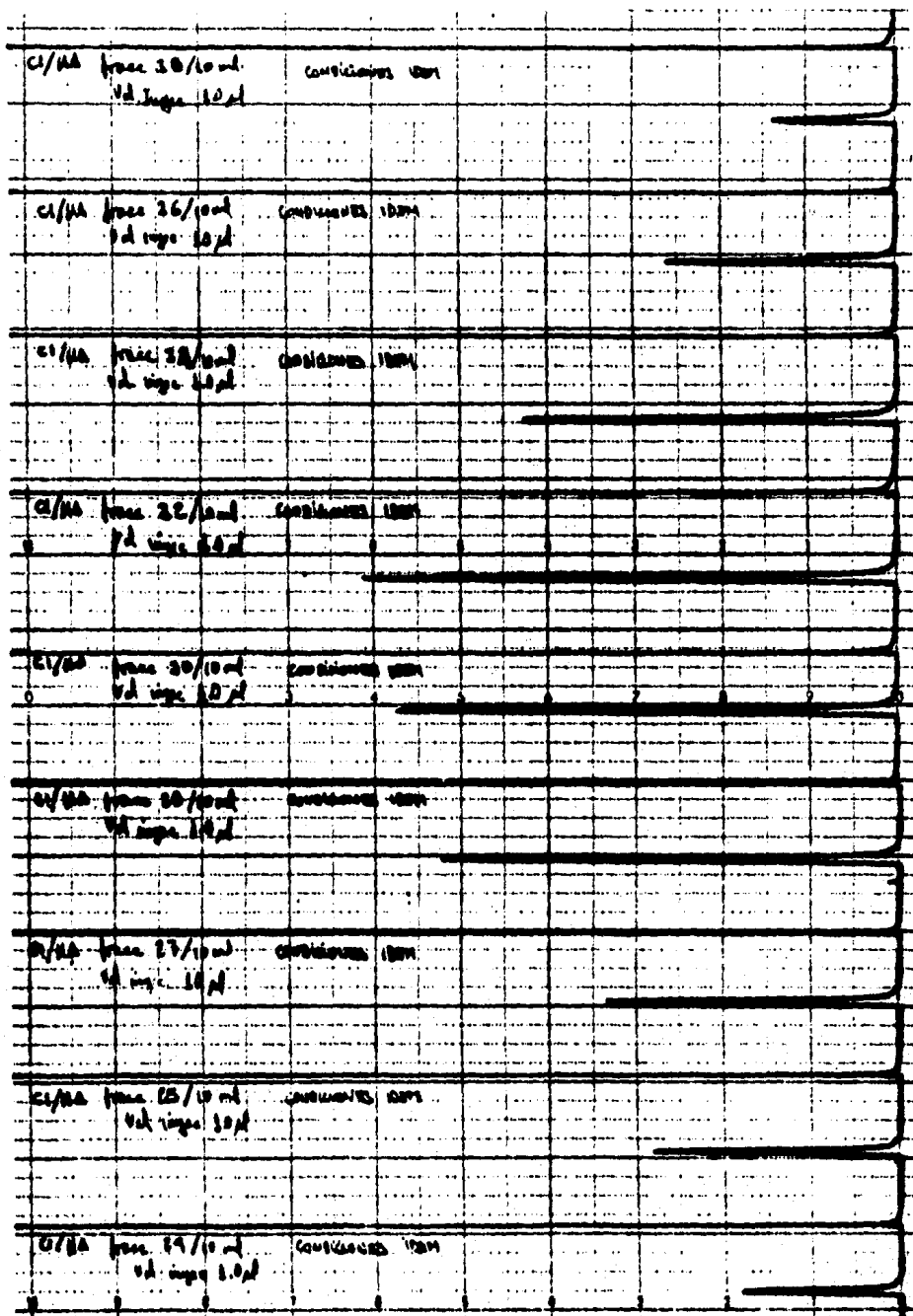


Producto H.A. purificado; diosgenina = 99.9 %

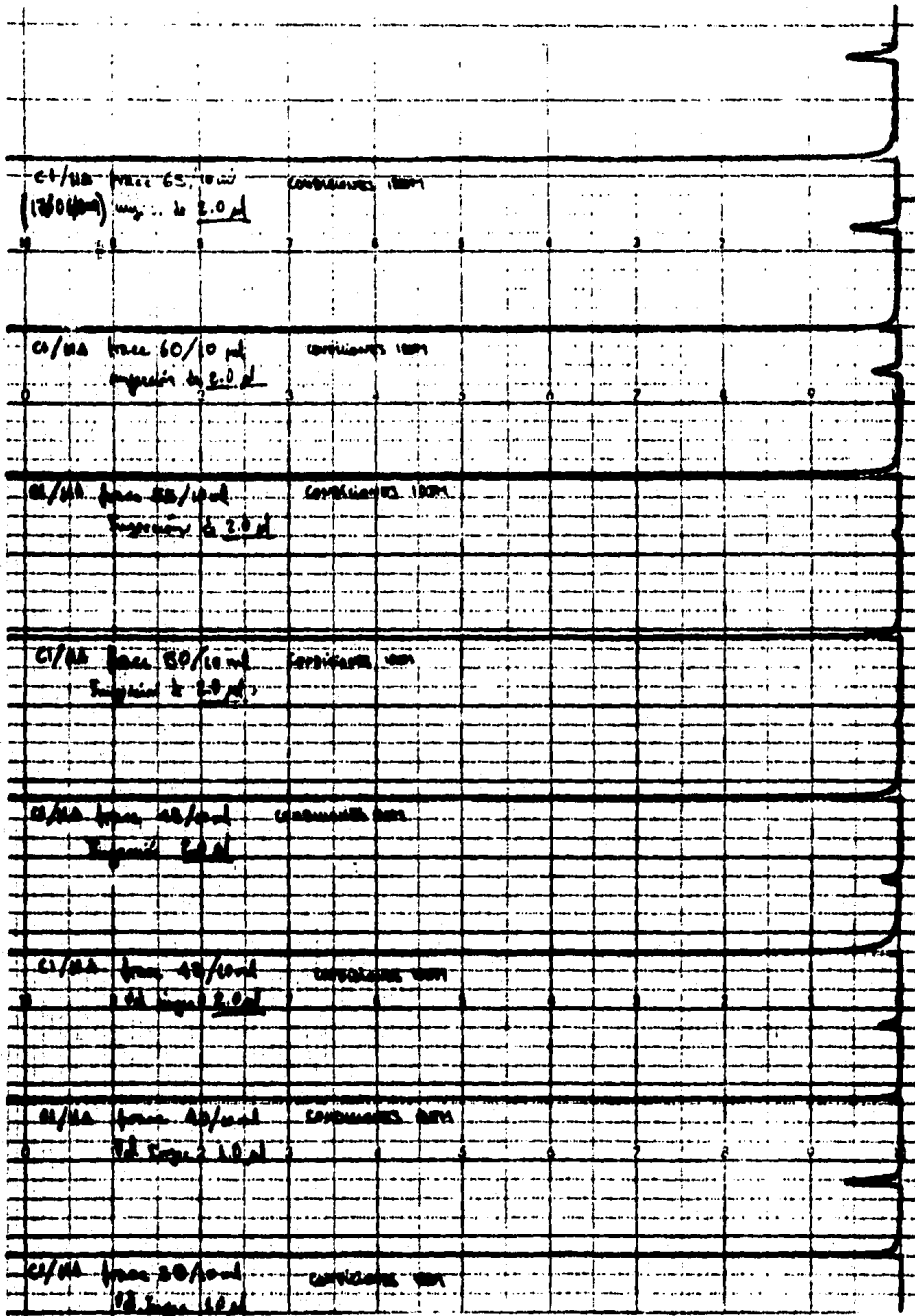
Cromatograma V.9.5-a. Perfil de elución de la cromatografía en columna de residuos de la hidrólisis ácida.



Cromatograma V.9.5-b. Continuación del perfil de elución.



Cromatograma V.9.5-c. Continuación del perfil de elución.



V.10. Cristalización

La cristalización y recristalización se llevaron a cabo según se indica en las secciones IV.14.

Para calcular el rendimiento de la cristalización se tomó como base el "rendimiento teórico esperado" el cual se conoce a partir del contenido de diosgenina en los residuos - - aceitosos según demuestran las cromatografías de gases. Así en la hidrólisis ácida y en la hidrólisis por enzimas se determinó de la siguiente manera:

Hidrólisis ácida:

Se hidrolizaron 10 g de harina de barbasco que equivalen al 100% de producto inicial, y se obtuvieron 0.4 g de residuos aceitosos con un contenido de diosgenina según cromatografía de gases de 90.4%, por lo que el contenido teórico del residuo es:

$$0.4 \times 0.904 = 0.361 \text{ g de diosgenina (teórico esperado de proceso)}$$

De aquí se calcula el rendimiento del procedimiento:

$$\begin{array}{r} 10 \text{ g} \text{ ————— } 100\% \\ 0.361 \text{ g} \text{ ————— } X\% \end{array}$$

Donde X resulta igual a 3.61%

que es el rendimiento global del procedimiento de hidrólisis ácida.

Después de la purificación por cromatografía en colum-

na y la recristalización, se obtuvieron 0.254 g de cristales con un 99.99% de pureza según la cromatografía de gases (p.f. 200 - 203°C), por lo que el contenido teórico es:

$$0.254 \times 0.9999 \quad \underline{\underline{0.254}} \text{ g de diosgenina obtenidos}$$

De aquí se calcula el rendimiento de la cristalización y purificación:

$$0.361 \text{ g} \text{ ——— } 100\%$$

$$0.254 \text{ g} \text{ ——— } X\%$$

Donde X resulta igual a 70.5 % de rendimiento en la purificación y recristalización.

Para el caso de los residuos de fermentación se explican los resultados de la fermentación F.6:

Se obtuvieron 12.83 g de residuos acitosos con un contenido de diosgenina según cromatografía de gases de 48%, esto significa que el contenido teórico del residuo es:

$$12.83 \times 0.48 = \underline{\underline{6.2}} \text{ g de diosgenina (teórico esperado del procedimiento)}$$

de aquí se calcula el rendimiento del procedimiento:

La fermentación F.6 de llevó a cabo con 200 g iniciales de harina de barbasco lo que equivale al 100%

$$200 \text{ g} \text{ ——— } 100\%$$

$$6.2 \text{ g} \text{ ——— } X\%$$

(diosgenina
antes de
purificar)

$$X = \underline{\underline{3.1\%}}$$

que es el rendimiento global del procedimiento de hidrólisis enzimática.

De los 12.83 g de residuos obtenidos de la fermentación F-6 se tomaron 3.5 g para purificar por cromatografía en columna, esto equivale a :

$$3.5 \text{ g} \times 0.48 = \underline{1.68 \text{ g}} \text{ de diosgenina (teórico esperado para la purificación y cristalización).}$$

Después de purificar por cromatografía en columna y cristalizar se obtuvieron 0.897 g de cristales con un 85.3 % de pureza según cromatografía de gases (p.f. 190 - 193°C), de aquí se calcula el rendimiento en la purificación y cristalización:

$$0.897 \text{ g} \times 0.853 = \underline{0.765 \text{ g}} \text{ de diosgenina}$$

$$\begin{array}{l} \text{Si: } 1.68 \text{ g} \text{ ——— } 100\% \text{ (teórico esperado a partir de los 3.5g} \\ \quad 0.765 \text{ g} \text{ ——— } x \quad \quad \quad \text{utilizados)} \end{array}$$

Donde X resulta ser igual a 45.5%

que es el rendimiento de la purificación y cristalización.

De estos resultados se puede comparar en primer lugar, los rendimientos entre los dos procedimientos (hidrólisis ácida y enzimática); y en segundo lugar los rendimientos de purificación y cristalización que muestran el efecto de la complejidad del residuo en la eficiencia de los sistemas de purificación por cromatografía en columna y cristalización, lo cual se resume en la tabla (V.10.1.).

Tabla V.10.1. Diferencias entre los procedimientos de hidrólisis y purificación de residuos de hidrólisis ácida y enzimática.

	H.A.	F-6
Peso de harina de barbasco inicial.	10.0 g	200.0 g
Peso de residuos aceitosos extraídos.	0.4 g	12.83 g
Porcentaje de diosgenina en residuos.	90.4%	48.0%
Rendimiento teórico del procedimiento.	3.61% [♦]	3.10% [♦]
Peso del residuo por cromatografiar en columna.	0.4 g	3.5 g
Cantidad de cristales teóricamente esperados	0.361 g	1.68 g
Peso de cristales obtenidos después de purificación y cristalización.	0.254 g	0.897 g
Pureza de los cristales obtenidos.	99.9 %	85.3 %
Punto de fusión.	200-203°C	190-193°C
Rendimiento en la purificación.	70.5 % [♦]	45.5 % [♦]

♦ = datos significativos

VI. Discusión.

Como se ha podido ver en los resultados de este trabajo, existen diversos puntos que pueden ser discutidos, tales como las posibles ventajas de un proceso fermentativo para la hidrólisis de las saponinas del barbasco, en relación al procedimiento de hidrólisis ácida, los rendimientos, la calidad del producto, las dificultades, ventajas y beneficios de cada procedimiento.

En los resultados finales encontramos que los rendimientos globales de los procedimientos fermentativos y químicos antes de la purificación no difieren grandemente entre sí: ver cuadro V.10.1.; sin embargo existe la dificultad de la naturaleza compleja de los residuos de extracción de los sólidos provenientes de la fermentación, que origina una disminución en el rendimiento y en la calidad del producto.

Por lo anterior fué necesario proponer que la presencia de productos colaterales puede ser debida a cambios de la actividad del microorganismo sobre las saponinas u otros sustratos, lo que inicialmente sucedía en menor proporción.

Si analizamos las cromatografías V.8.1. a la V.8.5., podemos comprobar que la composición de los residuos es variable de fermentación a fermentación, al mismo tiempo que varía la proporción de los componentes. De este modo vemos, que en la fermentación F-6 (cromatografía V.8.1.) hay menos cantidad de los contaminantes; mientras que en la fermentación F-9 (cromatografía V.8.4.) la presencia de dos compuestos menos polares es muy marcada.

A raíz de las observaciones anteriores, relacionamos - estos resultados con un cambio que presentó nuestra cepa de tarbajo, el H-18, la cual por algún motivo desconocido, empezó a manifestar un comportamiento morfológico inestable, por lo que probablemente haya dado origen a un cambio en su metabolismo que condujo a la mayor producción de dichos compuestos, colaterales en relación a la diosgenina en las fermentaciones.

Ante este hecho, es necesario remarcar la necesidad de optimizar un sistema biológico estable que pueda permitir la hidrólisis de las saponinas de una manera más específica y eficiente.

La idea de optimizar un procedimiento biotecnológico para la obtención de diosgenina puede resultar en un trabajo - que contemplaría las posibilidades de mejora en cada una de las diferentes etapas del procedimiento que podrían describirse de la siguiente manera:

I. Parte microbiológica.

a) Búsqueda de cepas con mayor capacidad de producción de enzimas saponinolíticas.

b) mejoramiento de medios de cultivo, tal que incluyan inductores de la síntesis de las enzimas saponinolíticas.

c) Comprobar posibles mejoras al combinar diferentes cepas de microorganismos productores de enzimas saponinolíticas.

d) Mejoramiento de cepas por procedimientos diversos como la selección de cepas mutantes.

II. Parte fermentativa.

- a) establecimiento de mejores condiciones en la materia prima (tamaño de partícula, limpieza, calidad natural, etc.)
- b) Influencia de los adyuvantes del medio de fermentación (tensoactivos).
- c) calidad nutritiva del medio de fermentación. (capacidad de satisfacer los requerimientos del microorganismo).
- d) condiciones de operación (aereación, agitación, tiempo de fermentación, etc.)

III. Parte de extracción y purificación.

- a) Optimización del sistema de recuperación de sólidos.
- b) Posibilidad de cristalizar directamente sin necesidad de purificar por columna.

Suponiendo que se encuentra el sistema biológico óptimo, queda la posibilidad de mejorar los sistemas de fermentación, tanto con respecto al proceso como a otras etapas del procedimiento, se pueden mencionar variantes como la naturaleza del sustrato, el cual bien podría no ser la harina del barbasco como tal, sino que podría ser un extracto de saponinas enriquecido con los nutrientes específicos del microorganismo, - pues de esta manera se eliminarían los aceites y resinas que contiene el barbasco, los cuales en un momento dado, pueden ser origen de subproductos que complican la purificación de la diosgenina a partir de los caldos de fermentación. Esto es considerando que la purificación de un producto a partir de

los medios de fermentación es un factor crítico en muchos procesos; por lo cual puede ser de especial interés buscar la manera de reducir la complejidad de los sustratos a fin de simplificar la recuperación de los productos.

A raíz de los resultados de este trabajo, ha nacido la inquietud de identificar a los compuestos que acompañan a la diosgenina después de la fermentación con el H-18, ya que cabe la posibilidad de que sean esteroides, y en tal caso será de gran interés conocer su estructura química y la relación con la diosgenina como productos útiles.

En cuanto a las perspectivas de aplicación industrial del procedimiento fermentativo, se puede decir que depende principalmente de las posibles ventajas económicas que pudiera ofrecer con respecto a los métodos tradicionales de hidrólisis.

Uno de los principales criterios de evaluación de un proceso es el rendimiento y la calidad del producto en relación al costo de producción; en este sentido, la alternativa biotecnológica para la hidrólisis de las saponinas del barbasco, en sustitución del método tradicional, puede o no significar una posible reducción en los costos de producción si nos basamos para esta determinación, solamente en las apreciaciones más gruesas, tales como comparar lo que se podría gastar en uno u otro proceso, la calidad del producto y los rendimientos que dan cada uno. No es posible asegurar nada en este sentido, pues es necesario llevar a cabo un estudio más profundo que formalmente defina las posibilidades del proceso.

Este estudio se incluiría o insertaría en lo que se llama "estudio de factibilidad" y que requiere de la solución de muchos puntos entre los que figuran principalmente los siguientes desde el punto de vista del proceso solamente:

Descripción del proceso.

Descripción de instalaciones, equipo y personal.

Calificación del diseño.

Calificación de operación.

Costo total de inversión física.

Costo total de operación y costos unitarios.

Además de estos puntos existen muchos otros que deben ser determinados si se quisiera desarrollar y aplicar el proceso a nivel industrial. Por estos hechos, se puede decir que este trabajo experimental debe encuadrarse en una de las primeras etapas del desarrollo de un paquete tecnológico; es decir, que solo es la idea básica susceptible de optimizarse la que se ha presentado.

VII. Conclusiones.

De manera general se ha planteado, la alternativa biotecnológica a un procedimiento químico; dicha alternativa aún requiere de la optimización en muchas de las etapas del procedimiento, sobre todo en lo que se refiere al sistema biológico, que incluye las características morfológicas y bioquímicas del microorganismo utilizado, y los medios de cultivo y fermentación a fin de presentarse en las mejores condiciones.

Se ha hecho patente la posibilidad de utilizar el potencial bioquímico de los microorganismos para llevar a cabo reacciones químicas por medio de sus enzimas de una manera que puede ser, según las circunstancias, más conveniente que algunos métodos tradicionales de transformación química, pero que también quedan algunos problemas por resolver, como pueden ser la facilidad de recuperación del producto a partir de los medios de fermentación y la elección de un microorganismo genéticamente estable, altamente selectivo y eficiente en la hidrólisis de las saponinas.

En cuanto a la factibilidad de aplicación industrial, queda mucho por hacer para poderla definir, pues para ello es necesario haber optimizado el procedimiento, y sobre esto, llevar a cabo los estudios formales de factibilidad.

Por otra parte, se puede decir que cualquier proyecto que contemple incrementar la oferta de diosgenina en el mercado de materias primas de esteroides, tanto a nivel nacional como internacional, debe considerar que existe un panorama muy difícil, pero que vale la pena intentarlo, sobre todo, por que se

tienen los medios suficientes desde el punto de vista "recursos" y que por lo pronto sería suficiente promover una buena administración de ellos, puesto que la demanda de los productos esteroides derivados de la diosgenina y productos similares, va en aumento en función de diversos factores ya mencionados, no teniendo aparentemente ningún límite a mediano y largo plazo.

Finalmente, es importante remarcar la necesidad del desarrollo tecnológico, tal que permita la producción y comercialización a mayor escala de productos terminados o finales, pues teniendo la materia prima en cantidades suficientes, se antoja posible la integración de una poderosa industria de esteroides, capaz de competir ventajosamente a nivel internacional, contrayendo los beneficios obvios a la economía del país.

BIBLIOGRAFIA

1. Asociación de Fabricantes de Esteroides, A.C. Noviembre 1974. La Industria de Hormonas Esteroides en México.
2. Cristina Gonzalez Sotelo. Comercialización y Desarrollo de Barbasco y sus Derivados. Tesis, Escuela Superior de Comercio y Administración, IPN. 1984
3. Carmen Shurizza. Director técnico. Proquivemex S.A. comunicación personal. 1984.
4. Manuel Puebla. La borrasca del Barbasco. Expansión. 15 de febrero 1978.
5. Arturo Romero Sanchez. La dependencia de la industria químico-Farmacéutica, el caso del Barbasco. Tesis. UNAM. 1978.
6. Yair Aharonowitz y Gerald Cohen. Producción Microbiológica de Fármacos. Investigación y Ciencia, edición en español de Scientific American. No. 62, Noviembre 1981.
7. Braulio Morales. Director de planta. Proquivemex S.A. Comunicación personal. 1984.
8. Oscar García C. Investigación de Campo en el beneficio primario de Sn. Pedro Limón, Edo. de México. Reporte personal. 1984.
9. Sigma Chemical Co. General Catalog. Price List. Feb. 1984.
10. White, Handler y Smith. Principios de Bioquímica. Cap.4 - Los Lípidos. Traducción de la 4a. edición en Inglés. Ediciones del Castillo. 1968.

11. W. Klyne. Química de los Esteroides. Cap 8. Esteroides de origen natural, Saponinas. Compañía Editorial Continental 1970.
12. H. Iizuka & A. Naito. Microbial Conversion of Steroids and Alkaloids. University of Tokio Press. 1981.
13. Klaus Kieslich. Microbial Transformation of Non-Steroids Cyclic compounds. John Wiley & Sons. Georg Thieme Publishers. 1980.
14. Francisco Villasid A. Biotecnología de Esteroides. Foro de Prospección de Esteroides. Sociedad Química de México. Julio, 1984.
15. El Barbasco Mexicano. Condiciones y perspectivas para su Aprovechamiento. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. 1981.
16. Maximino Martínez. Catálogo de Nombres Científicos y Vulgares de las Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. 1978.
17. Vademecum Forestal Mexicano. Dirección General de Información y Sistema Forestal. 1980.
18. Salvador Bueno Horna. Anteproyecto de una Planta para extracción de Diosgenina a partir de la Raíz del Barbasco. Tesis, UNAM. 1960.
19. R.E. Marker, D.L. Turner, R.B. Warner and P.R. Ulshafer. Sterols. CXVI. Sapogenins XLV. The Isosarsapogenin configuration. J. Am. Chem. Soc. 63 772 (1940).

R.E. Marker, D.L. Turner, R.B. Warner and P.R. Ulshafer. Sterols CXVII. Sapogenins XLVI. The Structure of Pseudo-sapogenins. *J. Am. Chem. Soc.* 63. 774 (1940).

R.E. Marker, D.L. Turner and P.R. Ulshafer. Sterols CXLVIII. Sapogenins LXII. The Structure of the Side Chain in the Dihydropseudosapogenins. *J. Am. Chem. Soc.* 64 1655 (1942).

20. Kawasaki, T., Yamnchi. *Chem. Pharm. Bull. Japan* 16 1070 (1968).
21. Espejo, O., J. Campos-Llavot, H. Jung., F. Giral. *Phytochem.* 21 413 (1982).
22. B.P. gonzalez, A.Cea, A. Gilbón, J.E. Herz and C. Huitrón. Selective Cleavage of the Saponins of Barbasco by Extracellular Enzymes. 184th. National American Chemical Society Meeting, Kansas City. M.O. U.S.A. September 12-17, 1982.
23. Krider, M.M., T.C. Gordon, M.E. Wall. Hydrolysis of Salpha, 22a-Spirostane glycosides by Fungal Saponases. *J. Am. Chem. Soc.* 76 3515 (1954).
24. J.W. Rothrock, T.H. Stoudt and J.D. Gaber. Isolation of Diosgenin by Microbial Hydrolysis of Sapogenins. *Arch. Biochem. Biophys.* 57 151 (1955).
25. Guillermo Rosas Alacazar. Identificación y Cuantificación de Productos Farmacéuticos por Cromatografía de Gases. Tesis U.N.A.E.M. 1977.

26. Manual de procedimientos. Método de control de calidad PQ-1. Análisis Cuantitativo por Cromatografía de Gases. Nombre Genérico: Barbasco. Productos Químicos Vegetales Mexicanos, S.A. de C.V. 1978.
27. Manual de Procedimientos. Método de control de calidad PQ-19. Extracción de Saponinas. Nombre Genérico: Barbasco Seco Molido. Productos Químicos Vegetales Mexicanos, S.A. de C.V. 1978.
28. Index Merck 9th. Ed. pp. 3296.
29. Idem. ref. 28. pp. 967.
30. Organización Mundial de las Naciones Unidas. Year Book International Trade. Vol.2, 1981.
31. Anuarios de Instituto Mexicano de Comercio Exterior.
32. Instituto Mexicano de Comercio Exterior. La Industria de Hormonas Esteroides en México. 1978.